



(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 리써치 파크

(72) 발명자

마르틴, 크리스틴

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

장, 밍

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리써치 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, 진균성 감염, 중추신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 혈관신
생 의존성 질환, 자가면역질환의 치료 및/또는 암의 예방적 전처리(pre-treatment)에 유용한, 18,21-디데스옥시
막베신 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 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리써치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

보우스텐, 윌리암

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리써치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

모쓰, 스테벤

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리써치 파크

가이췌르, 사비네

영국, 에섹스 씨비10 1엑스엘, 니어 세프론 웰덴,
리틀 체스터포드, 체스터포드 리써치 파크, 바이오
티카 테크놀로지 리미티드

(30) 우선권주장

0616637.5 2006년08월22일 영국(GB)

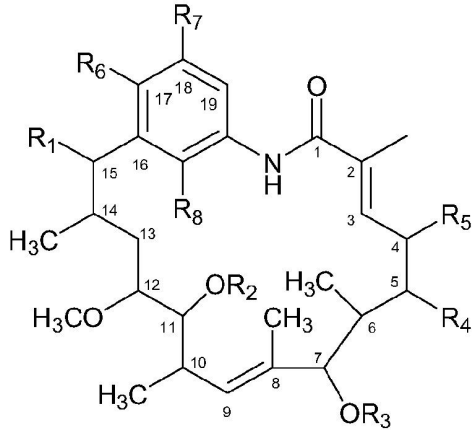
0622341.6 2006년11월09일 영국(GB)

특허청구의 범위

청구항 1

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

[화학식 1]



상기 식에서,

R₁은 H, OH, OMe이고;

R₂는 H 또는 Me이며;

R₃는 H 또는 CONH₂이고;

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

R₆는 H 또는 F이고;

R₇은 H 또는 F이며; 또한

R₈는 H 또는 F이다.

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, R_4 및 R_5 는 각각 H인 화합물.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, R_6 , R_7 및 R_8 은 모두 수소인 화합물.

청구항 9

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 있어서, R_6 , R_7 및 R_8 은 모두 수소가 아닌 화합물.

청구항 10

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 H인 화합물.

청구항 11

제 1항에 있어서, R_1 은 OH이고, R_2 는 H이며, R_3 는 CONH_2 이고, 또한 R_4 및 R_5 는 각각 H인 화합물.

청구항 12

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 H인 화합물.

청구항 13

제 1항에 있어서, R_1 은 OH이고, 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 H인 화합물.

청구항 14

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 은 F이고 R_7 및 R_8 은 각각 H인 화합물.

청구항 15

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

청구항 16

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 은 H이고 R_7 은 F이며 R_8 은 H인 화합물.

청구항 17

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

청구항 18

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 및 R_7 은 각각 F이고 R_8 은 H인 화합물.

청구항 19

제 1항에 있어서, R_1 은 OH이고, R_2 는 H이며, R_3 는 CONH_2 이고, 또한 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 및 R_7 은 각각 F이고

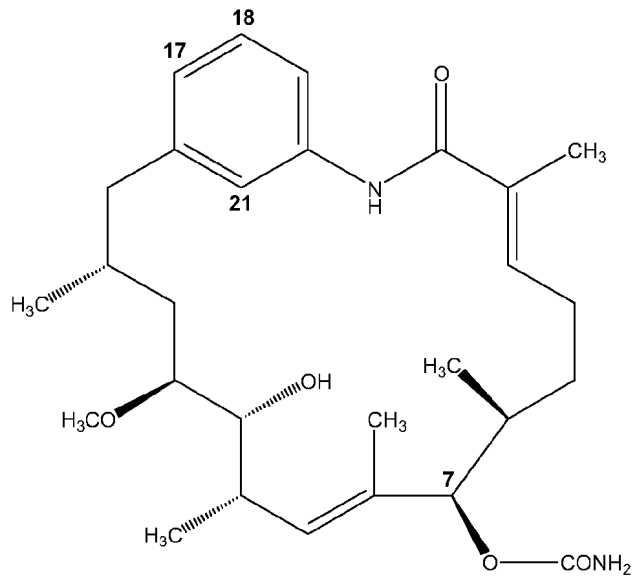
R₈은 H인 화합물.

청구항 20

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

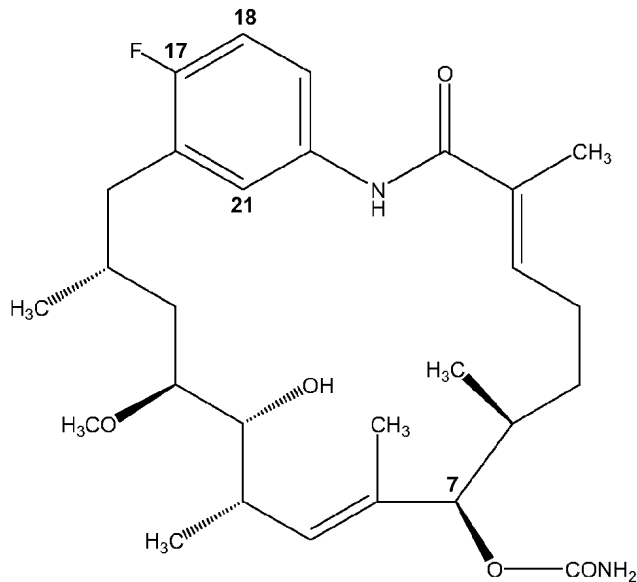
청구항 21

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



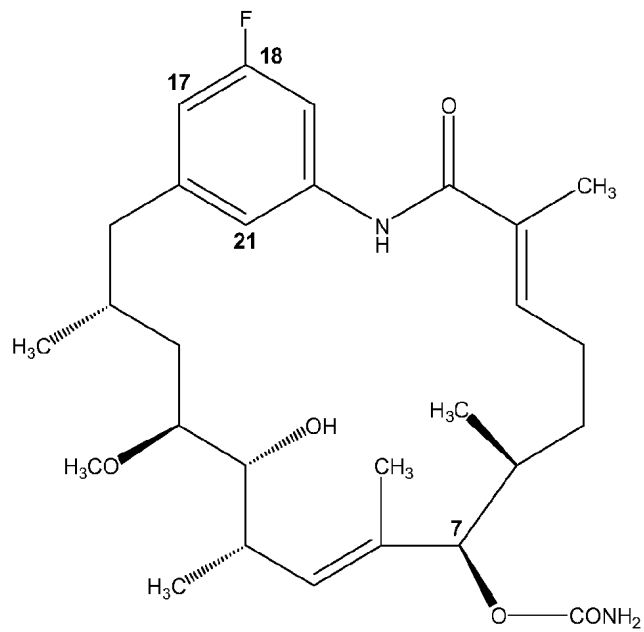
청구항 22

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



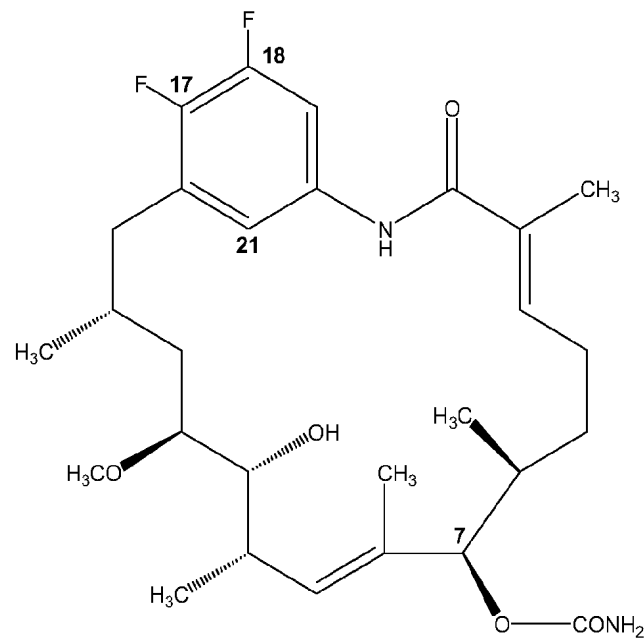
청구항 23

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



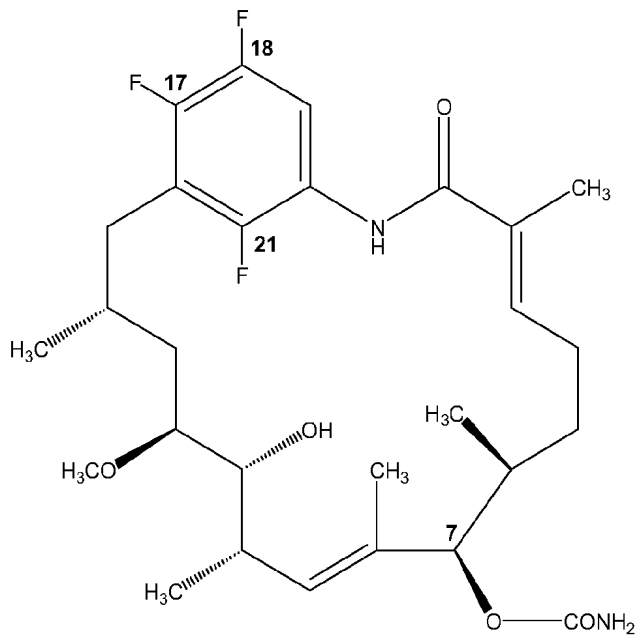
청구항 24

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



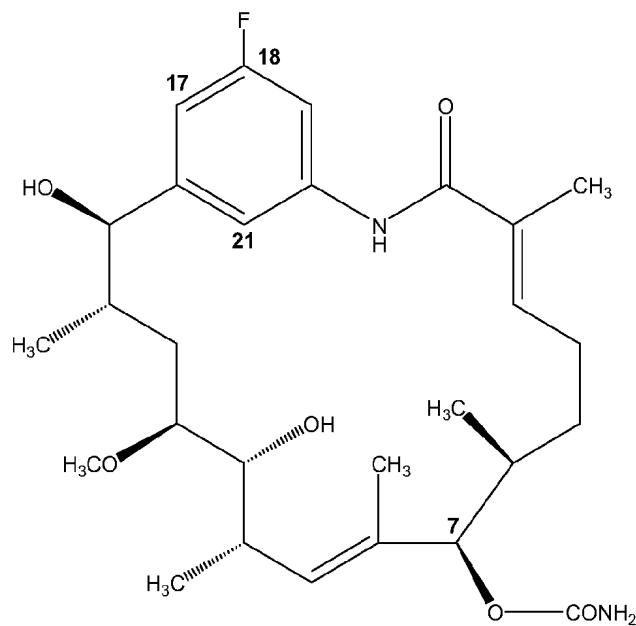
청구항 25

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-디테스옥시막베신 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-디테스옥시막베신 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 메토티렉사이트, 류코보린, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 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, 잼시타빈, 류코보린, 메토티렉사이트, 미토잔톤, 파클리탁셀과 도세탁셀을 포함하는 타산, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈; 아나스트로졸, 고세렐린, 메게스트롤 아세테이트, 프레니손, 타목시펜 및 토레미펜과 같은 호르몬 치료제; 트라스투주맵(항-HER2), 세툽시맵(항-EGFR) 및 베바시주맵(항-VEGF)과 같은 단일클론항체 치료제; 이마티닙, 다사티닙, 게피티닙, 엘로티닙, 라파티닙 및 템시로리무스와 같은 단백질 키나아제 억제제; 보르테오미딘과 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, 사이클로헥시클로로에틸니트로소우레아, 사이클로포스파미드, 잼시타빈, 이포스포아미드, 류코보린, 미토마이신, 미토잔톤, 옥살리플라틴, 및 타솔과 빈테신을 포함하는 타산과 같은 통상적인 화학치료제; 아나스트로졸, 고세렐린, 메게스트롤 아세테이트 및 프레니손과 같은 호르몬 치료제; 세툽시맵(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 이마티닙으로 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 유전자가 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*이 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*이 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*이 결실되거나 또는 비활성화된, 조작된 균주.

청구항 53

제 50항 또는 제 51항에 있어서, *mbcM*, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450*이 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. 미림인, 조작된 균주.

청구항 55

18,21-디테스옥시막베신 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-디테스옥시막베신 유사체는 제 1항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 의해 정의되는 것인 용도.

명세서

기술분야

<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-디테스옥시막베신 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.

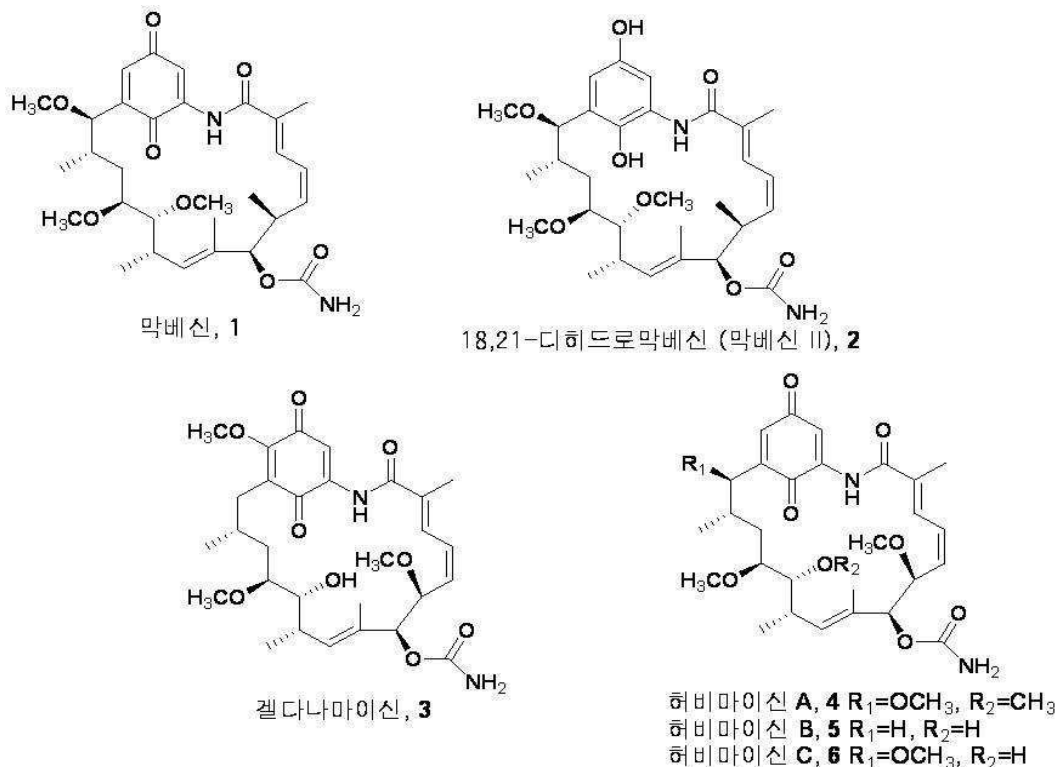
배경 기술

<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 *cdk6*과 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 세포의 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, 마크롤리드(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-디히드로막베신(또한 막베신 I 및 막베신 II로 각각 알려져있음)(1 & 2; Tanida et al., 1980), 겔다나마이신(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, 겔다나마이신은 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 사멸능(예를 들어, 유방암, 만성 골수성 백혈병 및 비소세포 폐암)이 증가됨이 또한 설명되었다(Neckers, 2002; Beliakoff and Whitesell, 2004). 항-신생혈관생성 활성화에 대한 가능성 또한 관심의 대상이다: Hsp90 클라이언트 단백질 HIF-1 α 는 고형 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, 겔다나마이신이 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 겔다나마이신 모두는 이들의 강한 간독성으로 인해 임상 실험에 좋지 않은 후보 물질로서 확인되었고(Workman, 2003), 겔다나마이신은 간독성으로 인해 임상 1상에서 탈락되었다(Supko *et al.*, 1995, WO 03/106653).

<9> 겔다나마이신은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)의 배양 여과물로부터 분리되었고, 시험관 내에서 원생동물에 대해서는 강한 활성을 보였고, 세균과 곰팡이에 대해서는 약한 활성을 보였다. 1994년, 겔다나마이신과 Hsp90과의 조합이 제시되었다(Whitesell *et al.*, 1994). 겔다나마이신에 대한 생합성 유전자 클러스터가 클론화되고 서열분석되었다(Allen and Ritchie, 1994; Rascher *et al.*, 2003; WO 03/106653). DNA 서열은 NCBI 허가번호 AY179507 에서 이용가능하다. 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스(*S. hygroscopicus* subsp. *duamyceticus*) JCM4427로부터 유래된 유전공학적으로 제작된 겔다마이신 생산 균주의 분리, 및 4,5-디히드로-7-0-테스실시태양일-7-히드록시겔다나마이신 및 4,5-디히드로-7-0-테스실시태양일-7-히드록시-7-0-테메틸겔다나마이신의 분리가 최근에 기술되었다(Hong *et al.*, 2004). 허비마이신 생산 균주 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) AM-3672에 겔다나마이신을 처리함으로써 화합물 15-히드록시겔다나마이신, 3중고리 겔다나마이신 유사체 KOSN-1633 및 메틸-겔다나마이신이 분리되었다(Hu *et al.*, 2004). 두 화합물 17-포틸-17-테메톡시-18-0-21-0-디히드로겔다나마이신 및 17-히드록시메틸-17-테메톡시겔다나마이신이 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). 겔다나마이신 생합성 클러스터의 폴리케티드 합성효소의 네 가지 모듈 내에서 아실트랜스퍼라제(AT) 도메인을 치환시켰다(Patel *et al.*, 2004). AT 치환은 완전하게 가공된 유사체 14-테스메틸-겔다나마이신, 8-테스메틸-겔다나마이신 및 6-테스메톡시-겔다나마이신과 완전하게 가공되지 않은 4,5-디히드로-6-테스메톡시-겔다나마이신을 이끌어내는 모듈 1, 4 및 5 내에서 수행되었다. 모듈 7 AT의 치환은 세 종류의 2-테스메틸 화합물, KOSN1619, KOSN1558 및 KOSN1559을 생산해내는데, 이 중 하나(KOSN1559)인, 겔다나마이신의 2-테메틸-4,5-디히드로-17-테메톡시-21-테옥시 유도체는 겔다나마이신보다 4 배 이상, 17-AAG보다 8 배 이상의 결합력으로 Hsp90과 결합한다. 그러나 이는 SKBr3을 사용한 IC₅₀ 측정에서의 향상에 반영되지 않는다. 또 다른 유사체인 신규한 비벤조퀴노이드 겔다나마이신 KOS-1806은 단일페놀(monophenolic) 구조를 가진다(Rascher *et al.*, 2005). KOS-1806에 대한 활성 데이터는 주어지지 않았다.

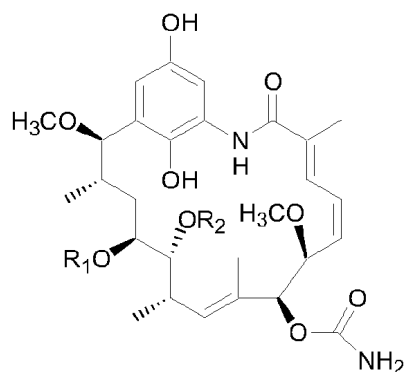
<10> 1979년에 안사마이신 항생제 허비마이신 A가 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 균주 No. AM-3672의 발효 배지로부터 분리되었고, 이의 잠재적 제조 활성에 따라 명명되었다. 항암활성은 세포의 변형된 형태를 되돌리는 약물을 스크리닝하기 위해 라우스 육종 바이러스(Rous sarcoma virus, RSV)의 온도감수성 변이체로 감염된 랫 신장 세포를 사용하여 평가되었다(Uehara, 2003). 허비마이신 A는 Hsp90 샤페론 단백질에 결합하여 일차적으로 작용하는 것으로 주장되었지만, 보존된 시스테인 잔기에 직접 결합하고,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

도 논의되었다(Uehara, 2003).

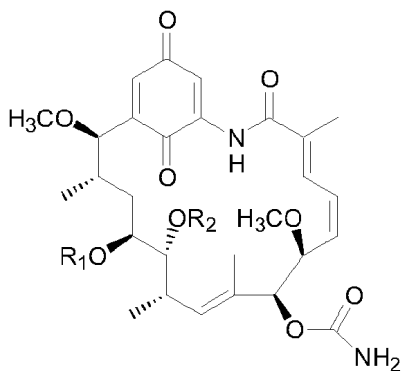
<11> 화학적 유도체가 분리되었고 벤조퀴논 핵의 C19의 치환체가 변경된 화합물 및 고리 사슬 내에서 할로겐화된 화합물이 허비마이신 A보다 독성이 더 적고 항암활성이 더 높은 것으로 나타났다(Omura *et al.*, 1984; Shibata *et al.*, 1986b). 허비마이신 생합성 유전자 클러스터의 서열은 WO 03/106653 및 최근 논문에서 확인되었다(Rascher *et al.*, 2005).

<12> 항진균 및 항원충 활성에 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 젓과 백혈병 P388 세포주와 같은 암세포주에 대해 유사한 항균 및 항암 활성을 가지는 것으로 나타났다(Ono *et al.*, 1982). 역전사 효소 활성 및 말단 데옥시뉴클레오타이드 트랜스퍼라제 활성은 막베신에 의해 억제되지 않았다(Ono *et al.*, 1982). 막베신의 Hsp90 억제기능은 문헌으로 보고된바 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 $R_1=H$, $R_2=H$
TAN-420C, 9 $R_1=H$, $R_2=CH_3$
TAN-420E, 11 $R_1=CH_3$, $R_2=CH_3$



TAN-420B, 8 $R_1=H$, $R_2=H$
TAN-420D, 10 $R_1=H$, $R_2=CH_3$

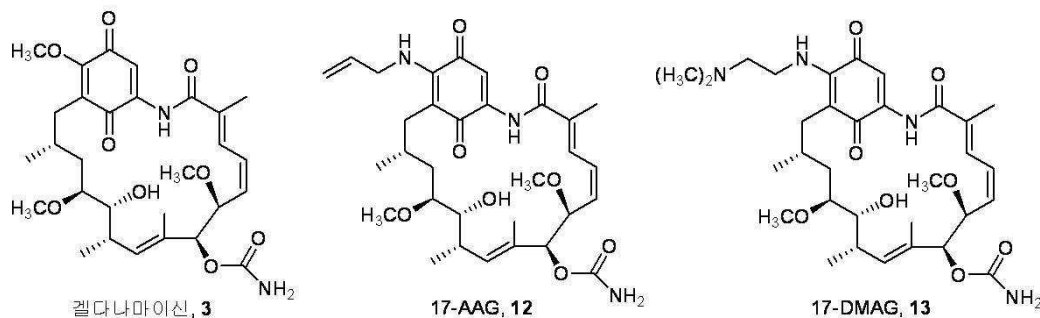
<14>

<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 활성 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-테스메톡시 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-테스메톡시-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 아마이드, 카바메이트, 우레아 및 17-아릴겔다나마이신을 생성하였다(Le Brazidec *et al.*, 2003). 60개 이상의 17-알킬아미노-17-테메톡시겔다나마이신 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 겔다나마이신 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>

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 겔다나마이신 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 변환(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 불활성화 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>

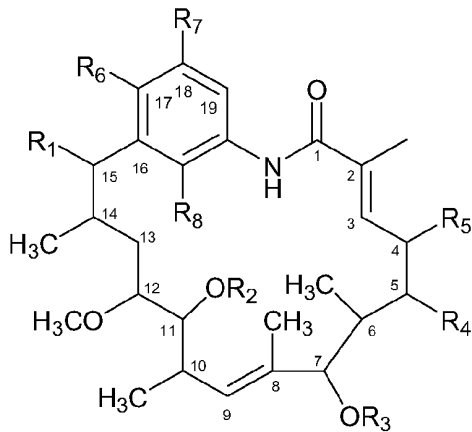
그러므로, 첫 번째 양태로서, 본 발명은 통상적인 스타터 유닛이 결실되고, 대신에 17, 18 및 21 위치가 치환되지 않거나 또는 이들 위치 일부 또는 전부가 플루오르에 의해 치환되어진 18,21-디데스옥시막베신 유사체를 야기하는 스타터 유닛이 통합되어진 막베신 유사체를 제공한다.

<26>

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

으로 허용가능한 염을 제공한다.

화학식 1



<27>

<28>

상기 식에서,

<29>

R₁은 H, OH, OMe이고;

<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 기능이 존재 또는 부재하는 경우) 화학적 화합물을 의미한다.

<43>

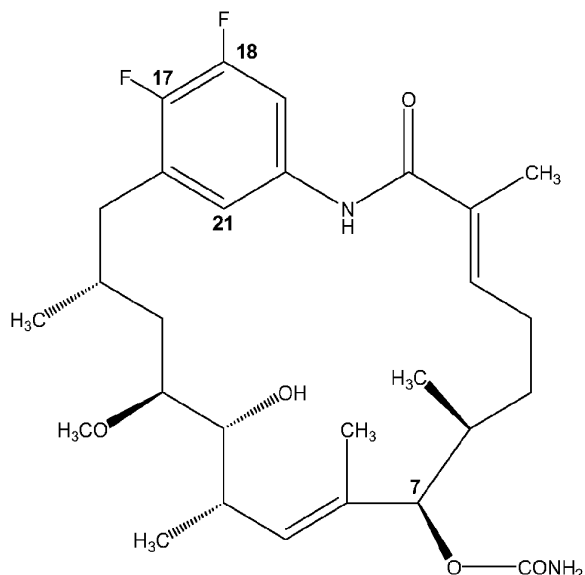
본원에서 사용되는 용어 "상동체(들)"는 다른 막베신 생산 균주로부터 유래한 대체가능한 막베신 생합성 클러스터로부터 유래하거나, 예를 들면, 겔다나마이신, 허비마이신 또는 레블라스타틴으로부터의 대체가능한 안사마이신 생합성 유전자 클러스터로부터 유래한 상동체로부터 유래하는 본원에 기재된 유전자 또는 유전자에 의해 코딩되는 단백질의 상동체를 의미한다. 이러한 상동체는 같은 기능을 수행하는 단백질을 코딩하거나, 막베신 또는 관련된 안사마이신 폴리케티드 생합성에서 이들 자체로 상기 유전자 또는 단백질과 같은 기능을 수행할 수 있다. 바람직하게는, 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. 퍼센트 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 비제한적으로 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 비제한적으로 흑색종, 임파종, 백혈병, 섬유육종, 횡문근육종 및 비만세포종과 같은 전이성 종양 세포 타입; 및 비제한적으로 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 민감하게 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. 프레티오숨(A. pretiosum)* 및 *A. 미룸(A. mirum)*에 의해 예상되어지는 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-메틸트랜스퍼라제 및 실시태양트랜스퍼라제가 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, 팔모익산(palmoic acid)염, 말론산염, 히드록시말레산염, 페닐아세트산염, 글루탐산염, 벤조산염, 살리실산염, 푸마르산염, 톨루엔술폰산염, 메탄술폰산염, 나프탈렌-2-술폰산염, 벤젠술폰산염, 히드록시나프토익산염, 요오드화수소산염, 말산염, 스테로익산(steroidic 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 나트륨염, 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-디테스옥시막베신 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 R_1 은 H 또는 OH이다. 본 발명의 한 실시태양에서 R_1 은 H이다. 본 발명의 또 다른 실시태양에서 R_1 은 OH이다.
- <56> 바람직하게는 R_2 는 H이다.
- <57> 바람직하게는 R_3 는 CONH_2 이다.
- <58> 본 발명의 한 실시태양에서 바람직하기로 R_4 및 R_5 는 함께 하나의 결합이다.
- <59> 본 발명의 다른 실시태양에서 바람직하기로 R_4 및 R_5 는 각각 H이다.
- <60> 본 발명 화합물의 일 실시예에서 R_6 , R_7 및 R_8 은 모두 수소이다.
- <61> 본 발명 화합물의 다른 일 실시예에서 R_6 , R_7 및 R_8 은 모두 수소가 아니다.
- <62> 본 발명의 한 실시태양에서 R_1 은 H이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이다.
- <63> 본 발명의 다른 실시태양에서 R_1 은 OH이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이다.
- <64> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R_1 은 H이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 , R_7 및 R_8 은 각각 H이다.
- <65> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R_1 은 OH이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 , R_7 및 R_8 은 각각 H이다.
- <66> 본 발명의 하나의 적절한 실시태양에서 R_1 은 H이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 은 F이고 R_7 및 R_8 은 각각 H이다.
- <67> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R_1 은 OH이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 은 F이고 R_7 및 R_8 은 각각 H이다.
- <68> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R_1 은 H이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 은 H이고 R_7 은 F이며 R_8 은 H이다.
- <69> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R_1 은 OH이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 은 H이고 R_7 은 F이며 R_8 은 H이다.
- <70> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 본 발명의 화합물은 예를 들어 하기 구조로 나타낸 바와 같이, R_1 은 H이고 R_2 는 H이며 R_3 는 CONH_2 이고 R_4 및 R_5 는 각각 H이며 R_6 및 R_7 은 각각 F이고 R_8 은 H이다.



<71>

<72> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 OH이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆ 및 R₇은 각각 F이고 R₈은 H이다.

<73> 본 발명의 다른 적절한 실시태양에서 R₁은 H이고 R₂는 H이며 R₃는 CONH₂이고 R₄ 및 R₅는 각각 H이며 R₆, R₇ 및 R₈은 각각 F이다.

<74> 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-디테스옥시막베신 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 신경 질환, 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 아닙니다.

<81> 혈관신생 의존성 질병은 노인성 황반변성, 당뇨병성 망막증 및 다양한 다른 안과질환, 동맥경화증 및 류마티스성 관절염을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

<82> 자가면역질환은 류마티스성 관절염, 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 전신성 홍반성 루푸스, 건선을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

- <83> "환자"는 인간 및 다른 동물(특히 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 제 2의 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 알킬화제 및 유사분열 억제제(토포이소머라제 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 메토크렉사이트, 류코보린, 프레니손, 블레오마이신, 사이클로포스파미드, 5-플루오로우라실, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 독소루비신(아드리아마이신), 타목시펜, 토레미펜, 메게스트롤 아세테이트, 아나스트로졸, 고세렐린, 항-HER2 단일 클론 항체(예를 들어, 상표 HerceptinTM으로 시판되는 트라스투주맙), 카페시타빈, 라록시펜 염화수소, EGFR 억제제(예를 들어, 상표 Iressa[®]로 시판되는 게피티닙, 상표 TarcevaTM로 시판되는 엘로티닙, 상표 ErbituxTM로 시판되는 세툽시맙), VEGF 억제제(예를 들어, 상표 AvastinTM으로 시판되는 베바시주맙), 및 프로테아좀 억제제(예를 들어, 상표 VelcadeTM로 시판되는 보르테오미드)가 포함되나 이에 한정되지 않는다. 또한, 적합한 제제로는 시스플라틴, 사이타라빈, 사이클로헥시클로로에틸니트로소우레아, 젬시타빈, 이포스포아미드, 류코보린, 미토마이신, 미토잔론, 옥살리플라틴, 및 탁솔과 빈데신을 포함하는 탁산과 같은 통상적인 화학치료제; 호르몬 치료제; 세툽시맙(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, 엘릭서, 용액 또

는 현탁액의 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 폴리비닐피롤리돈, 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 충전제로 사용될 수 있다. 이러한 측면에서 바람직한 부형제로는 락토오즈, 전분, 셀룰로스, 유당 또는 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜이 포함된다. 수성 현탁액 및/또는 엘릭서의 경우, 본 발명의 화합물은 다양한 감미제 또는 향료, 착색 물질 또는 염료와 함께, 유화제 및/또는 현탁제와 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, 교각(cachet) 또는 정제와 같은 분리된 단위로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 액체 또는 비-수성 액체 상태의 액체 또는 현탁제로서; 또는 수중유(oil-in-water) 액체형 에멀전 또는 유중수(water-in-oil) 액체형 에멀전으로서 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, 현탁액, 로션, 분말, 용액, 페이스트, 겔, 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 돕는 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, 폴리에틸렌 글리세린 및 식물성 오일 등이 있으나 이에 한정되지 않으며, 바람직하게는 물을 이용할 수 있다. 상기 베히클 및 사용된 농도에 따라, 상기 활성 성분은 베히클에 현탁되거나 용해될 수 있다. 용액을 제조하는 데 있어서, 상기 활성 성분은 주입을 위해 물에 용해될 수 있고 여과 살균한 후 적합한 바이알(vial) 또는 앰플에 충전되고 봉입될 수 있다.
- <103> 유리하게, 국소 마취제, 보존제 및 완충제와 같은 제제는 베히클에 용해될 수 있다. 안정성을 증진시키기 위해, 조성물은 바이알에 충전하고 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 현탁액은, 활성 성분이 용해되는 대신에 베히클에 현탁되고 여과를 통해 살균될 수 없는 것을 제외하고, 실질적으로 용액과 동일한 방법으로 제조한다. 상기 활성 성분은 살균된 베히클에 현탁시키기 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, 미국특허 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 제 4,447,233호; 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 균주를 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 조건)으로는 적합한 스타터 주입물 및 적합한 조성물의 생장 배지(당업자에게 잘 알려져 있거나 공지된 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-시스테인 티오에스테르; 및 예를 들어 N-아세틸-시스테인 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 유전자 내로 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 만듦으로써 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 돌연변이시키는 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, 겔다나마이신 또는 허비마이신의 생합성에 관계된 클러스터를 포함하는 이중의 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, 겔다나마이신 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 생산체 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 것이며, 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-피리딜-1-프로판), EP 0 627 009) 및 안사이미들은 산화제의 억제제이며, 이들 화합물은 생산 배지에 첨가되어 유사체를 생성시킬 수 있다. 또한, 시네펜진(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 겔다나마이신 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 이중 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 이중 숙주 내로의 전이를 포함한다. 양자택일적으로, 완전한 막베신 생합성 클러스터는 저항성 및 조절 유전자를 포함하거나 포함하지 않은 상태로 이중 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 쭈쿠벤시스(*Streptomyces tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 사카로폴리스포라 에리쓰래아(*Saccharopolyspora erythraea*), 스트렙토마이세스 프라디아(*Streptomyces fradiae*), 스트렙토마이세스 아버미티리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 신나몬렌시스(*Streptomyces cinnamonensis*), 스트렙토마이세스 리모수스(*Streptomyces rimosus*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 스트렙토마이세스 그리세오퍼스쿠스(*Streptomyces griseofuscus*), 스트렙토마이세스 론지스포르플라버스(*Streptomyces longisporoflavus*), 스트렙토마이세스 베네주에라(*Streptomyces venezuelae*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 마이크로모노스포라 종(*Micromonospora* sp.), 마이크로모노스포라 그리세오루비다(*Micromonospora griseorubida*), 아미코라톱시스 메디테라네이(*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), 겔다나마이신 O-메틸 트랜스퍼라제, *hbmN*, *hbmL*, *hbmP*, (Rascher *et al.*, 2005), 허비마이신 O-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 겔다나마이신 O-메틸 트랜스퍼라제를 코딩하는 유전자 서열은 공유 도메인 내에 존재하지 않지만, 당업자는 프로브를 만들 수 있는데, 비슷한 O-메틸 트랜스퍼라제를 이용하여 이중의 프로브를 만들거나 이용가능한 상동의 유전자로부터 축퇴성 프라이머를 고안함으로써 상동의 프로브를 만들어 겔다나마이신 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 쥘쿠벤시스(*Streptomyces tsukubaensis*), 스트렙토마이세스 코엘리칼라(*Streptomyces coelicolor*), 스트렙토마이세스 리비단스(*Streptomyces lividans*), 사카로폴리스포라 에리쓰래아(*Saccharopolyspora erythraea*), 스트렙토마이세스 프라디아에(*Streptomyces fradiae*), 스트렙토마이세스 아버미틸리스(*Streptomyces avermitilis*), 스트렙토마이세스 신나몬넨시스(*Streptomyces cinnamonensis*), 스트렙토마이세스 리모수스(*Streptomyces rimosus*), 스트렙토마이세스 알버스(*Streptomyces albus*), 스트렙토마이세스 그리세오퍼스쿠스(*Streptomyces griseofuscus*), 스트렙토마이세스 롬지스포폴라버스(*Streptomyces longisporoflavus*), 스트렙토마이세스 베네주에라(*Streptomyces venezuelae*), 마이크로모노스포라 종(*Micromonospora* sp.), 마이크로모노스포라 그리세오루비다(*Micromonospora griseorubida*), 아미코라톱시스 메디테라네이(*Amycolatopsis mediterranei*) 또는 악티노플라네스 종(*Actinoplanes* sp.) N902-109를 포함하는 균으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 추가적인 가능한 균주는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 겔다너스(*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. 프레티오섬*(*A. pretiosum*) 또는 *A. 미럼*(*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. 프레티오섬*(*A. pretiosum*) 또는 *A. 미럼*(*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

<205> **일반적인 방법**

<206> 배양물 발효

<207> 세균 균주 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬(*Actinosynnema pretiosum* subsp. *pretiosum*) ATCC 31280(미국특허 제4,315,989호) 및 악티노신네마 미럼(*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 나타났다. 균주 모두는 ISP2 아가 배지 (배지 3, Shirling, E.B. and Gottlieb, D., 1966) 상에서 28℃ 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℃에서 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℃에서 5 또는 2.5 cm 작동반경으로 200 내지 300 rpm 사이로 교반하면서 배양했다. 그 다음 상기 배양액은 추출을 위해 수집되었다.

<209> 배지

<210> **배지 1 - 종자 배지**

<211> 증류수 1L 내의 조성임

<212> 글루코즈	20g
가용성 감자 전분 (Sigma)	30g
스프레이 건조된 옥수수 칩지 농축액 (Roquette Freres)	10g
'누트리소이(Nutrisoy)'의 구운 콩 분말(Archer Daniels Midland)	10g
우유 고형분 유래의 펩톤 (Sigma)	5g
NaCl	3g
CaCO ₃	5g
NaOH로 pH 조정	7.0

<213> 121℃로 20분 동안 오토클레이브시켜 멸균하였다.

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

<215> **배지 2 - 발효 배지**

<216> 증류수 1L 내의 조성임

<217> 클리세롤	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 오토클레이브시켜 멸균하였다.

<219> **배지 3 - ISP2 배지**

<220> 증류수 1L 내의 조성임

<221> 맥아 추출물	10g
효모 추출물	4g
텍스트로즈	4g
한천	15g
NaOH로 pH 조정	7.3

<222> 121℃로 20분 동안 오토클레이브시켜 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 오토클레이브시켜 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 Buker 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 C_{18} 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-디테스옥시막베신 유사체 10 mM 스톱 용액을 준비한다. 앰버 바이알 내에서 3개의 0.01 mL 엘리퀼트에 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 셰이커 상에서 섞고, 이어서 얻은 용액 또는 현탁액을 2 mL 에펜도르프 튜브 안으로 옮긴 다음 13200 rpm에서 30 분 동안 원심분리한다. 상청액의 엘리퀼트를 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% CO_2), 37°C에서 성장시켰다.

<242> 화합물이 인간 종양 세포주의 성장에 미치는 영향을 평가하기 위해 변형된 요오드화 프로피디움 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-디테스옥시막베신 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 프로피디움 (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. 성장 억제 정도는 처리군/대조군 $\times 100$ (% T/C)로 나타내었다. 처리한 활성 화합물의 농도에 대한 % T/C의 그래프로서 플로팅한 후, 이를 70% 까지 세포 성장을 억제하기 위해 필요한 농도(IC₇₀)를 계산하는데 사용할 수 있다.

<244> 실시예 1: 막베신 PKS 유전자 클러스터의 서열분석

<245> 악티노신네마 프레티오섬(ATCC 31280) 및 악티노신네마 미림(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'-GGTCTAGAGGTCAGTGCCCCGCGTACCGTCGT-3'(서열번호 1) 및 BIOSG105 5'-GGCATATGCTGTGCTCGGGCTCAAC-3'(서열번호 2)는 스트랩토마이세스 하이그로스코피쿠스 NRRL 3602(서열 허가번호: AY179507)의 겔라나마이신 생합성 유전자 클러스터 유래의 실시태양트랜스퍼라제-코딩 유전자 *gdmN*를 표준 기술을 이용하여 증폭하기 위해 사용되었다. 서던 블롯 실험은 DIG 시약 및 비-방사성 핵산 표지 및 검출을 위한 키트를 사용하여 제조지침서(Roche)에 따라 수행했다. DIG-표지된 *gdmN* DNA 절편은 이중 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/SacI*으로 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. 미림의 코스미드 라이브러리로부터 동정되었다. 세가지 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'-CCCGCCCGCGGAGCGGCGGTGGCCGCCAGGGC-3'(서열번호 3) 및 BIOSG125 5'-GCGTCCTCGCGCAGCCACGCCACAGCAGCTCCAGC-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'-CCAACCCCGCGGTCCCGGCGCGCCGAACACG-3'(서열번호 5) 및 BIOSG131 5'-GTCGTCGGCTACGGCGCGGTGGGGCAGCTGTGT-3'(서열번호 6)에 더해, BIOSG132 5'-GTCGGTGGACTGCCCTGCGCCTGATCGCCCTGCGC-3'(서열번호 7) 및 BIOSG133 5'-GGCCGGTGGTGTGCCCCGAGGACGGGGAGCTGCGG-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'-CACCCTCGCGGGGTGGCGCGGCACGACGTGG CTGC-3'(서열번호 9) 및 BIOSG 137 5'-CCTCCTCGGACAGCGCATCAGCGCCGCGC 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. 서열번호 11 내의 각 오픈 리딩 프레임의 위치는 표 3에 나타났다.

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 뉴클레오타이드 위치(Nucleotide position in SEQ ID NO: 11)	유전자 이름(Gene Name)	인코딩된 단백질의 기능(Function of the encoded protein)
14925-17909*	<i>mbcR11</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 나타났다.

2.1. 플라스미드 pLSS308의 구축

스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 균주 NRRL 3602 (AY179507)의 겔다나마이신 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 미림(BIOT-3134; DSM43827; ATCC29888) 유래의 상동 유전자 절편을 증폭하는데 사용되었다. 축퇴성 올리고는 하기와 같다:

FPLS1: 5': ccscgggcgnycngsttcgacngygag 3'; (서열번호 12)

FPLS3: 5': cgtcncggannccggagcacatgccctg 3'; (서열번호 13)

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

PCR 증폭을 위한 주형은 악티노신네마 미림 코스미드 43이었다. 코스미드 43 생성은 상기 실시예 1에 기재했다.

올리고 FPLS1 및 FPLS3은 코스미드 43을 주형으로 사용하고, Taq DNA 중합효소를 사용한 표준 PCR 반응 내에서, 악티노신네마 미림 유래의 *gdmM* 상동체의 내부적 단편을 증폭하기 위해 사용되었다. 결과적인 793bp의 PCR 생산물을 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여, 플라스미드 pLSS301을 생성시켰다. 증폭된 서열이 A. 미림의 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. 미림 *mbcM* 유전자의 내부적 단편을 포함한다.

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

플라스미드 pUZ8002가 내재되어 있는 대장균 ET12567은 접합(conjugation)을 위한 대장균 공여균주를 생성시키기 위해 전기천공을 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℃로 배양했다. 24시간 후, 50mg/L 아프라마이신 및 25mg/L 날리딕산을 배양용기상에 발랐다.

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.

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

생산력을 가지는 분리된 선택체는 BIOT-3806으로 지정했다.

2.3 BIOT-3806 유래의 화합물 확인

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

표 4

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

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

3.1 *mbcM*의 하위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

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 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 플라스미드 pWV308을 얻었다.

BV145 ATATACTAGTCACGTCACCGGCGCGGTGTCCGCGGACTTCGTCAACG

SpeI

(서열번호 14)

BV146 ATATCCTAGGCTGGTGGCGGACCTGCGCGCGGTTGGGGTG

AvrII

(서열번호 15)

3.2 *mbcM*의 상위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

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 *SmaI*으로 선형화된 pUC19 내로 클로닝하여 pWV309를 얻었다.

BV147 ATATCCTAGGCACCGTCGCTGCTCGACCTCGCCCCGCCACGC

AvrII

(서열번호 17)

BV148 ATATTCTAGACGCTGTTTCGACGCGGGCGCGGTCACCGGGC

XbaI

(서열번호 18)

생산물 PCRwv308 및 PCRwv309는 같은 방향성으로 pUC19 내로 클로닝되어 다음 클로닝 과정을 위해 pUC19 폴리링커 내에 *PstI* 자리를 형성했다.

상기 1443 bp의 pWV309 유래의 1443bp *AvrII/PstI* 단편은 pWV308의 4073bp *AvrII/PstI* 단편 내로 클로닝되어 pWV310을 생성했다. pWV310은 그러므로 *AvrII* 자리에 결합된 *mbcM*의 플랭킹 부분과 상동적인 DNA를 코딩하는 *SpeI/XbaI* 단편을 포함했다. 이 2816 bp의 *SpeI/XbaI* 단편은 *SpeI*로 선형화된, pKC1132(Bierman *et al.*, 1992) 내로 클로닝되어 pWV320을 생성했다.

3.3 악티노신네마 프레티오섬 아속. 프레티오섬의 형질전환

플라스미드 pUZ8002가 내재되어 있는 대장균 ET12567은 접합(conjugation)을 위한 대장균 공여균주를 생성시키기 위해 전기천공을 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℃로 배양했다. 24시간 후, 50 mg/L 아프라마이신 및 25 mg/L 나리딕스산을 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 게놈 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.

<291> 3.4 2차 교차에 대한 스크리닝

<292> 균주들은 배지 4(50 mg/L 아프라마이신으로 보충된) 상에 부착되고, 28℃에서 4일간 성장시켰다. 각각 부착물의 1 cm² 부분을 50ml 팔콘 튜브에 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 성장시켜 이후 50ml 팔콘 튜브에 담긴 다른 7 mL의 변형된 ISP2(상기 참고) 내로 계대배양(5% 접종)했다. 4-5회 계대배양 후 배지에 초음파를 처리하고, 연속적으로 희석한 후, 배지 4로 옮겨 28℃에서 4일동안 배양하였다. 이후 단일콜로니를 아프라마이신을 포함하는 배지 4 및 항생제를 포함하지 않는 배지 4 위에 부착한 후 플레이트를 28℃에서 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* 단백질질을 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℃에서 4일간 성장시켰다. 각각의 부착물로부터 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10 mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스탑고형, 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℃, 200 rpm조건에서 2 inch 작동반경으로 2일 동안 배양했다. 이들을 이후 생산배지(배지 2- 5% 글리세롤, 1% 콘스탑고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이수소칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 1% 칼슘 카르보네이트)에 접종하고(0.5 mL 내지 10 mL), 28℃에서 24 시간 동안 성장시키고, 이후 26℃에서 추가로 5일 동안 성장시켰다. 2차 대사체를 추출하고, 막베신 유사체의 생산성을 상기 일반적 방법에서 기재한 바와 같이 LCMS를 통해 분석하였다.

<294> 3.5 BIOT-3872로부터 화합물 14 및 15 확인

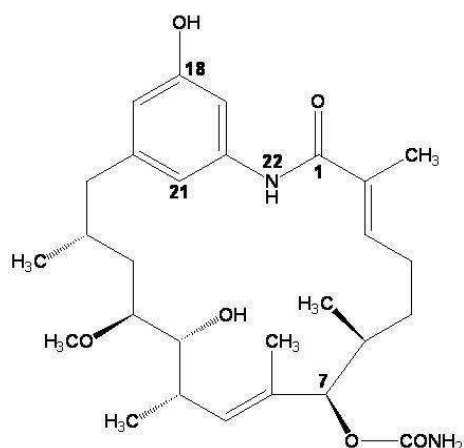
<295> 실시예 3.4에 기재된 발효 추출물을 얻은 다음, 이를 LCMS 방법 1을 이용한 상기 일반적 방법에 개시된 바와 같은 LCMS를 통해 분석하였다. 막베신은 관찰되지 않았으며, 두 개의 신규 화합물이 관찰되었다. 이 화합물의 물리화학적 특성을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

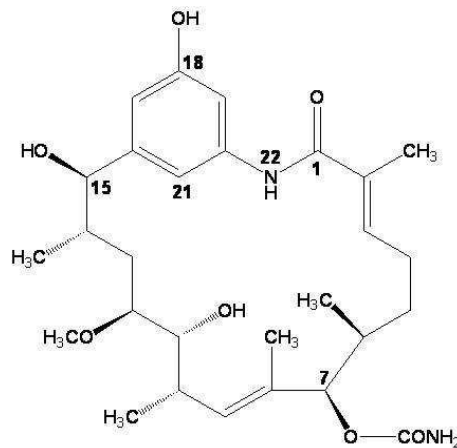
<296> LCMS에 의해 확인된 화합물

화합물	머무름 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.



화합물 14



화합물 15

<298>

<299>

mbcM 내로의 통합(실시예 2) 또는 *mbcM* 유전자의 결실 중 어느 하나에 의한 *MbcM*의 기능 제거는 동일한 화합물; 14 및 15을 생산한다는 점을 주목하라. 관찰된 구조와 생합성 경로 간의 관계 분석은 *MbcM* 이외에도 많은 수의 효소들이 기능하지 않는 것을 나타내었다. 화합물 15의 경우에 이들은 *MbcP*, *MbcMT1* 및 *MbcMT2*이고, 화합물 14의 경우에 *MbcP450*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; 약티노신네마 프레이토섬 배양물은 ISP2 플레이트(배지 3) 상에서 28℃에서 3일간 성장시키고, 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℃에서 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 15을 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℃에서 3일 동안 성장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스톱고형, 1% 콩가루, 0.5% 펄톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28℃, 200rpm 조건에서 2 인치 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스톱고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이소수칼륨, 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℃에서 24시간동안 성장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 용액 (메탄올 내에 용해된 3-아미노벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26℃에서 6일 동안 추가로 배양되었

다. 동시에, 종자배지 배양액은 배지 2를 접종에 접종하는 데 이용했다. 이들 배양액의 분석(이하 참고)은 두 타입의 생산배지 모두에서 동일한 화합물이 제조되거나 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-디테스옥시막베신의 확인

<307> 실시예 2.7에 기재된 발효 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 발효물의 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

<308> 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-디테스옥시막베신의 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-디테스옥시막베신의 발효

<311> WV4a-33은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28℃에서 3일 동안 성장시켰다. 두 개의 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스탑고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 셰이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28℃, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지 10mL(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스탑고형, 2% 효모추출물, 2% 인산이소수칼륨, 0.5% 염화마그네슘, 0.1% 칼슘 카르보네이트, 배지는 2-60일 동안 침전되도록 방치된 뒤 생산 배지로서 상층을 취함)을 포함하는 170 팔콘 튜브 각각에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26℃에서 24시간동안 성장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 용액 (메탄올 내에 용해된 3-아미노벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26℃에서 6일 동안 추가로 배양되었다. 배양액을 따라내고(대략 1.4 L), 팔콘 튜브를 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-디테스옥시막베신의 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 셰이커에서 배양되었다. 생산성 수준은 팔콘 튜브 생산 배양액을 위하여 측정된 것의 대략 50% 내지 90%인 것으로, LCMS에 의하여 평가되었다.

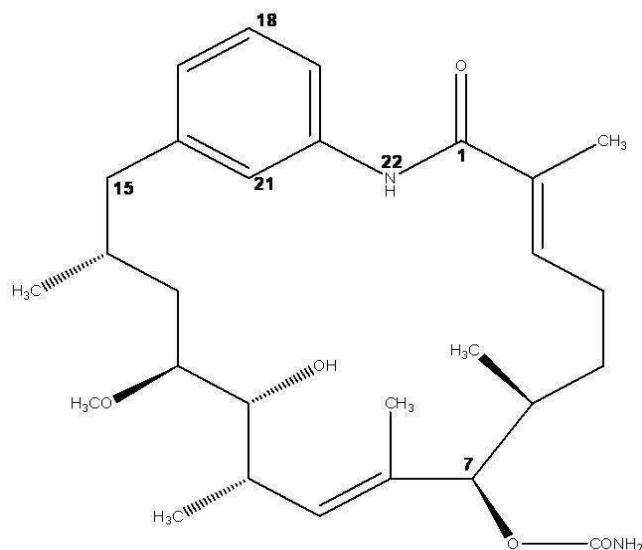
<312> 5.2 4,5-디히드로-11-O-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디테스옥시막베신의 분리 및 특성 확인

<313> 발효 브로쓰(3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40℃, 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℃, 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:아세트니트릴의 (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>

<317> 실시예 6: BIOT-3870에 5-아미노-2-플루오로벤조산을 주입함에 따른 4,5-디히드로-11-*O*-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신의 생성

<318> 6.1 BIOT-3870을 이용한 5-아미노-2-플루오로벤조산의 생체내 변환

<319> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28°C에서 3일 동안 성장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수정전분, 0.5% 콘스팁고형, 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% 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 성장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 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.

<320> 6.2 4,5-디히드로-11-*O*-데스메틸-15-데스메톡시-17-플루오로-18,21-디데스옥시막베신, 17의 확인

<321> 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

<322>

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

<323> 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 성장시켰다. 2개의 6 mm 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수정전분, 0.5% 콘스팁고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 셰이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28°C, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양

발효 브로쓰(~3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40℃, 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℃, 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.

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

BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28℃에서 3일 동안 성장시켰다. 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)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28℃, 200rpm 조건에서 2 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스텝고형, 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℃에서 24시간 동안 성장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 용액 (메탄올 내에 용해된 5-아미노-3-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26℃에서 6일 동안 추가로 배양되었다.

- 38 -

<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

<334>

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

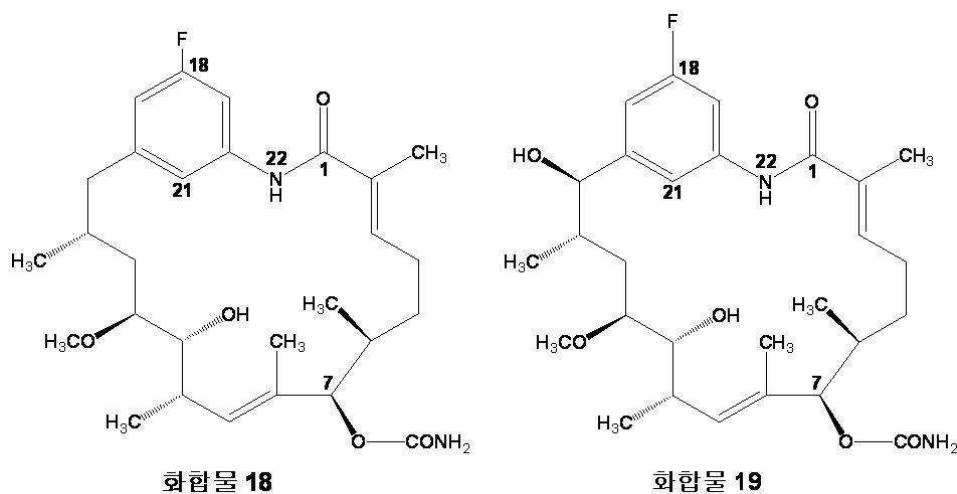
<335> 7.3 4,5-디히드로-11-*O*-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디테스옥시막베신, 18의 생산 및 추출

<336> BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28℃에서 3일 동안 생장시켰다. 2개의 6 mm 원형 플러그를 종자배지 30mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스톱고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 250 mL 코니칼 셰이크 플라스크에 접종하는 데 이용했다. 6개의 플라스크가 접종되었다. 이러한 종자배지 배양액을 28℃, 200rpm 조건에서 1 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지 10mL(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스톱고형, 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 튜브 각각에 접종하고(10 mL에 대하여 1 mL), 26℃에서 24시간 동안 생장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 용액 (메탄올 내에 용해된 5-아미노-3-플루오로벤조산) 0.1 mL를 각 팔콘 튜브에 첨가하여 최종 농도가 2 mM가 되도록 하였다. 튜브들은 26℃에서 6일 동안 추가로 배양되었다. 배양액을 따라내고(대략 1.4 l), 팔콘 튜브를 세척하였다(각각 7 mL의 물로). 세척액을 따라내었다(대략 1.4 l). 따라내어진 배양액 및 세척액을 하기와 같이 4,5-디히드로-11-*O*-데스메틸-15-데스메톡시-18-플루오로-18,21-디테스옥시막베신을 분리하기 위하여 사용하였다.

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

<338> 발효 브로쓰(~3 L)는 동부피의 에틸 아세테이트(EtOAc)로 2 번 추출했다. 유기 추출물을 모으고, 용매를 40℃, 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℃, 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:아세트오닐트릴의 (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).



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

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

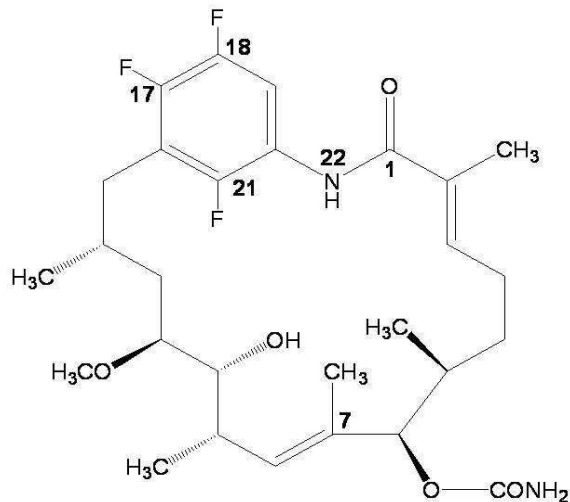
BIOT-3870은 MAM 플레이트(배지 4) 상에 부착되고 28℃에서 3일 동안 성장시켰다. 6 mm의 원형 플러그를 종자배지 10mL(배지 1의 변형- 2% 글루코스, 3% 수성전분, 0.5% 콘스탑고형, 1% 콩가루, 0.5% 펩톤, 0.3% 염화나트륨, 0.5% 칼슘 카르보네이트)를 포함한 각각의 50mL 팔콘 튜브에 접종하는 데 이용했다. 이러한 종자배지 배양액을 28℃, 200rpm 조건에서 2 inch 작동반경으로 65 시간 동안 배양했다. 이들을 이후 변형된 생산배지(배지 2의 변형- 5% 글리세롤, 1% 콘스탑고형, 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℃에서 24시간 동안 성장시켰다. 200 mM 주입물 스톱 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℃에서 6일 동안 추가로 배양되었다.

8.2 4,5-디히드로-11-*O*-데스메틸-15-데스메톡시-18,21-디데스옥시-17,18,21-트리플루오로막베신, 20의 확인

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

표 9

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

실시에 9: *mbcM*이 프레임내 결실(in-frame deletion)을 가지며, *mbcMT1*, *mbcMT2*, *mbcP* 및 *mbcP450*이 추가적으로 결실된 악티노신네마 프레티오섬 균주의 생성

9.1 *mbcMT2*의 하위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

올리고 Is4de11(서열번호 23) 및 Is4de12a(서열번호 24)는 주형으로 코스미드 52(실시에 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 Is4de12a 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.

Is4de11 (서열번호 23)

5'-GGTCACTGGCCGAAGCGCACGGTGTCATGG-3'

Is4de12a (서열번호 24)

5'-CCTAGGCGACTACCCGCGACTACTACACCGAGCAGG-3'

9.2 *mbcM*의 상위 플랭킹 부분에 상동적인 DNA의 클로닝

올리고 Is4de13b(서열번호 26) 및 Is4de14(서열번호 27)은 주형으로 코스미드 52(실시에 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 Is4de13b 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.

Is4de13b (서열번호 26)

5'-CCTAGGAACGGGTAGGCGGGCAGGTCGGTG-3'

Is4de14 (서열번호 27)

5'-GTGTGCGGGCCAGCTCGCCAGCACGCCAC-3'

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

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% 콘스톱고형, 0.3% 효모추출물, 0.3% 칼슘 카르보네이트, 0.03% 황산철, 2% 아가) 상에 도말하고, 28℃로 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℃에서 4일간 생장시켰다. 2개의 6mm 원형 플러그를 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℃에서 4일간 배양시켰다. 하나의 클로니를 아프라마이신을 함유하는 MAM 배지, 및 항생제를 포함하지 않는 NAM 배지 두 개 모두에 부착시키고, 28℃에서 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 Hsp90을 위해 동일 완충액 내에서 0.1 mM로 희석했다. 작용열은 MSC 시스템(Microcal) 상에서 1.485mL의 세포 부피로 30℃에서 측정했다. 각각의 0.100 mM 시험화합물 0.027 mL의 10개 엘리퀴트들을 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 나타났다.

표 10

Hsp90 결합에 대한 K_d 값

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

실시예 11: 생물학적 데이터 - 18,21-디테스옥시막베신 유사체의 시험관내 항암 활성 평가

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

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

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

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

본원에서 언급되는 특허 및 특허출원을 포함하는 모든 참고문헌은 가능한 전체적인 범위로 본원에 참고문헌으로서 포함된다.

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

- 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.
- Bagatell, R. and Whitesell, L. (2004) Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity. Molecular Cancer Therapeutics 3: 1021-1030.
- Beliakoff, J. and Whitesell, L. (2004) Hsp90: an emerging target for breast cancer therapy. Anti-Cancer Drugs 15:651-662.
- 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., Mertelsmann 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 cytotoxic 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 H.H., 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 cytotoxic 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 a 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.

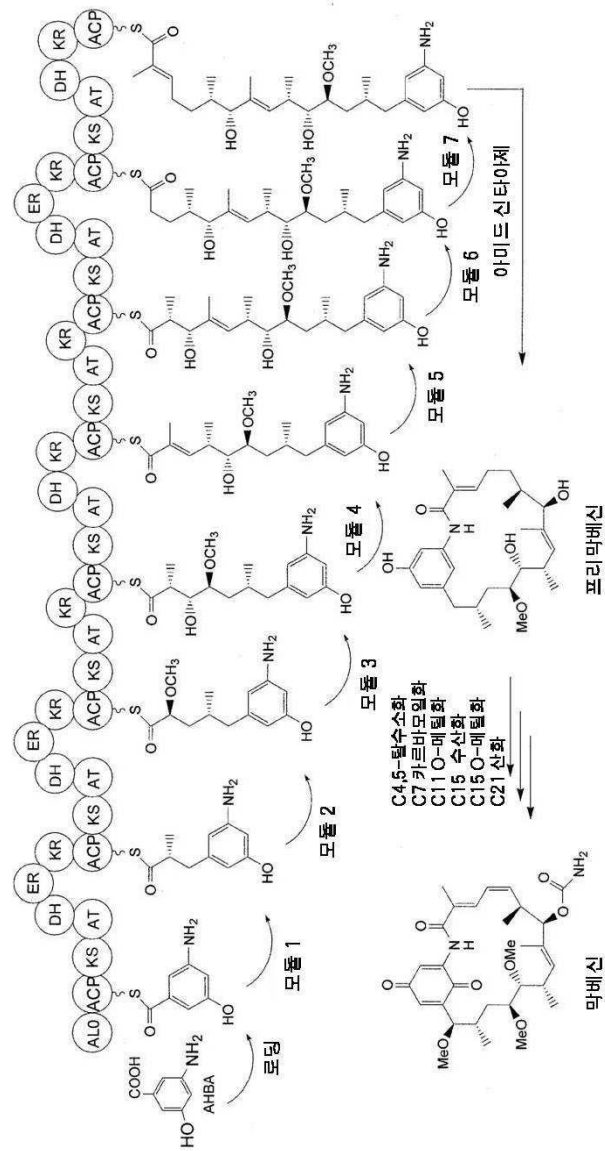
- <455> Whitesell, L., Mimnaugh, E.G., De Costa, B., Myers, C.E. and Neckers, L.M. (1994) Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60^{v-src} heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8324-8328.
- <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 청구범위는 본원에서 기술하고 있는 어떠한 특징 또는 특징들의 조합에 관한 것일 수 있다. 이들은 생성물, 조성물, 공정, 또는 용도 청구항의 형태를 취할 수 있으며, 한 예로서 제한 없이 하기 청구항을 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

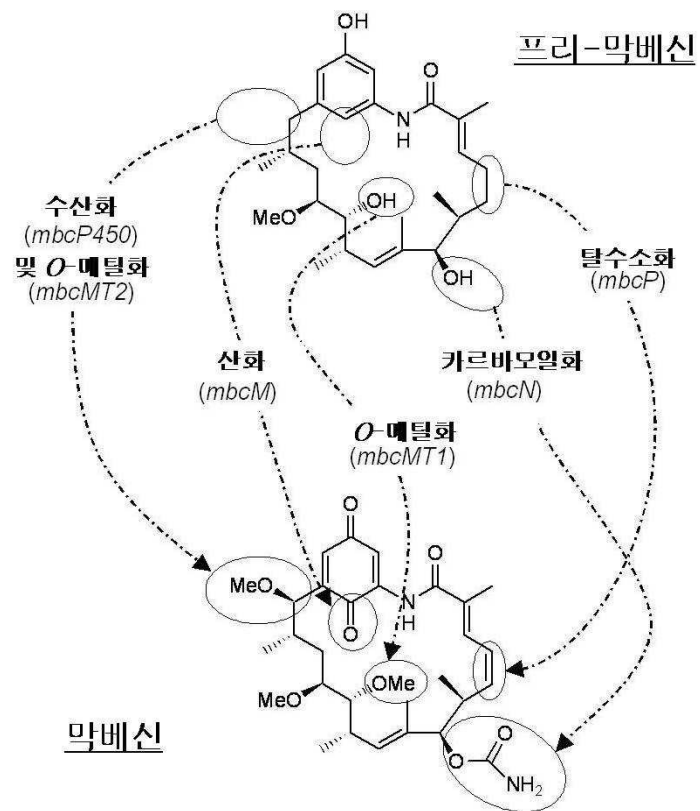
- <193> 도 1: 첫 번째 잠재 효소가 유리된 중간체, 프리(pre)-막베신, 및 막베신에 대한 post-PKS 프로세싱을 보여주는 막베신 생합성을 나타낸 것이다. 도면 내의 PKS 프로세싱 단계의 리스트는 사건의 순서를 대표하는 것은 아니다. 다음 약어는 클러스터 내의 구체적인 유전자를 위해 사용된다: ALO - AHBA 부하영역; ACP - 아실 캐리어 단백질; KS - β -케토아실신타제; AT - 아실 트랜스퍼라제; DH - 탈수소효소; ER - 에노일 환원효소; KR - β -케토환원효소.
- <194> 도 2: 막베신을 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* 결실 단백질을 코딩하고, 161-141bp는 *mbcF*의 3' 말단을 코딩한다.
- <200> B는 단백질의 아미노산 서열을 보여주는 것이다(서열번호 22). 단백질 서열은 도 6A에 나타난 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

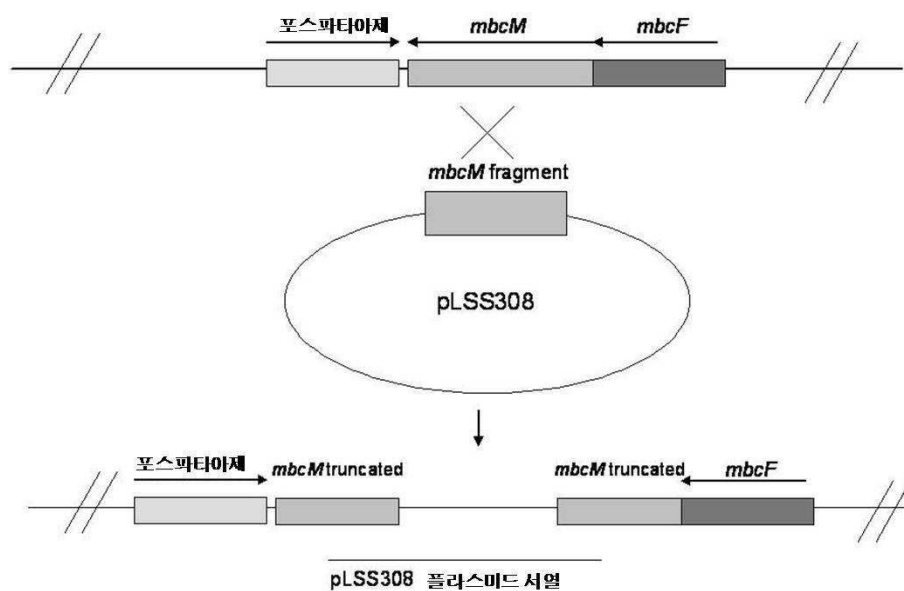
도면1



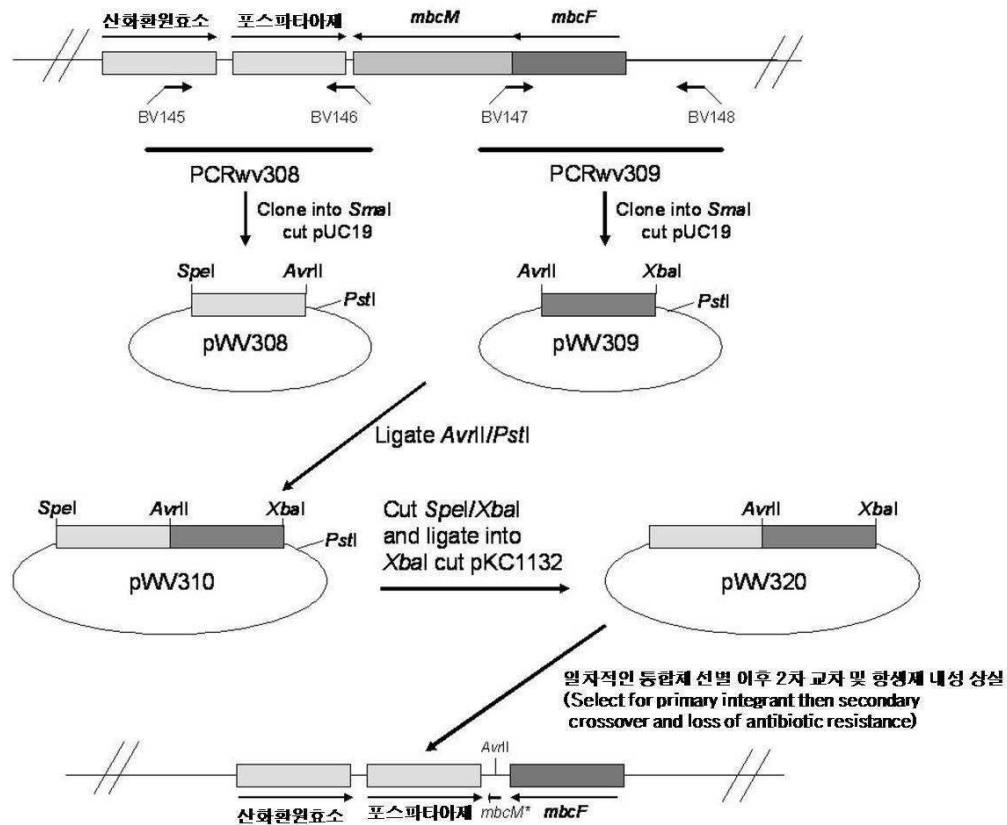
도면2



도면3



도면4



도면5A

```

1 ATATACTAGT CACGTCACCG GCGCGGTGTC CGCGGACTTC GTCAACGACC ACGCGTTCCG
61 GGCCGCCTGG CGCGGCGACG GGGCGCCGGT GGACCCGGTG GTCGGCGACG TGGAGGACAC
121 CGCCAGGGGG TTCTCTCGTCA CCCGGTCGGG GATCTCGATC GGGGTGCGCG CGGCCTGGGC
181 CTCGCACCAG GCGCTGGACA CCACGGTCGT GCGCGTGGAG GGCAGCGGCG GCACGGCGGA
241 GCTGCGCTGC ACCTTCGGCT TCAGCCCGAA CCGCGAGGGC CCGTCGCGGC TCCTGCTCAC
301 CACCGACGGC CGCACCACCC CGGTCGAGCT GCCCGCCGAG CCGGTGGGCG CCGAGTACGA
361 CGCCAGCTC GCGAGCCTGC CCACCCGCT GGCCGACCCC GCCACGCGCG GCGAGGCGGC
421 GTCCGGGGCG CGCTGGATCG CGGGCGCGAT CGAACGGGTC TACCGCGCCG CCGACACCGT
481 GCGGTGCGCC GAACGACGAC ACGCGCCGGT CGACCTCGTC CCGACGGGAG CCCCCTGATG
541 ACCACCGGAC AGACCAACCC CCGAGTCGTG CGGGCCCGAG CCGGGGACGA GCGGGCCGCG
601 ACCGCGGTTC CGGCGCCCGC GGCCCGCGCG CCCCCTCGCC CGCCGACCCC CGCGCCCCAC
661 CGGCACGTCC CCGGCGCGAC CTACGACCGG GCCGTGCTGT TCGACCTCGA CGGGGTGCTG
721 GTCAACAGCT TCGCCGTCAT GCGGCAGGCG TTCGAGATCG CCTACGCCGA GGTCGTGCGC
781 GACGGGCCCC CGCCGTTTCA GGAGTACAAC CGGCACCTGG GGCGGTACTT CCCGGACATC
841 ATGCGGATCA TGGACCTGCC GCTGGAGATG GAGGGTCCGT TCGTCCGCGA GAGCTACCGG
901 CTGGCGGGTG AGGTGGAGGT GTTCGAGGGC GCGCCGAGAG TGCTGGCGGA CCTGCGGCAG
961 CACGGCTTCG GCACCGCGT GTTCACCGGC AAGAGCGGGC CGCGCGCCCG GTCGTGTGCTG
1021 ACCACCTCG GCATGGCGGG GCTGTTTCGAC CATATCATCG GCTCCGACGA GGTCGCGAAC
1081 CCCAAGCCCG CGCCGGACAT GCTCCTGCTG GCCACCGGCC TGCTCGACGT CCCGGCCGAC
1141 CGGGTGGTGA TGGTGGGCGA CGCCCTGACG GACCTGGCCA GCGCCCGCGC CGCGGGCTAC
1201 CCGGCGCTGG CCGCGCTGTG GGGCGAGACG GACGAGGCGG AGCTGCTGGC GGCGAACCCG
1261 GACGCGGTGG TCCGCAAGCC CTCGCAGGTG CTCGACTGGT GCCTGGCCCA CCTCGCCGAC
1321 GACCGGACGT GACGCGCGAG CAGGCCCGCG CGCGGCACGT GCGGGGGCCT GCGGGGCGTC
1381 ACCCAACCG CGCGCGCAGG TCCGCCACCA GCCTAGGATA T

```

도면5B

```

1 ATATCCTAGG CACCACGTCG TGCTCGACCT CGCCCGCCAC GCGCTCACCC CCCGATCATG
61 ATCGACTCGG TGACGCGGGC GAACTCGTCC TTCTTCACGA GCACCCGCGT CGTCTCCACC
121 CCGTCCAGCA CGGTGAAGTA GCGGCGGCCG ATCAGCACGT GGTGCCCGTT CTCCGCGGCC
181 CGACCCCGGA ACGTGGTGCC CGCCAGCACC GAGTCCCGCG CGTAGTCGTC CAGCCCGTCC
241 AACCGCACCG CCTCCAGCC GTCCCGGTCC GCGCGCCCG GCGGAACCG GTACACCGCC
301 TGCCACGCCC CGTCCCTGGG CCTGCGCTCC ACCACGTGCG CGTCCCGCG CTCCACGACC
361 CCGTAGGCGC AGCCGTACTG CTCTGCTCG ACCGCGACA GTCCAGCGG CTCCAGGTAG
421 GACGGGCCGA CGAACCCAC GTCCACCAGC CAGGTCCGCC CGTCCAGCG CACCAGGTG
481 AACGAGTGCT CCTCGTCCG CCCGAACCG TCGTCGGCCA GCCGATCGC CGCCGCGACC
541 ATCAGCACCT CGTAGCCAG CGCGGTGAG AGGGCGTGA AGAGCCGTT GAGCTCGTAG
601 CAGACCCCGC CGTTGCGGCC GGTACACACG TCGCGAACA CACGGGGCAG CGGGATCTCC
661 GCGAGCCCCG GGTTCGCGG CAACCGGTG GCGCGCCGC CGTTGTCGTA GGGCAGGAC
721 ATCAGGTGCC GCTTGTGCAG CGCCGCAAC GACTCCAGC TCGGGCTCG CACGCCGCC
781 TCCACGCCGA TCGCGCGCAG GACTCGGCC ACGTCGATCA TGCTGGTGCT CACCTCTCGT
841 CCGTCGGGTC GGTGGACTGC CTGCGCCTG ATCGCCCTG GCTCGACTG CTGCGCCTG
901 AATGCCCTGC GCGCGCTGC CTGCGCCCG ATTGCCCTGA GCCGATTGC TCGGCGGCCA
961 GTCGCTCGCG CAGCGCTCG GCGCGATCG CGGGCGTCG CTGGTCGAAC AGCAGCGCG
1021 CCGGCAGGCG CAGCCCGGTG GCGGTGTTCA GCCGGTCCG CAGCTGCACG GCCGTCATG
1081 AGTCGAAGCC GATCTGAAG AACCGTCTG CCGGGCCAC CGCGCCCTC TCGCCGTGCC
1141 CGAGCACGGC GCGCGCCAGG TCGCGGACCA GCTCGGTGAG CACGGCCTC TGCTCGTCG
1201 CCGACAGCCC GCGCAGGCG GCGCGAAC CCGCGGGGG CGCGGCCTG CCGGTGGCG
1261 GGGAGAGCGA GCGCCGCGG GCGGGGACG GCGCGCGAG CAGCGCGGG ACCGCCTCGT
1321 CGCGCGCGGA GCGCGCAGC GCGCCAGG CCAGCGCG CAGCACGACC AGCGCGGGG
1381 CGCCGCTGGT GACCGCGCC GCGTCAACA GCGCTAGAA TAT

```

도면6A

```

1      ctgcgcgacgaccggacgtgacgcgcgagcaggccccggcgcggcacgtg
      gagcggtgctggcctgcactgcgcgctcgtccggggccgcgcctgcac

51      cgggggcctgcggggcgtaaccccaaccgcgcgcgcaggtccgccaccag
      ggccccggacgccccgcagtggggttggcgcgcgcgtccaggcgggtggta
      stop

      AvrII
101     cctaggcaccacgtcgtgctcgacctcgcccgccacgcgctcaccctccg
      ggatccgtggtgcagcacgagctggagcgggcggtgcgcgagtggggggc
      start

151     atcatgatcga
      tagtactagct

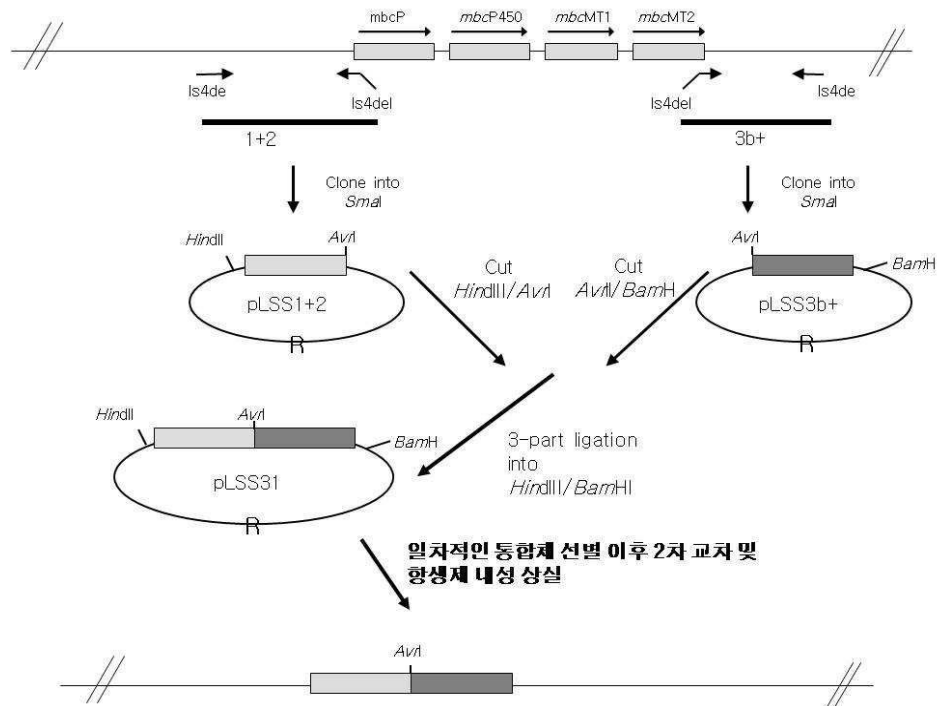
```

도면6B

1 VAGEVEHDVV PRLVADLRAR LG *

22

도면7



도면8

```

1 CCTAGGCGAC TACCCCGCAC TACTACACCG AGCAGGCCTA CGCCTACGGG AACTCCTGGA
61 CATCACCGAC CACACCGTCC AACGCAACTT CCGCGAACTG GCCGATCTGG TAGGCGACGC
121 GAAGGGCCTG CTGTTCCACC CACGCGACCT GGTGGGCGTC CCAGAATTCG GCTGCTTCCT
181 AGCAGTAGCC GAACACCCGT AACCACGCGG TGGCGTCCCC CACGGACGCC ACCGCCTCGC
241 GGGCTGCGGG GCGAGCGCAG CGAGCCCGCG CAGCCCCACT CCGCGTCCC TCTTCTCCGT
301 GTGGCCTGGC GCATGTCAAA TTCCCACTGA CTGCCAACAG ATCATGTGCC GTTTGAGCAG
361 GTCAGCGACT TGTCGCGCTT CGGTGCCTTA AGGCCGAGCT GGGATGGGG CACTGTTTCC
421 GGACTGAGCG GGGCAGCTTG GAAGGTGGAG TTCGGTGAGC AGAGGCAGCA CGTCCCGTCG
481 CACGTAGAGG TGGTTGTACA CGCGGTGGCG GGACCTGCGC AGTAGGCCG TATCCGCAAG
541 CTGCTCCAAG ATCAGGAGTG CGGCGCGGTG CGTATAGCCG AGTTCGGCGG TCAGCATGGT
601 GCTGTTGAGC AGTGGGGCGA CGAGCAGCGG GGCGGGAAGC GCTTTGACCT TCCTCCGCCC
661 GGTGCGCATC GCCCAGGTGG GCGATCGCGC GAGCCTCACG GATCGCGGTC ACCTCATGCA
721 GGCTGGCGCT CAACCTGGAA CGCGCGACTG TTTCTGTCAG ACGTGCCAGG GCGGTGTAGG
781 CGTGCAACAA GGTCTTGCTG GTTTCGGAGC GCAGTCTGAG CCGGGACCAG GACGACAACT
841 CCGCGATCCT CGCGGACGGG GGCGGCCTCG TGTCTTCACC GGTGGTAGTT GACCTGCGCG
901 GGGCGGAGGT GCCCTATTGC TGCCGGGACG AGGTCATCCC CCGGAGCAGT TTCTCAGCAC
961 GCCGTGAATC GAGATCCGGG GCGCTGAGCG CCGTGAACGC CTCGTCCAGC GAGTCGCACG
1021 CGCACGTCGT CCTGACATCG GGCGCGCAT GGCCCGAGGT GGTGAGCGGT GAGCGGGAAG
1081 GCGCGGCAGG GTGTGTGCGA GACACTCCGG GACTCCGTGC AGAAGGTCGA TCAGGCGAAA
1141 GGGTTGAACT GCGAATCGCA AAGCGGCCCG GCCGCAAAGG GGTCGGGCGG CCTGCGACGA
1201 TTGGTCACGC TGCTGCGGCG CGGTCCCGCC GGAAGTGCTT GCCGAGCAGG TCGATCCGCC
1261 CCTTGTGATC TTCTGCCAGC GCCTCCAGAA CCGAGAGCAG TCGTCGGGCG TGCAGTGCAT
1321 GGCCAATACC ATCGTCGCGT ACCCCAGAGG GTGTCGCTCC CGTTCAGGGG CGACCATTTT
1381 CCACGCCCCG TTGGCCTCCT TGGCGGCCCG GCCAAGATCG CCGAGCATCA GGTAGGTGCC
1441 CGACAACCCG ACAACCCTGC CTGCCAACGC GGCTTCCGGC ACCCCGCGCG CCTCGTCGGC
1501 TTCCAACGCC CGAACACCGT GCCACAGCAC GGCCCCGCGG TTGCCCTCGC TCGTCTCCAG
1561 CCATCCCATG ACACCGTGCG CTTCCGCCAG TGACC

```

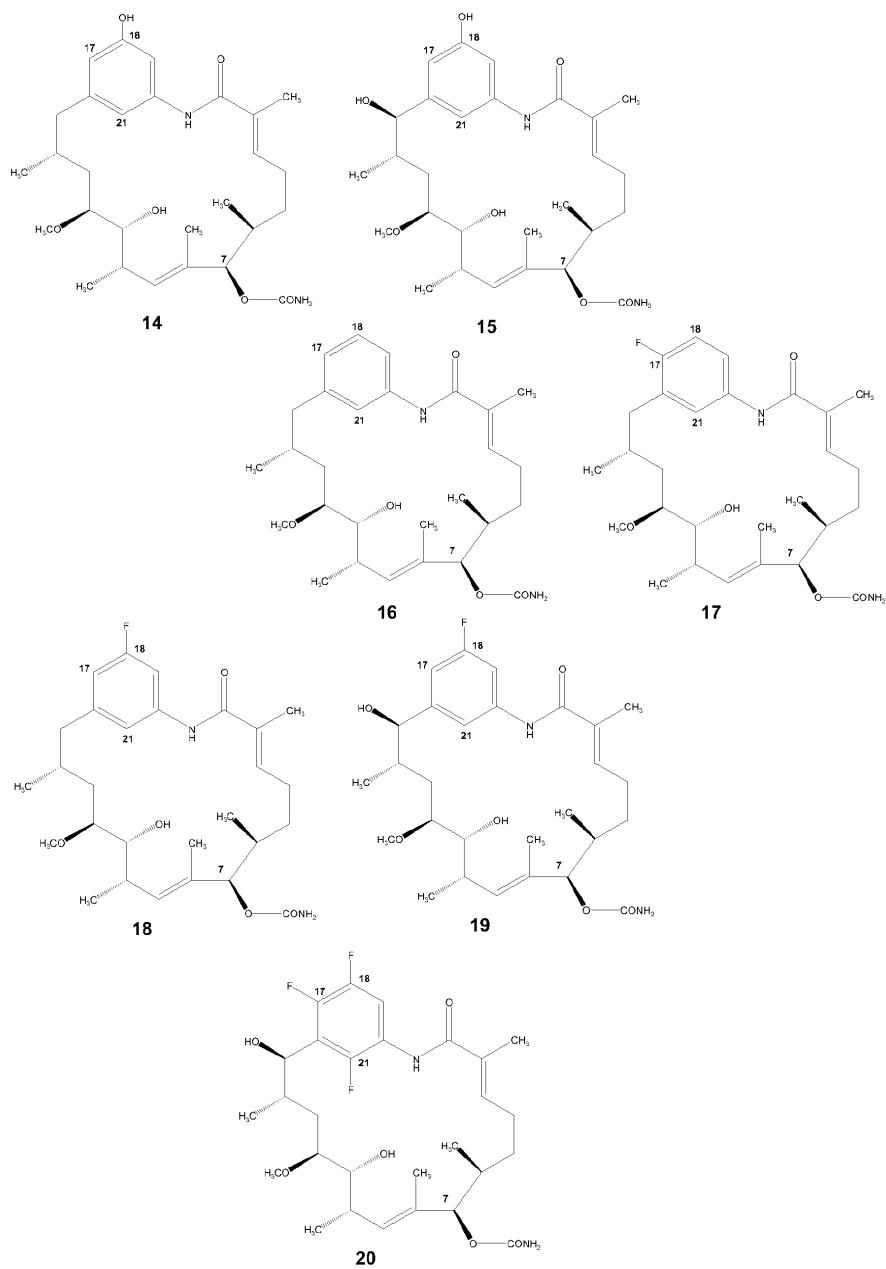
도면9

```

1 GTGTGCGGGC CAGCTCGCCC AGCACGCCCA CGAGGGTCTC CAGCGCGTCC GCGCCGGTGC
61 GCGCGCCCCG GACGACCTCG ACCGTGGGGA TCAGGTACGG CGGGTTCATG AAGTGCGTGC
121 CGATCAGCCG CGCCGGGTCTG GGGACGTGCC CGGCCAGCTC GTCGATCGGG ATCGAGGAGG
181 TGTGAGACAC CAGCGGCACG CGCGGCCCGG TGAGCGCGGC GGCCCCGGCC AGCACCTCGG
241 COTTGACCGG CAGCTCCTCG GTGACCGCCT CCACCACCAG CGAGACGTCC GCGACGTCCG
301 CGAGCGAGGT GGTGGTGAGC AGCTCGCCCC GCTCGCGGTC CTCGGGCAGC GCCCGCATCA
361 GCCTGGCCAT GCGCAGCTGG GCGGCCACCG CCTCCCGCGC CCGCCCGACC TTGGCCCGGT
421 CGGTCTCGAC CAGCACCAAC GGCACGCCGT GCCCGACGGC CAGGGAGGTG ATCCCCAGGC
481 CCATCGTGCC CGCGCCGAGA ACGGCGAGCA CCGTCCTGCC GTCCTGCTCT CCCATCGCGC
541 TCCCCCGCCG CGGCCACCGC GGCCGCCGTC CGGTCCGCGC GCCGTCCCGG CACGCGCATT
601 CCACCCTCGA TCGTGTGCCG GGAAAGGCGC GCCCGACCCC CTGACCTGCC CCCCTGAACC
661 CCCCTCAACG GAACCGGAAA TCGAATGTCC CGAACGCGCC GTCAAATCGT CGATTGACAG
721 CCGCAGAACT GTTCATAGAC TGTGGCGGCA GTACCGATCT CCGAATTCCA CGGAAGAGTC
781 CTCCCCCATG GCTCAGCAGA TCAGCGCCAC CTCGGAAATC CTCGACTACG TCCGCGCGAC
841 CTCGTTGCGC GACGACGACG TGCTCGCCGG TCTGCGGGAG CGGACCGCGG TTCTCCCGGC
901 CGCGTCCGCG CTGCAGGTGG CCCCAGGAGG GGGGCAGCTG CTCGGCCTGC TGGTGCGCCT
961 GGTCGGCGCG CGCTCGGTGC TGGAGGTCCG CACCTACACC GGGTACAGCA CGCTGTGCAT
1021 GGCCCGCGCC CTCCCGCCCG GCGGACGTGT CGTGACCTGC GACGTCGTCG CGAAGTGGCC
1081 GGACATGGGC AGGCCGTTCT GGGAGCGGGC GGGCGTCGCG GACCGCATCG ACGTCCGCGT
1141 CGGCGACGCC CGCGCCACCC TGGCCGGCCT GCACGCCGAG CACGCCGTGT TCGACCTGGT
1201 GTTCATCGAC GCGAACAACT CGGATTACGT CCACTACTAC GAGCGCGCGC TGACGCTGCT
1261 GCGCACCGGC GGCTGGTTCG TCGTGGACAA CACGCTCTTT TTCGGGCGGG TCGCCGATCC
1321 GTCCGCGACC GATCCGGACA CCACGCCCGT GCGCGAGCTG AACGCGCTGC TGCACGCCGA
1381 CGAGCGGGTC GACATGTGCC TGCTGCCGAT CGCGGACGGA ATCACGCTCG CCGTGAAGCG
1441 GTGAACCCGC CCGAATCGCG CCGAATTCCC CCGGAGAGAA AGGCCGCCGC AGTGTTACAC
1501 GAGGACGTGG CCACCGACCT GCCCGCCTAC CCGTTCCTAG G

```

도면10



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Biotica Technology Limited

<120> 18,21-DIDESOXYMACBECIN 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 tcagtgcgcc cgcgtaccgt cgt

33

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 2

ggcatatgct tgtgctcggc ctcaac

26

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 3

ccgccccgcg cgagcggcgc gtggccgcc gagggc

36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 4
gcgtcctcgc gcagccacgc caccagcagc tccagc 36

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

<220>
<223> Primer

<400> 5
ccaacccgc gcgtcccg gccgcgcga acacg 35

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

<220>
<223> Primer

<400> 6
gtcgtcggct acgggccgt ggggcagctg ctgt 34

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

<220>
<223> Primer

<400> 7
gtcgggtggac tgcctgcgc ctgatgcc tgcgc 35

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

<220>

<223> Primer

<400> 8

ggccggtggt gctgcccag gacggggagc tgcgg

35

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 9

caccgtcgc ggggtggcg cggcgacga cgtggctgc

39

<210> 10

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Primer

<400> 10

cctcctcgga cagcgcgac agcgcgcgc acagcgag

38

<210> 11

<211> 100588

<212> DNA

<213> Actinosynnema pretiosum

<400> 11

gatctggggc gacgagccgc ccgccgggccc ggggccggcg ttgcaggcgc tcgtctcccg	60
gctgcggcgg gcgctcggcg cgccggggcg ggtcgcgctg ggggtgggcg ggtaccggt	120
cgtggcggac gtggacgcgg cgcggttcga ggagctggcc gcgcggggcg gggaggacgc	180
gctgcgggag gccgccgcgc tgtggggcgg gcgggtcggg ggcgagccgc cgggtgtcgc	240
ggcgcgtcgc ccgcggtgg cgaccggct ggcgcggtg tcggtggagg tgggtgtgga	300
cctggcggag gtcgagctgg cgctcgggcg caccggggcg gccatcggt gggcgagcgg	360
ggtgtgtggc gagcaccgg cgcacgagcg ggccgccggg gtgtgtgtgg	
acgcgtcgc	420
ggcgcgggga cggcaggccg aggcgtggc ggctacgag cgggtcgcg cggcgtggc	480

cgacgagctg	ggcgccgacc	ccggcacggc	cctgcgcgag	cgccacctgc	ggctgctgcg	540
cgccaccccc	ccaccgtccc	cccggccgaa	cgcgtgccc	gcgcggtga	cgggttcct	600
cggccgggac	gcccacctcg	cccgcgtcgc	cgacctgctg	gcccggggc	ggctggtcac	660
cgtcgtcggg	cccggcgggg	tgggcaagac	ccggctggcc	gtggaggcgc	tgcgccggga	720
ccgggacgcg	ctgctgttgg	acctcgcgcc	ggtcgcccag	ccctcggagg	tcgtcgccgc	780
cgtgctcgcc	gggatcgggc	tgcgcggcga	ccgcgaccgg			
ccgggccccg	acgcgacggc	840				
gctgctggcc	gcccagctgg	cggcgcgag	gtcgggtgctg	ctgctggaca	actgcgagca	900
cctggtcgac	gccgtggccc	acctggctgc	gctcctgttc	ccccgctgcc	ccgagctgcg	960
cgtgctcgcc	accagccggg	aacctctggc	ggtcgacggg	gaggcgtgg	tcccgtggg	1020
gcccgtcgcg	ctgcccggaa	tggggacgg	gcttgacgcc	gcggtcggca	cggcctcgg	1080
gcggttggtc	gcccacggg	cgctggcggt	gcgcccgggt	ttcgccgtcg	acgccacgac	1140
gctgcccggc	gtggtgcgcc	tggctggggc	gctggacggg	ctgccgctgg	cgtggagct	1200
ggccgcccgc	cggttgcgcg	ccctgccgct				
gccccacctg	gtggccgggt	tgtcggcgcg	1260			
gttcgcctg	ctggcggcg	ggaaccgggc	cgcgccgcc	cggcaccgca	cgtgcgcgc	1320
ggtgatcgcg	tggagctggg	acctgctgga	cgggcccag	cgggccgtgg	ccgagcggt	1380
ctcgtgctg	cccggcgggg	taccccggga	gtcggccgcc	gccgtctgcg	cgggcgccgt	1440
gcccccgac	gaggtgccc	aactgctggc	cgcgtggtc	gaccggtcgc	tgctgagcct	1500
ggtcgggggt	cggcgccgga	tgtggagac	ggtgcgcgcg	tacggggtcg	agcgctggc	1560
cgcccgccgg	gacttgagcg	cggctccgca	cctggccgcc	gcgcacgtgg	cgggggtgct	1620
ggcggggcag	gacgcggtgc					
tgcgcgggcc	ggggcagcgc	gcggcgggtg	cggcgatcgg	1680		
cgcggagcac	gacaacgcgg	tggccgcgct	gcaccaccgg	tgcgccaccg	gggacgcgga	1740
cggggcgctc	gcgctggcgc	tgtcgttgg	ctggtactgg	caggtgttcg	gccgccagtc	1800
cgaggcgcg	cactggctcg	ggcgggcgct	ggcggtgccc	ggcgggccgt	ccccgagcg	1860
ggactgcgcg	cgggcgcccc	acctgctcgg	cctggccgac	ggcgggcacg	gggtgggtga	1920
tcgccccggg	gtggggcgcc	tcgcccggac	ggtgctggcg	caccgggggc	tccccggtca	1980
cctgcgggtg	ctcggggcgg	tctgctgtt	cctgctgggg	cgcggcgagg	gggtgttccg	2040
ggagctgggc						
gcgggcggcg	ggtggttgtc	cgggctggcg	cacctgttcc	tggccgagct	2100	
ggcggagaac	gcccggcagc	tggaccgggc	gcgcgggcac	gcggaggtgt	ccctggaccg	2160
gttcggggcg	gcccgggacg	ggtggggcgt	ggcgggggtg	ctgccgtgc	gggcgcgggc	2220
gcggcggtac	gacgacctgg	acgggacgtg	ggcggacctt	cgggaggcgc	gggcgctgga	2280
gggggagttc	ggggcgctga	gccccggtga	ccgggtgcgg	gcggacctgc	ggtgggtcga	2340
cctgcacgag	cggcgcggtg	acagcggggc	ggcgtggag	gtgctggccg	cggcccgtgc	2400
tcggggggag	caggtcgcg	tggtagacgc	gcgggaggcc	gcgtgcggg	tcggtctcg	2460
ggacctgggg	cgggcgggtg	agctgctggc	cggggtgggt	ggggcggtgg	gcgacctggc	2520
gcgggcccgc	tatcggttgg	cctcggggga	cctggcgggt	gcggagcggg	cgttcggcg	2580
ggcgcggtg	gtggcgctg	cgagcgggga	gctgcccgcg	ctggccccgg	tggcggtggg	2640
ggcgcgcgcg	ctggagcagg	cgcggggcg	gtggcgggg	tcgggggtgc	tgctcgggac	2700
ggccgcgcgg	gtgcggggcg	gcgacgaccg	caccgacccc	ctggtgcgcg	agctggtcga	2760
ccggggcgcg	gcggcggtgg	gcgggagcgc	gttcgcgcg	gcgtacgcgc	gggggtggga	2820
ggcggagcgg	gacgtggcgg	cggcgttcgt	gctctgagcg	ccgggatcgg	gcgggcgggg	
2880						
tcaggcgggc	ggggtcatgt	gggcggggtc	aggcgggcca	ggtcacacgt	ccagggaccc	2940
cgcccagtc	gcgatctgcc	ggacttcggc	ctgcgtcggg	aagaccttct	cggtagcac	3000
gcggtgcacc	tcggggtcgc	cgctcaggca	gccgtcggcc	aggacggtga	gctggaagt	3060
caggtcggcg	gcctggcgga	gggtggacag	gaccacgccg	ctggtcgcga	tgccggtgag	3120
caccaggtgg	tcgacgcct	gggcgcgcag	gacgaggtcc	aggtcgctgc	ccgcgaacgc	3180
gctgacgcgg	cgcttggtca	ccaccacctc	gtcgtcagac	ggcgcggtct	cggggtggaa	3240
gtcgttggcg	ccggagcccc	tggggccgc	ggccaggcgg	ccgaacatct		
tgttgcgcgg	3300					
gtggtatctc	gcgtagtccg	ggcggaagcc	gacgccgacg	tggatcacgc	gcacggacgc	3360
ggcgcgggcc	gcctcgagcg	cggtagcgag	cctggggagg	taggccgggt	cggggtagcg	3420
ggcgaccacg	gcgggctgga	cgctccatcac	cagcaggcgg	ggggtgggga	tctcgggcct	3480

cgtttcggtg	gtggcggcgc	gggggccgcc	ggtgggggtc	aggggtgcgg	gggtgccggg	3540
gtgagcaggc	tggtgacggt	gagcaggcgg	tcggcgagtt	cctcggggcg	cagcgggtcc	3600
tcggcgcgca	cgacccagtc	gtggacgac	gcgccggtgc	cgtgggagat	cagcacggcc	3660
aggtcgcggg	cgccccgctc	gtccacctcg	cccaggccgg			
cgcgcagggc	ctcggtggtg	3720				
atgagggtgc	ggaagagctc	ggccagggcc	tccgccagcc	gccacgcgca	ggggccggtg	3780
agcacggcgc	ggtagaaggg	gcggtggtcg	gcgaagtggc	gggccacggc	caggaggcgg	3840
gcgtggcgcg	ggggccgctg	gtcgccagg	tcggcgagga	gctcgcgcg	caccaggtcc	3900
gccgcagcgg	cgacgaggag	cgtgtcgcgg	tcgccgaagt	gctggtagag	cagctgcctg	3960
ctgacgtcgg	cgccctcgcc	caggtcggtc	accgggaccg	cgccccgcg	ctcggcgacc	4020
aggtcgacgg	cgccggccat	gaggcgggcc	ctggagcggg	cgaccggcg	gtcggggcgg	4080
gtggtcacgg	gggtgaaact	agacagttgt				
caataaatga	gcaagtgtcg	tcgaacgcgc	4140			
gcgcgggaat	ctccggtgcg	cggggccccg	ccctggcagc	atgatcacgc	gatgaccgag	4200
gtgaggacgc	gcccgtacgc	cgggccccgc	gacctgcgcg	cgatgcaggg	gttggcgcgg	4260
cggatctgga	cgccgtcgag	ccggtggcac	gtcgccgacc	tggcctggca	gcgcaaccag	4320
cacaccgggc	gcgaggccga	gtggccgacc	gcgctgtggg	aggcgggcgg	cgaggtggtg	4380
gcgtgggggt	ggcccgagct	gccgggtgag	ctggcgctgc	tggtcgaccc	cgcccgcccg	4440
gagcttgcgg	ggcggtgtct	cgactggttc	gcgggcgtgg	ccaccgcgcc	ccggcggtcg	4500
gtcaccgtgc	tggacgccga					
accgcacctg	gtcgccgcgc	tggaggctcg	cggttacgag	4560		
cggctgggcg	ggccgcactt	ccggcactcg	gtgcgcgcgc	tggacgacct	gccgacgcc	4620
gaactgcccg	ccgggtaccg	ggtcgcgcgc	gtcgggggcg	aggaggacgt	ggcggcgcgg	4680
gtcgcggcgc	accggggcgc	ctggtggccg	tcgcgggtca	ccgaggagag	ctaccgggcg	4740
gtgatggggg	cgtggccgta	ccggccgggg	ctggactggg	tggtagaggg	gccggacggg	4800
cggctcgcgg	ccacctgcct	gatctggttc	gacgagcgca	acggcgtggg	cgagctggaa	4860
ccggtcgggg	tcgaccccg	tctgcggcgg	cgcgggctgg	ggcgggcggt	gtgcctggcg	4920
gcgctgggcg						
cgctgcgcga	ggcgggcggg	cgggcggcgg	tgggtgtacc	gctgcacggg	4980	
caccccgacc	acccgcgcgc	cgcccgctg	taccgggggc	tggggttcgc	cgagcacgcc	5040
cgcacgatca	ctttcacgcg	gctggaggcg	cgcggttagc	agcgcccggg	cgggcgagc	5100
ggacccggtc	gacgagcgcc	tcgctgtcg	gagcggtcgt	cccagcgctg	ggacaccagt	5160
gccacgacca	gaccgcgcgc	cgttcgcgt	ggtcggctcg	ggggtcgacc	gcggtgaggc	5220
tctcgccggg	gtgggtgaac	cacgtcctgg	cgatggcctg	caccgcgagc	accgggtgcc	5280
gcccgtggcg	ctggacgtca	ccgacgcagc	cgccgtcgac	cgggccgggc	cgcccgctt	5340
cgccggttgc	gccgcgcgcg	ccgagtcgca	cgccaggtgg	cgcccggtcc	cggggtccgc	5400
ctggaactga	ccccgcgcgc	ctccccgcc	gccgttcggg	cgggcgccg	aacccgcctc	5460
aggcgtgtct	gaccgcgcgc	accgatcccc	ccaccaccac	cgccatcggg	acgtggtgca	5520
cggctcgtcg	gctcgcgtcg	cgccgggggc	gggacaggag	gagttccacg	gccatcgcg	5580
ccaggcggtg	gtcgcgaggg	gcgacggtgg	tcaggcgccg	gcgcatccag	gcggccacgg	5640
ggtggtcgtc	gaagccgacc	acggagacgt	cgtccggcac	ggacaggccc	gcctccgca	5700
gcgcctggca	cgcgccgaac	gccaggcggt	cgttgaagca	cagcagcgcg	cgaggcggt	
5760						
ggtgggacag	gaggtecagg	gtggcgcggt	agccgtttct	cgccatccac	tcacgcacg	5820
ggcgcacgct	ctccacctcc	acccccgcgc	ccggaagggt	ctccagcgcg	ccggagaggc	5880
ggggccacggc	ggcgatgtgg	cgccgggtcga	tcgcctcggc	cgtggggccg	gtgccgatca	5940
ggtgcacgcc	ctcgcggtgc	ccggcggtcga	gcagcacgcg	cgcccgcgaa	cgcccgccgc	6000
cgcggtcgtc	ggggagcacg	gcgtcgcgcg	ggaagtcgtt	ggcgggcagc	acgttcagca	6060
gcacggacgg	cccgtcgcgc	agcccgctcg	ggacctccag	cagccggggg	aacctggccg	6120
cgaagaccac	gccttcacc	tggcgggcgc	gcagcgaggc	caccagcgcc		
gcctccacct	6180					
cgcggtcgcc	gccgtctca	ccggcgaaaca	gggtgaaccc	gtgccggtgg	gcggcgccga	6240
ccgcgccctc	gatcagctca	ccggacagct	tggccgaggc	cacggcgtcc	gagacgaaac	6300
cgagggtctt	ggtcggggag	gcggacagca	gcgtgtcgcg	gcggtagccg	agctgctcgg	6360
ccgtcgcccc	caccttgcgc	tccaccgcgc	ccgagatgcg	cagctcccga	gcgcggccgg	6420
agagcaccag	ggaggcggtg	ggcaccgaca	cgcgcgaggc	ggacgcgacg	tcggccagcg	6480

tgacgcgcgt ccgcccgcctc tcgcggacac ctgctcgcgg ggggtgtgcc gtcacccgtg 6540
 cctcccgta ccggtcgcgc gacagccccg cgcgaggtcc
 taccatcg tgcaggccgc 6600
 gccgttcaag gagaaccccc aaggtggggc cgcgtccccg ccgtgggtga cctggtagcc 6660
 gatgtgact ttgccaccgg gtgggatcgc cgcgtttag cccgcgtcgc gggcggtcac 6720
 ccggccccgag ctgggcgcgt acgaggcgtt ccagccggag gtgacacct ggccccgggg 6780
 cagcgcgaac tccagcgacc agccctgcac ctgctgtgtc ccggtgttgg tgatggcgag 6840
 ctccgcgtc aggcgttgc cccaggcgtt gacggtggcc gacacccggc agggccccgg 6900
 ctgcggttc ccgggcgtgg tgggtgtgtg ggtggtgtgt gtcgtgtgtc tgggtgtgtc 6960
 ggtcgggtcg gggccggttc cggcgaactg
 ggtgaagaac cgccaggtct cctcgggcgc 7020
 ccacgtcctg gtcccgctgt gcgccggcgc gttgtcctgc ggtgcggcga tgtggccctc 7080
 gtcgaacgcg acccagcgca ccgggtagcc gtgcggcgag ccggtgtagg tgggtccccg 7140
 gtgggtcagg ctgccctggg acggttccgg cgggttctgc gcggcgagc cgttgttgcg 7200
 cacgaaccgg tcgcgcacg agcggccgcc ggagatgtt aggacgtgt cgcgcaggcc 7260
 gtggatgccg aggtaggcga tgggtgtcgt gccgccggcg cagccgtga gcacggccgc 7320
 cgcatgacc gcgaccgcgc ggaacaccgt cggccgcgag caggccaccg agtaggacat 7380
 cgcgccggcg tagctgaagc
 ccgtggcgaa ccgtgggtg gtgtccacgc acagccggc 7440
 gtcgagctgg cggacatgt cgtcgacgag ggtgatgtcc tcgcgcgcgt tgttgccca 7500
 gccgttgttg aagccctcgc gcgccacgaa gatcgtgtc ctgcccgca ggcgttgag 7560
 gccgtagtag gaccagacgt cccgtgcac ggtctggccg gtggcgacgt cgttcgcggt 7620
 gccgtgagc cagtggaaag cgaagacgac gcgggtggggg ccgttccggt cgtagccgtc 7680
 cgggatgcac aggatgtagg tgcgggactt gccgtgtctg gtgatcgtgc gcgtgccgt 7740
 ggtgagcgcg ggcgccttgc cgcagccctc cgtcgtggcg gacgcgccgg gggcgccgga 7800
 cgcgccgggc
 gctccggtcg cgtgggtgt gatcagcccc gcggcgaggg tgagcagcgc 7860
 gatgcccgct gccgcgagga ccctgttgcg cccaaggga ttccgcttc ctgtggtgtg 7920
 tccgttgggt gtggtcacgg ggtggtgagg tcgaagcggc gggcgggtgac ggagccgccg 7980
 agcgcggcgg tggcgtgtgt gaagacggcg aagcggtagc ccatgaagaa ccgccagtgc 8040
 ttcttgagcg tgaacgcggc gccgaaggcg gtgaagtga cgcctcgggt gctgtaggag 8100
 aaccgggcct gcctgccgtt gccggggcgg atgtcggcgt tggcgcgcaa ccagatccgg 8160
 gagccgcccc ggtcggcgct cgcgacctcg tagccggttc ccgtggtgtc ccaggagccg 8220
 tccatggtca ggccggtgac ggagacgatc cggttgcggc cgttgtcgcg cttgacgccg 8280
 atccacgccg aggagtcgcg cagcacggcc agcccggtgc ggtcgccgtc gcgcatcccc 8340
 gacaggtcca gtccacggt gccggtggag gtggggccct ggatcggtg ggtgagggtg 8400
 ttgcggcgag agtacaggtc gttgtgtgac gtgcgggtgg acagcgcaag gccgttgttc 8460
 acgtgtact tggcgtgtc cgggttgttg ttccactccc actcggggcc gagcgcggcg 8520
 ccggagaagg tgtcgccgcc gatcatgggt ttgacctggc gcggggcgcc gggcaggttc 8580
 ggcttcgggt aggtcgccgc ccagccgccg ttgacggtgg tgacgcgcgg ccagccgtcc
 8640
 gaggtccagg tgatcggggc gagcaccggc acgcgccgc cggggtaggc gtcgacgaac 8700
 gccaggtagt gccagtgcg gttctgggtc tgcaccaggc cgcctgtgtg cggcactccc 8760
 ccgccctgga tcggcgaggg caggtcgagc agcacctgct ggatcgagta cgggcggaac 8820
 gggctggacg acttgagcac gtactggccg ttgcggggcc tggtagcca gatgtagtag 8880
 ttgccgccgc gctttagaa gcgcgccct tcgagggtgc cgtgttcca gggggtctgg 8940
 aacacctgct gggagcgacc ctccgacttc ccgtcggcgg agagctgggc gacgtgatg 9000
 ctggtgttgc cgtaggcgac gtacagggtg tcgtcgtcgt ccacgagcat
 cccggcgtcg 9060
 tagtagcact tgttgatgtt ggtgtgtgtt gacctggc cgtcgacggc ggtcgcggtg 9120
 tacaggtgcg tctggcgaa gtgcagcgag ccgccccagt agaaggtgcg gttgtctttg 9180
 ccgtgccccg ggaacgacgc ccagatgccg ttgacgtacg cgcgggagcc gttgcccatg 9240
 tcgtacttgg cccgaagtc caggcgtggc acggagtgc cggcgaactc ccagttgacc 9300
 aggtcgtagg agcgcagcac gggcgccgc ggcgagtagt gcatggtgga ggccagtag 9360
 tagtaggtgt cgtccacgcg caggacgtcg atgtcggcga agtctgcca cagcacgggg 9420
 ttggttagg tccggccgc gcgggcccgg tgggtgtgtg

tggcggtcag gctcggccg 9480
 acgaggccga gcacggccag ggcgatgggc gcccatcggc gttgacgggg catcggtgtg 9540
 cctctcctgg tgtccggag tttgctctgg gcgcggcggc ggtggacttg tggggcgcg 9600
 cgggtggtcgt gggggtcagc agggggagt ggctgggtc agcaggccca gccgccaggg 9660
 caggcggttg tagtcgccg acgctgtggg gtccaggccc tggtagaggt agctcagctt 9720
 gcagggggtg atctccatgg tctggctggg cccgctgcgc accagctcgc cgtggctgat 9780
 gtccgcgctc cactggccac cggggaacgt ggtgtgtgtg gccctggcga acgggttcga 9840
 ctgctgtcgc gccagcgcg tccacggtcc
 ggcatcgcc gggcggttc aggagcgga 9900
 ccagcgggcg cgtccgagc cgatcgctc gtggagcatc agccactggt tcttgccggc 9960
 gacctgttag atgtggagc cctcgaacaa ccggttgagg ttgtgtctc gcatggcgat 10020
 cagggtgttg gtgaagccgt tggggaactg ggcgaggtg gtctccgagc ggtacaggtg 10080
 gccgtgtcgc tccgaggaga acaggtggca ctggccgtg tcgcagacgg tccagaagtc 10140
 gacccagtag ccgttgccga tgtgtgtccc gatgatctgc ggcatcccgt tggcgtagaa 10200
 gtctcctggc gcggaccagg acgcgggggt ctcgatgtcg gcggtcgtcg agtacgaggc 10260
 gttggaccgg gtctggtaca
 ccaggtacca caggcgttgc ggggcgaagt agaacacctg 10320
 cggcgcgccc cgttagcccc tgccgatccc ggagcggtcc aggtagtgtg gcggggcgga 10380
 gcgcggcctg gaccagtcgg tgaagctggt gtgcacgagg ttgtagccgt tgggtgtagac 10440
 cgaggcgaac acgtggtagc ggccgttgtg gcgcaccacg ctgggggtcct tgacggagac 10500
 cgtggcgctg gaggagtcgg gcttgggtcc gatcagcgcg ccgctggagg accaccgga 10560
 gctgctcggc agcgagccgc ccggttgtcg cggggtcgtg gtggtggcg gcgtggtcgg 10620
 gggcggtggt gtctggggc cgactcctcc cgtgcacgtg gtcccgttga ggctgaacga 10680
 ggtcgggtcg
 ggggttgacc cgtggaggt gcggtgaac ccgaactcga gcgggcccc 10740
 ggtggggatg gcggcgttgt aggaggcgtt gcgggcgctc acctggccgc cggactggga 10800
 cacctcgcg ttcaggcct gcgcgacctg ctggcccgag ccgtaggtcc aggtgagcgt 10860
 ccagccgtcg acggcgtcac cgaggttgtg gatggcgacg ctgcggtga aaccgccctg 10920
 cactgggag gtgcgcgct aggcgatcga gcacccggc gccgcggcg cctgggggtg 10980
 gagggcgcg agcgcgcca ccatggcgag cgaggtggtg gccatggcg cgtccgggc 11040
 ccggcgcggg gtgaacagc ttgcgaggag catggtcgcc cttcgtcgtc gtgcaggggt 11100
 ggtcggcgcg gccgaccggg agcggcggga gcgggctggt actccccac ttcctgcaat 11160
 ctaccaggt ggcacagggt ggtcaaagct aaaaaggcg gacgcggttt agcttcagc 11220
 gcaaagggtt cgcgcttct ttcggccggg ggcaggtgg atcggggcg gctcggggcg 11280
 aggacggggc tgggaatggg gcgggggatg gggcgggctc gggcgggggg tcgccggag 11340
 cccgccacgg gtacaggcg cacgcggacg acggtgaacg ggaggttcgg ctcgcgatc 11400
 tggtagtgga agttgaccac cagcaggtcg tcgccgtcga aggtcgcgtt ggacgggacg 11460
 tccatgcccc tgccgttgac ccgccgcagc accgtggcg gcgagtggtc ctgctcagc
 11520
 cgcaggacgc tgatctcgcc ctccgggtgg aacaggctgg tgacgtgta gaggtcgttg 11580
 ccgcgcagga gcagccgctc cgagccgatg tccccacgc cggccaggtc gatcggggtg 11640
 acggcgccgg tgcgggtgct gatcggtgg aacgcctggg agttggtgtc ggcgagcagc 11700
 acgtggcggc cgtccggggt gaccacgagg ccgttgccgt tgatgccctc ctgtagcgc 11760
 accggggagt cggcgaggtc cacgaacgtc ctcagtggtt ggtcgacctc ggggctcgc 11820
 agctggcgcg cgtgatccg gttagggacg gggcggaacg agtcgctgac gtaggcgtcg 11880
 ccgttcgggg cgatggcgac gtctgtgacc aggcctcgc gggcgccgga
 gtcgaacacg 11940
 tgcaggagcg gcgggtgcg ggtgctgtgg acgaagacct tgccggtggc gccgcccgcg 12000
 atgaccagcc tgctcgggt gatcttcatg ccgacggcgg tggcgcgcc gtgctgaccg 12060
 gcgggcagga acggctccag ggcggggcg tgcacgtggc gcgcggagat cgtgccgtcg 12120
 gtcgtgccgc cgacgtagaa gtgcggcggt cccggtcgc ggacgatgcc ctccggtag 12180
 gcgcggtcgc cggggaccac gtacgggtg acggggtggt gcgcggcggc ggcgggtggc 12240
 acggcgcgcg cgggtggcg ggcggcgcg ggtggcgcg gcgcggggag ggctggggcg 12300
 agcgcggtga ggagcagggt gcggtgagg agggctcggg
 tgggtggtcac ggaagggtc 12360
 cgggggtcga aggggtgtct ggcgccagac aagcgcttcg tggcggggg tggcagtggt 12420

cgcttgtcgg gggtagtctt tccccccct tccgggcccgg gcggccgact aggggtgagcg 12480
gtgtgggcca tcttgggccc cacccggtgg cgaaccgctc cgacgtgcgg gacttcctgg 12540
tcagcaggcg cgcgagggtg agtcgggggc gggccgggct gcccgctgcg gggcggcggc 12600
gggtgccggg gttgcggcgg gaggaggtcg cgtgctcgc cggggtcagc gtggactggt 12660
acaccgctt ggagaagggg cacatcggcg gtgtctcgcg ggaggtgctc gacgccgtgg 12720
ccggggtgct gcggctcgac gccgaggagc
gggtctacct gttcgacctg gcgcgcgcgg 12780
cccggcgctc ccgcgccgc gaggtggcgg cggaggccgc gctgcccgcg acggcgagcgt 12840
ggctgctgga cagcatgacg ctgtcgtcgg cgtggtgac cggcgggcgg caggacgtgc 12900
tggcggtcaa cccgctggcc cgcgcgctct acgcgccgct gttcgccagc gccaccacgc 12960
gggacggcgg ccggcgcaac ctgcgccgct accacttctt cgacgcgggc gcccgcgagcgt 13020
tctacgggga ctggcggggc accgccgacg tgcctcgtcg cgcgctgcgc gccgaggccg 13080
ggcgcgaccc gcgcgacggg gccaccgcg agctggtggg cgagctgacg gcccgagaca 13140
ccgagttccg gcgcgggtgg
agcgcgacg acgtgctgct gcaccgcgc ggcccaaga 13200
ccttccggca ccccgaggcg ggtgagctga gcctgagcta ccactcggtg gacctgccga 13260
tctccgccac cgagaccgg cagctgtcgc cgtgcaccgc cgaaccggc tcgaccgacg 13320
aggcgaggct gcgcgcgctc gtcgggtgag ccgggggtgg ccggccaccg ccgtcgcgct 13380
cgcgcgggcg gggcggggcc gccggtcaga gcgtgagcgc catcccgatc gagccggcg 13440
cggtctcggt gaagccgtgc ttgaggtaca gcggcgggcc gggcgcgctc gccaggaggg 13500
tcacgaacgc gccggcgggg gcggcctcgc ggatgcgccg gagcagcgcg tccatgatcg 13560
cgccgccgac
gccccctccc tgggtggtcgg gcagcacggc catgtcgacg acgtggaagt 13620
accagccgcc gtgcgccagg acccgggcca tgccgacggt cccgccgtcc gctgctgta 13680
cgtggaagga gggccaggcg ccgggcaggg cggcgggcgc ctgctcggcg gcttggggcg 13740
acaggccgga ctgcgcgcg aggcggaggt agtcggcgac ggacggcggg gtcgggtgga 13800
gctcgtatgc ccggtgcacg cggtcaggct cccacgggcg cggcggggcc cccgcccgac 13860
ctgacgattt ccccgctggc ggggatgcgg gcggcgctc gcggattttc gacatcccc 13920
ggccccgcga gacgcggcgg cggcgctgaa aagagcgccg tcgcgccctc tcgccccgc 13980
cccgacatcc cccgcgcggc gaccggtcaa tgcggtcac gcctgggggt ttccctcca 14040
cgtcgaaac cgccaccacg cgcccacgcg ccgctcgac caccgccgac ccgaggaaac 14100
cctgttcacg ggcacgggaa gccgcagcgg agggggaacc gggaatggcc gcaggcgatc 14160
gcggcacgac gtccgcacat caccgcgagc agaatcgca ggcttcacc gggcgggcgg 14220
aggaagattc cagcgcctt ctggaagaac ctgcgggaag ccctggaaga aaaccggac 14280
ccgaaacgcg aaaaattgc ggacaccac ccgtgaaaca ccggcgccc ccaccaggctc 14340
accgctgac atcacgtca gtacgtatcg gcacgtccc ccgccgaggc ggagcgcgac
14400
accccgcca accgggcacc gagcgggcac ctccactcgg ccagcaccg cccaagatc 14460
gcacgtagca cgggttgaaa ccgctcaagc gcatctcaac ccgttcggag cagagtggcg 14520
cccgctacgt ccgaccggt caggtttggc aacgggtcca gtccacgca ggtggcatca 14580
agcgacttg cccgatcac accgccccgt gcaaccgaat gcagcaggga tatctttccc 14640
gagaactcgg ccgttaaccg ggagtggagc caggccacc cctaagacgc ttgccacat 14700
gccaacaat ggtgaagatg gaacggcgga ccgaccgcg aacgcgaacc gaactccgcg 14760
agagggcacg gtgaacgatc ctggaacagc tactgcccg tagctcaagg
gtggaacgcc 14820
cggtcgcgc gggcgagg gaataacggc ttttacgccc tcgacaacag cttgtcaacg 14880
aaaccgtgc acccgagcgg tcccgcgcg caccgctcgc gggggtggcg cggcgcacga 14940
cgtggctgcc cggcgtcgac gacgacgcga gttccccgac gcccgcgaa ggcggtcgcg 15000
gatcgccacg acggggcacc cggaccacgc ctccccgga acagcgcgcc cagcgcggt 15060
tccggcgcg gcggggaccg ccgacccgc cggagcgccg ccaccggcg gggccggtcc 15120
ccgggaccg ggtcgcttc cggaccacca ctccacggac cagggaagg accactcccc 15180
cagtggagct tctgcgcga cccgagatcc agtcggcgt
cgagcacctc gcggtggacc 15240
tgccggaccg ggcgggacgg gcgttcctgg tggacggacc gcccgctgc ggcaagacga 15300
cggcctcgc ggggctcgtc gaccggatcg cccagagga ccactcgtc ctaccgcca 15360
cctgcacccc gccggagacg gagctgccgt tcggggtgct caagcagctc ctgcctccc 15420

ccggcatggc cagggtcgac ccgcgcctgg tcgccgacct cggcgagctg ctgcgccggg 15480
ccccgccgc cgcgcgacgc tcggcgctcc tcgagctgta ccaactcgctg tcgcggcgcg 15540
tgatcgcgct gtccgaggag gtgccgctgg tcatcgcggt ggacgacgtc cgccacggcg 15600
acaccgcctc gctgcacgtg ctgctgcagc
tggtgcaccg gctggacacg gcgcgggtgc 15660
ggctgctgct caccgacgac ctgctgctgc cggtagctt cccgccgctg cgctacgagc 15720
tgctgcgctt gcgcgggctc ggctgggtcc gggtcgcgcc gctgcctgcg gccagggtgc 15780
gggaggaggc ggtgcggcg gtccgcgcgg acgtcgcgaa gcgggtcgac ttcgcgcgc 15840
tgaccggcgg caaccgctg ctgctgcacg cgtggcggt ggacgtgctg gaggcgggcg 15900
agccgcgcga gatcggttac ggcaactcgt tctgtcctg cctgcaccgc aacgaacccc 15960
tgttcttgga caccgtgcgg gcgtggcggt tgctggcggt cggctcgcg tcggacctgg 16020
gcaggctgtc cgggcacgag
ccggagcagg tcgccagggt gctgaacgcc ctgcgggagt 16080
cggggtgctt ggccgaggac gggttcggc acgacgcggc gcgccgcgcg gtcgtcgcg 16140
acaccccggt cgcgcgacg gaggtgctgc accgccgcgc cgcgcggctg ctgcgcgacc 16200
aggcgggcg ggtaccgac atcgccgacc acctgctgcg ggccggccgc atcaccgacc 16260
cgtggcgggc ggacctgctg gtggacgcgg cggagctggt ggtgcagcgc ggcgagccga 16320
cggcgcggtt ggcgctgctc cagcgcgcgc tcgactgcag cccggaccgg gagcgaggga 16380
cggccgtgca ggcgcggctg gccacggcgg agtggctggt gaaccctcg acctcgcaa 16440
ggcaccacac
cgcgctgctg gcggcgcttc acgcgggcag gttgtcggtg cgcgacagcg 16500
cgacgtgat gaagcacctg cgctgggccc ggaacaccgc cgactcggac gcggtgctcg 16560
cccggtgctg gaccgaccg cgccgcgcgg aggacgtgcc ggtgctggag cactggctga 16620
ccagcaccta cccggcgcg gcccgccca ggacctgctt gggcggggac gtggactcgg 16680
cgcgcagcag ggcggacctg gtgcccaggg cgaacgcggt gctgctggac gtgctggtgg 16740
ccggggacag cgacgacgtg gccgaccggg cggaggcggt gctgcgggag ctgcgctgg 16800
cgccgggagtc cgggtgctac ggcggtgctg ccgtgctggc gctgtccgcg ctgctctact 16860

cggaccgcgc ggacctggcc gcctcgtggt gcgagcagct gctgtcggcg cgggccgtgc 16920
cgctgctgcc gatgccgcgc gcgcagggtgc tggcgctggc ggccgagtcg gcgctgcgc 16980
ggggcgacca cccgagcgcg gacgagctgg cgcgggaggc gctgacctg gtgtcccgga 17040
ccgctgtggg ggtgtcggtg gggctgccgc tagcaccag ggtgctggcg ctgaccagga 17100
tgggcgcta cgacgaggcg cgcgcgtgg tggcgagcc ggtgccgaac gggatgttcg 17160
ggcaccgcaa cagcgtggac tacctgtacg cgcgcgggca ctcttctctg gcgcgggaac 17220
ggccgcgcgc ggcgctgggc gacttcctgc tgtgcgggga gcagctgacc cgggtggggc
17280
tgggcagcgg gtgcgcgcgc gtgccgtggc ggaccgcggc ggccgaggcg tggctggcg 17340
agggcaaccg ggaccaggcg cgggtgctga tccacgagca gctcggcagg ccgggcacgg 17400
acagccgcgc ggcgcgcggg caggcgctgc ggctgctcg gcgcgaccag tcggtgaagc 17460
ggcaccgcga gctgctgcgg gaggcggtgg cgggtgttca ggccgtcgac gacaagtacg 17520
agctggcgcg gaccctgcgc gacctgggga ggcgcgagcg ggcgctgggc gagaacaagc 17580
tggcgcgccg ggtgatccgg cgggggtggc acgtcgcccg gatgtgcgag gcggcgccgc 17640
tgtgcgagga gctgatccc accgccgacg ggctggtgcc cgcgcagccc
gcgtcggcgg 17700
cccgaggtc ggacctggac cggttgacca gctcggagca cgggtggcc gcgctcgcg 17760
cgtcggggt gacgaaccgg gagatcgcg tgaagctgta cgtcacgcac agcacggtgg 17820
agcagcacct gacgcgggtg ttccgcaagc tcgggatcaa gcagcgggag cagctgccgc 17880
cggagctgag cgtcgaccgg tcgaagtac gcggacgggg cggctcccgt gatctggggc 17940
cgccccgtcc ggtcccggtc cgtccggtcc cgcctgtcc ggtcccgcc tgtccggtcc 18000
cgccccgtcc ggtcccggtc cgcctcaggc tcggggcatc gcggccaggg tggtagcgac 18060
gacgtgctcg tcgacgtcgc gcaccagctc ggcgcgcgc
gggcccgtca gcacgaacgc 18120
caggccgcgc gtggacttct tgtcggcg catgaaccgc agcagctcgt cgtccggcac 18180
gcccggcggc agcgcgacgc gcagccgta gcccgcgacc acggagtgtt gctcgccac 18240
ccggtccggg ccgatccgc gcagcgcc cgcgaggcgg ccggcgaaga ccgtgccgat 18300
cgcgacgccc tcgctgtcc gcaccgcgaa accggtggcg agctccagg cgtggccgag 18360
ggtgtggcgg tagttgagg tgtgccgag gccggagtgc cgctcgtcgg cggccacgac 18420

gcgggccccttg agggcgacgc tcgcccacac ctggtccagc agcggcagcc ggtccaggcc 18480
 cggcgccgccc atgaagtggc agcgggcat

ctcgccgagg ccgttgcgca gctcgcgtc 18540

gggcagggtg gcgagcaggt cgaggtcgca cagcacggcg gcgggctgcc agtaggcgcc 18600
 gacgaggttc ttgccctcgg ggaggttgac cgcgctcttg ccgccgacgc tcgctcgac 18660
 ctgggcccagc agcaggttcg gcacgtgcac caccggggtg ccccggtggt agagcgaggc 18720
 ggcgaggccg accgctcgg tgggtggtgcc gccgccgag gagacgacga cgtcgccgcg 18780
 ggtcaggccg aactcggcga accgctgca caggtggcg acggtggcga gggtcttgtc 18840
 gtgctcgccg tcgcccggcg ggagacgag ggaggggacg cggggtcgg gcgtctggtc 18900
 cgccgggccc gcggtgacca

cgacggcgcg gcgcgcgccc agggcccgcga cgacgtccgg 18960

gagggcgggc cgcacgcctg gtccgatgtg gacggttag gcgcgtcgc ccagctcgac 19020
 ccggacctcg cgggtggtgg cggcggtggg ggccgggtgg gtggagctgg gactgcttc 19080
 ctctcggtt ggccgggacg gggggcgatc gggggacgcg gaggggtgac gggaaagcaa 19140
 tcgggcagga atgggaacgg gtccgggggc gaacgggcag gaattcgaat gggggcaagc 19200
 gaccgggagc gatccagtg gtggggcgga agtgcggcg gcgaaaggc ggtcgtgctg 19260
 cctcagccgc cggccgccc gcccgctcac agcgtggtgc gcagggtgag cgccgcccgc 19320
 gccgccacgg

ccgcgccgac gccgaggcgg ttgtgggtca gggtgcctg ctgaaacgc 19380

accggcaggc ccggggcgcg gcggtccgcg gcggcgcgca gctgctccag gtagcggcg 19440
 cagcgcccc cggagccgac cagcgcccc cggggcgcg cccctgcgc ggcgacggcg 19500
 gcctcggtgc gctcgaccgg gcggagcgcc ctgctccagc tctgccagca gtggaacagg 19560
 aacgcgggccc tgcccggttc cggggccagc gcgaccagtt cggccagggt gtgcagcacc 19620
 gtggcctgcg cggccgactc gccagggtcc tcggccaca cgggctcac caccgacgcg 19680
 acgtccaggc ccagttcgct ggacgcggtc gcgaccagcg gctcgaccgg cccgcccggc 19740

aggcccccac ccggcaggcc ctcgcccgcg gggtcgacgc gcaggtcgcg ggccgcccgc 19800
 tcggcgacac gcacggcgag caccgggccc cgcgcggcct cgggtcggtc cagccacagc 19860
 gccaccaccc ccgcccgcg caggaaacgc cagtgcgcgc cccggtccc cgcgcgcagc 19920
 tcccgcagca cggggggcag cactcggcc accgagcggg ctccaccgcg tgccagcgac 19980
 cagcccagac aggacggggc gcccccgcg gggggtccgc cgaggggccc tctcgcgga 20040
 ccggtccgcg tcatgtccac caccacttc gccttggcga gaacgggtcc tcggggatca 20100
 ccgcgtgtt ccgacggccc cgacaatagc gacgcgaat acgccgaatt caccgcaaa

20160

tcaggtcagg ggggttgagg gggatgcctt agggggcgag tgcccgaaa gcggaagaag 20220
 aatcggaagc acatgcagga gcgacttcca agctcaggcc gcaggaccgg gtccgcgtcg 20280
 tcgcgacac cccggtcctg cgcgtgcgcg caccgaagga cgtggtgaca tgcttcggac 20340
 cgacgtgatc cggccggttc ccgaactgct cggggccaac gcggtcgct tcggcgacag 20400
 gaccgcctac tcggacggtc gccgttcggt cgggcacgcc gggctggaac ggcgacgcg 20460
 ccgctcgcc ggtcacctcg ggcagttcg gctgcacccc ggcgaccgcg cgatgatctg 20520
 cctgggaaat cgcgtcgaat tgatcgagag ctatttcggc gtgctccgcg

cggacgccgt 20580

ggcgggtccc gtgaaccgc gtccaccga cgcggagctg acccacctgc tcgcccagac 20640
 cggggcccgg ctggtgatca ccgacgggc gcgcgcgag cgggtcgacc ggttgcgcgc 20700
 cgagcgggtc ggcgacctga ccgtgatgc caccaggac ggcccgtgc ccgacggcgt 20760
 catcggttc gagccgtgg ccgcccagga gccggagctg cccgcgcgcg acgggctcgg 20820
 gctcgacgac gtggcctgga tgctctacac ctccggcacg accgggcgcc ccaaggcgt 20880
 gctgtccagc cagcgagct gcctgtggtc ggtggccgcc tgctacgtgc cgggtccgga 20940
 cctgcgcgcc gaggaccgcg tgctgtggcc gctgccgctg

ttccacagc tgtcgacat 21000

cacctgcctg ctggccgcca cggccgtggg cgcgaccag cgcacgtgg acggcacgtc 21060
 cgcgcaggac gtgctcgcg gcgtggagca ggagcggtcg acgttctgg cggcggtgcc 21120
 gacgtgtac cggtaacctg tcgacggcg ccgagcgcg gggttaccg ccccgacct 21180
 gccgggtggc ctggtcggcg gggcggtgac gacggcgag ctgctgcgcg cgttcgagga 21240
 cagttcggc gtcccgctga tcgacgcta cggcagcacc gagacgtgcg gggcgatcgc 21300
 ggtgaactgg ccgacgggg gcgcgtggc gggctcgtgc gggctgccgg tgccggggct 21360
 gacggtgcgg ctggtggacc cggagacgt

gctggacgtg cccgccgggc gggagggcga 21420
gttctgggtg tgggggcga gctgatgct gggctaccac aaccagcccg aggcgacggc 21480
cgaggtgctg cgggacggct ggtaccgcac gggcgacctg gggcggcgcg acgagccgg 21540
gttctgcacg gtaccgggc ggtcaagga gatgatcatc cggggtgggg agaactgca 21600
ccccggcgag gtccaggccg tggtcgggc ggtgccgggg gtggcgagac tgcctgctg 21660
gggcaagccg cagcagtgct tgggcgaggt gccggtggtg ttcgtggtgc cggcgccggg 21720
cgggttccgac ccggcgccgg tgcctggcgc gtgccgggag gagctgtcgt acttcaaggt 21780
gcccaggag gtctacgaga
tcgagcgggt gccgcgcacg gcgtcgggca agaccaccg 21840
gcacgtgctg ctggacctgc ccgcccggtt gcgggcggcg tcgagcgggc agttccagt 21900
gctgctgctg ctggactggg tgccaggac ggcgtgccc ggtgaggagg tcccggcgag 21960
ctgggtgctg gtggacggcg acccgctggg gctcgcggac gggttgccc ccacggcgcg 22020
gcggtgctggt gtggcgagc cgggcgcgga tgcgtgggc gacggcgat cggacgccga 22080
cgagccgggc gcgagcagcg cgggcgaacc gggctcgggt ggctcgggtg agccgggctc 22140
gggtggtcgc ggcgaaccg gctcgggtga accggcgcg agcagcgcg gtgagccggg 22200
tcgggtgag
ccgggcgcgg ccgaaccccc gcaggtcgtg ctggtcgcg cggtccccg 22260
tgagcgtggt gaggtcgcg gggacgtgga ggcgtcgcg gacgggctcg cgcggcggt 22320
cgtcgggtgg ctggccgacg agcggttcg gggggcgcg ttcgtcgtg ccacctcggg 22380
cgcggtgctg acctccccg gcgaggacct gcgggagctg cgggcggccc cgctgtgggg 22440
tgtgtgctg tcggtgcagg ccgcttccc cggtcgggtg gtggcgccg acctggacgc 22500
gtccggcgac gggcgggcg cggcgtggc tcgctcgtc gcggcgggc acgaccaggt 22560
ggcgtgctg ggcgacgtg cgctggcgcc ccggtggcc aggtgtccg tgccgtccga 22620

cccggcccc gcccgcgcg tggaccgga cgggctggtc gtggtaccg gtggcgactc 22680
ggcgcgcggc gggccctcg cgcgcacct ggtggccgcg cagggcgcg ggcgctgct 22740
gctggtctcc ccgacgggc tgcccgacca ggcgcgcgc gacctggagg ccgggttcg 22800
ggcgcggggc gcggcgcg agtcggtgtg gtgcgaccg gccgaccgg tcgctgctg 22860
cgccctgctg gacgcgcagg accgcccgt cagggcggtg gtgacgtg agggcgggcg 22920
ggcgctgctg gactcggcg gcgccctctg cgccctgcac gagctgacc gccaggcgcg 22980
accggcgctg ttcgtcgtg tcacctcgt ggcgggctg ctgggctcgg cggcgaccc
23040
ggcgcgcgcg gggccgacc agttcgccga ggcgtggtg cgcaggcgcg ccgaccgggg 23100
cctgccgggg ctggcgtgg cctggggtcc gctgccgggc gagcccgcg aggcggcgcg 23160
ggcgcgctg ccgatggcg aggcgtgac cctggtcgac gccgctcg ccgccgacca 23220
gggcccgtg gtggtgctg ggctcgacgc ggtcgggtcg cggcgcgcg tggcgcggt 23280
gccgcccgtg ctgcacgac tggctcgagg cggtcgcgcc gcgcggtcg cggcgcgcg 23340
ggtggccgag ttacgcgca ggctcgcgga ggcgggtgg cagcgggccc gacgctcgc 23400
gctggacctg gtgcgcgag acgtcgcggc ggcgtcggc ctgcccgagg
acaccccggt 23460
gcgcgcgag caggcgttc gcgacttcg cgtcacctc ctgaccgcg tggcgctgcg 23520
cgaccggatc aacgccgca ccggcgctc cctgcccgcg aggcgggtg tcgaccacc 23580
gaccccgcc gcgtcgcg accacctgt ggcgaggtc accggcgacc ggcgcacgt 23640
cgagcgggcg cgggacgag gggcgcgcg gacctcgcg cgggacgag cggtggcgat 23700
cgtcgccatg ggggtgaggg tggcgcgcg cgtggcctcg ccggaggacc tgtggcggt 23760
ggtggacgag ggcgtcgag cgatcgccc gttcccacc gaccggggct gggacctggc 23820
cacctgctc gacggctcgg actcgccgg gaggtcctc
gtggaccggt gtggtttct 23880
gccggcgcg ggcgacttc acgcccgggt cttcgcatc tcccgcgcg aggcctggc 23940
catggacccg cagcagcggt tgcgtggtg ggtggtgtg gagaccgtg aacgcgccg 24000
gatcgacccg cgtcgtcgc acggcgaaga cgtcgcgctg ttacgaggc tgatgtacca 24060
cgactacggg accgaacccg gttccgcgc ggagggcctg gagggttcg tcagcaccg 24120
cagcgcgggc agcgtggtc ccggccgcgt cgcctacgc ctcggcctga cggcccggc 24180
gctgaccgtg gacacggcg gctcgtcgt gctggtggc atccacctg cggcgaggc 24240
gctgcgtcg ggcgagtgt cgatggcgct
cgcgggcggt gtgcgggtg tggggcagcc 24300
gacgtcgttc gtggagtct cccggcagcg cgggctcgcc gccgacggc gctgcaagt 24360

gtttctccgac gacgcccagc gcacgaactg ggccgagggc gtgggctgc tgctgctgga 24420
 gcggctctcg gacgcgcgcc gcgacgggca cccggtgctg gcggtgctgc gcggcagcgc 24480
 ggtgaaccag gacggggcca gcaacgggct gaccgcgccc agcggcccgg cgcagcagcg 24540
 ggtcatcagg caggcgctgg cgaacggcgg gctgcgaccg tccgaagtgg acgcccgtgga 24600
 ggcgccacggc accggcacca ccctggggcga cccgatcgag gcgcaggcgc tgctcgccac 24660
 ctacggggcag gaccgcgagc
 agccgctgtg gctgggctcg ctcaagtcca acctcgggca 24720
 cgcgcaggcg gcggcgggcg tcgcgggctg gatcaagatg gtgatggcgc tgcggcacgg 24780
 cgtctgccc cgcacctgc acgtcggcac gccctcgtcc aaggtcgact ggtcggcggg 24840
 cgcggtcgag ctgctgaccg aggccaggcc gtggcgcgcg aacgggcggc cagccgggc 24900
 gggcgctgtec tcgttcgggg tcagcggcac caacgcgcac gtctgtgtgg aggagcaccg 24960
 ggaaccggcc gccgcgcccg tcgacccggg cccccggc ctggcggtca gcggcggcgt 25020
 cgcgccgctg gtgctgtccg ggcgcacccg ctccgcgctc gccgcgcagg ccgcggccct 25080
 gctggggcac
 ctggccgacg ggaccgaccc ggcgcgctg ggccgcgcgc tcgccaccac 25140
 ccgcaccgcg ttcgagcacc ggcccgcggt cctcgcgccg gacgtcgacg ccgcgcgcgc 25200
 cggggtgcgc gcgtcgccg aggaccggcc cgcgccgaac ctggtcaccg ggcaggccga 25260
 cgtggacggc ccggtcgtgt tcgtcttccc cggccagggc gcgcagtgga ccggcatggg 25320
 ccgggagctg ctggagacct cgccggtgtt cgccgcgagg ctgcgcgagt gctcggaggc 25380
 gctggagcgg tggaccggct ggtccctgct cgacctgctc gccgacgggg cggagctgga 25440
 ccgggtcgac gtgctccagc ccgcctcgtg ggcggtgatg gtggcgctgg ccgcgctgtg 25500
 ggagtcgtgc ggggtgcgcc cggacgccgt ggtcgggcac tcgcagggag aggtggccgc 25560
 cgcgctgcgc gccgggtggc tgtcgctgga cgacgcggcc aggggtggtg cgctgcgcag 25620
 ccgcgcgac gccgagcacc tggccgggag cgccggcatg atgtccgtcg ccgccggggc 25680
 ggagcgggtg gccgggtgca tcgccgaccg gcaggggcgg gtgtcggtgg ccgccgtgaa 25740
 cgggcccgtc gcgacctgg tggccggggc cgccgacgc ctgcccagc tggccgcgcg 25800
 ctgcgagcgg gagggcgtgc gggcccggat catcccgtg gactacgca gccacaccga 25860
 gcacgtggac gcgtcgacg ggggtgctga ggaggtgctg gcgggctca ccgcgcaggc
 25920
 cgggcacgtg ccgtggctgt ccaccgtgga cggcgagtgg gtcgacggct cggggctgga 25980
 cgcgactac tggttccgga acctgcgcgg gaccgtgcgg ttcgccgacg cgggtggcggc 26040
 gctggcgggc tcgggcacc ggggtgttct ggaggtgtcc agccaccgg tgctaccgc 26100
 cgcgaccggc gaggtgctgg aggcggccgg ggtgcgcgac gcgtggtgg tcggctcgt 26160
 gcggcgcgac gacgtggcc ccgagcgggt cctaccggg ctgcgcgagc tgcacgcgcg 26220
 cggcgtccc gtggggctgg aggcgggtgt cgccggcgcg gacgggaggg tggagctgcc 26280
 gacgtacgcg ttcagcacg agcggtactg gctggcgcg gcggcggtgg
 ccggggacgt 26340
 gtccgggtcg gggctggtgg acgcggcgca cccgtgctc ggggcggctg tgccgtgcc 26400
 gggcacgggc ggggtgctgc tgtccggcg gctctcgac cgccggcagc cgtggctggc 26460
 cgagcacgcg gtggccggga cgggtgctgt gccggcgcg gcgacgtgg agctggccgt 26520
 gcgcgcgggc gacgagacc ggtgcggggt gctgcgggag ctggtgatcg ggcagccgt 26580
 ggtggtgccg ccggacgcc aggtggacct gcaggtgctc gtggcgggc cggacgacgg 26640
 gggcgtgcgg gacctgcggc tgtactcgcg gaccggggcg gcggcgaggt gggtcgagca 26700
 cgcggcaggc gcgtcgccc ccggcgcgcg ggtcgcggg
 gcgcgaccgg ccggggcgcg 26760
 gacggccggg gcgcgactgg acggggcgcg actggacgga cagtggccac ccgcggcgcg 26820
 ggaaccggtt gcgtggaag gctttctacga gaacctggcg gagtgggct acgagtacgg 26880
 gccgtgttc cgggggctcg cgccggcgtg gacgcgcgac ggcgaggtgt tcgccaggc 26940
 cgtgtgccc gaggaggcgt tgtccgggca ggcgttgtcc gggcaggcgg ggtccgggca 27000
 ggccgggttc ggggaacgggt ccgggaacgg gttcgcatc caccggccc tgctggacgg 27060
 ggcgctgcac gcgggcaacc tgtgcgtgcc gcccgcccg ggccggacgc tgctgccgtt 27120
 cgctggaac gaggtgcggc tgcacccac
 cggggcgacg gcggtgcggg tgcgctgctg 27180
 ggcgaccggc gaggactccc tggagctgga gctgttcgac gccgacggcg cggcgtggc 27240
 gagcgtggc gggctgaccc tgcgaccggc ggtcacgggc gcgcgcccgg ccgagtctgt 27300
 gcacgaggtg gagtggaccg aggtcgcggc ggccgggtcg tggccggagg tcgccgacac 27360

ccgcgactgg gaggcgcgcg ccgacctgcc gaccgcgtcg cgcgagctgg ccgcccgcgc 27420
 gctggaaactg gtgcaggacc ggctggcggg cgtggacggc gcaccgctgc tggatgacac 27480
 cacgggcgcg gtggcggtgg ccgacgacgc cgaggtcacc gaccgcgcgc ccgcccgcgt 27540
 ctgggggctg ctgcgctcgg

cgcagtcgca gcaccccggc cggttcgcgc tggtcgacgt 27600
 cgacggcggc ggcgcggcgg aggtcgccgc gctcgtgccc ggcgacgagc cgcagaccgc 27660
 gctgcgcggc gggctcgtgc gggctccgcg cctgcgcgcg ctgcccccg gtctcgtgcc 27720
 gcccgcggg gcgcaactgg acctggacgc agtcaccacc ggacgctcg acgggctcgc 27780
 gctcgtggcc tcggaaccgg tcccgtcgc ggccggggag gtgcggatcg aggtcagggc 27840
 ggccgggcag aacttcggg acgtgctggt ggcgctggac ggcgctcgcg gccaggaggg 27900
 catcggcggc gagggtccg ggatcgtgac cgaggtcggc ccgaggtga ccgattcgc 27960
 cgcgggcgac

cgggtgatgg ggctgttccc gcgctcgttc gggccgctgg ccgtggccga 28020
 cggccgcacg gtggtgcggg tgccgcgcgg ctggtcgttc accgacgcgg cggccgtgcc 28080
 ggtcgcgttc ctgaccgcgc tgcacggact ccaggacgtc gccgggctgc gggccgggga 28140
 gacggtgctg gtgcacgcgg cggcgggcgg cgtcgggcag gccccgtgc agctcgcca 28200
 ccaactcggc gcgcgcgtgc tggccaccgc gcacccggcc aagcacagcg tgctaccgc 28260
 gctgggcgtg cccgcgagc ggctcgctc cagccgcgac ctcggtacg cgcggcggtt 28320
 cggcgacgtc gacgtggtgc tgaactccct ggtcggcgag cacgtcgacg cctcgtcgcg 28380

gctcgtcgcg gcgggcggcc ggttcgtgga gatcggaag aacgacgtcc gggacgccga 28440
 ctcggtcggg gacgtccgct accgggtgtt cgacctgggc gcggacgcgc gccggaccg 28500
 gatcggcgag ctgctggagc agctgggtggg cctgttcgag tcgggcgcgc tgcggccact 28560
 gccggtgcgc acgtgggacg tcaccgcgc ggctcggcg ttccgcgaga tgagccgggg 28620
 cgggcacacc ggcaagatcg tctgacgat cccgcgcgc ctgaccccg agggcacggt 28680
 gctgatcacc ggcggcgcgc gcacgtcgg ggccaccgcc gcccgccacc tggtcaccgc 28740
 gcacggcgcg cggaacctgc tgcgtggtcg caggcggggc cccgacgcgc ccggcgcgag 28800

cgagctggcg gaggagctgc gcgggtggg cgcggacgtg cgggtggcgg cgtgcgacgt 28860
 cgccgaccgg gccgcgctcg acgcctgct cgctcggtc ccggccgggc gcccgctgac 28920
 ggccgtcgtg cagcggcggc gcgcgtcga cgacggcacg gtaccgcgc tcaccccgga 28980
 gcggttcgac gcggtgttcc gccccaaggt ggacgcgatc gcgcacctgg acgagcgac 29040
 ccgcgacgcc gacctggccg cgttcgtcgt ctactcctcg gcggcgggcg tgctcggcaa 29100
 cgcggggcag ggcaactacg cggcggcgaa cgccgtgctg gacgcggtgg cccgcacccg 29160
 gcacgcccgc gccctcccg cgacctcgt ggctggggg ttgtggagcg

acacgagcgc 29220
 gctgaccgcg acgatggacg ggcgcgcggt ggaccgcacg cggcgcgcg gcgtgctggg 29280
 catgggcaac gacgaggcgc tggcgcgct ggacgcgggc ctggcgctcg ggctgccgc 29340
 gctggtggcc gcccgatcg acccgccgc gctgcgcgac cccgcgtcgg ggtcgccgt 29400
 gctgcgcggg ctggtgcgcg ccaccgcgc cagggccgcc acccgcgacc gggacccgt 29460
 gggcgggctg gccggacgggt tggccgggtt gtcggccgcg gagcaggac agctgctgct 29520
 gggcctgggt cgagcgagg ccgcgccgt gctcgggcac gcgagcgcg agcggtcga 29580
 gccgcaggtg gcgttcggg acatgggggt cgactcgtc

accgcctgg agctgcgca 29640
 ccggtcgcg gcggcgacc ggctcggtt gcccgcgac gcgacgttc accaccgac 29700
 gccggtgcgg ttgcgcgcg tgcgtcgggg cgagctgctg ggcccgctg tggctcccgg 29760
 agccgtgacc gcccgcgcg ctcccgtgac ccgcgcgcg ccccgcgac agccgatcg 29820
 gatcgtgctg atggcgtgcc ggctccccg cggggtggtc gaccgcgcg ggctgtggga 29880
 gctgctcacc ggggagcggg acgggatcgt ggacttccc gacgaccggg gctgggacct 29940
 ggagtcgctc taccaccgg acgcccact ccccggcac tcctacgtg tcgcggcgcg 30000
 gttcctggac gacgcgggcg ggttcgacgc

cgggttcttc ggcattccc cgcgcgagc 30060
 cctggcgatg gaccgcgac agcggtgtt cctggagacc tgctgggagg cgttcgagcg 30120
 cgccgggatc gaccgggtct cgtgcgcgg cagcgacacc ggggtgttc cggggatcat 30180
 cgaccaggac tacggggtgc gcgcgggcac gggcccgag gagctggagg gctacctgct 30240
 caccggcacc gccacgtcgg tggcgtccg gcgggtggcc tactgttcg ggctggaggg 30300
 cccggcggtc accgtggaca cggcgtgctc gtcgtcgtg gtggccacgc actggcggt 30360

gcaggcgctg cgccggggcg agtgctcgat ggcgctggcg ggccggcgga ccgtgatggg 30420
gcggccgctcg gcgttcgtgg

agttctcccc gcagcgcggg ctggcgcggg acgggaactg 30480

caaggcgctt ggccgggacg cggacggcac cgcgttcagc gagggcgcgg gcgtgctgct 30540
gctggagcgg ctctcgacg cgcggcgcg cgggcacccg gtgctcgcg tgatccgggg 30600
gtcggcgctg aaccaggacg gggcgctcga cgggctgacc gcgccagcg gaccggcgca 30660
gcagcgggtg atccggcgcg cgtggcgga cgcgggcctg cggcgctcg acgtggacgc 30720
ggtggaggcg caccggacgg gcaccgcgt cggcgacccg atcgaggcgg gcgcgtgct 30780
ggcgacctac ggccgggacc gggaggggcg ggaaccggtg tggctggggc cgtcaagt 30840
caacaccggg

cacacgtgg cggcgcggg cgtgtcgagc gtgatcaaga tggctgctggc 30900

gctgaaccac ggctgtgct cccgttcgt gcacgtcgcg gagccgagcg cggcggtgga 30960
ctgggagtcg ggccggcgct gcctgtgac gagcgcccg ccgtggcgag agagcgcgag 31020
gccccggcgg ggggggtgt cgtcttcgg gatcagcggc acgaacgcc acctggtgct 31080
ggaagccgcg ctgcgagg agggcgcggg ggccggaggt gggcgcgcg cggcgggacc 31140
ggacacccgg tcggcgccca cccgggacgc cccagcgggc cccgtccaga cctccggcgt 31200
gatccctgg ccgtgtcgcg cccgtccgc cgacgcactg ccccgcgagg ccgcaagct 31260

ggccgcccac gtgcggcgcg acgacgacct ctgcccgtc gacgtcggt ggtccctcg 31320
gaccacccgc accgcgcacc cgcaccgcgc cgtgtcgtc ggccggcacc gcgagcgct 31380
gctgtcgcc gccgacgcgc tcggggcgcg caggccagc caggccgtg tcaccggctc 31440
cgccgtcggg tcgggttcgg cgaagacct gtctgtgtt cccggccagg gcgcgcagt 31500
ggcgggcatg ggccgtgagc tgcgtgggtc ctgcccgtg ttcgccgcgc ggtgtcgca 31560
gtgcgccgac gcctggccc cgcacaccga ctgggacct ctggacgtg tcgcggcgcg 31620
ggaggcgcg ccgggttcg agcgggtcga cgtgtccag cccacctgt gggcggtgat 31680

ggtggcgctg gccgcgctgt ggcgctcgt cggggtggag ccgtccgccg tcgtcgggca 31740
ctcgaggcg gaggtggcg cgcctgtgt cggcggttac ctggcgctgg gcgacgcggc 31800
gcggctgatc gcgcggcgca gcaggccat cgcgcaggag ctgaccggcg gcggcgggat 31860
gctgtccgt ctacctcg ccgagcggt cgcgaactg ctggagccgt gggccgggaa 31920
gctgtggatc gggcggtca acagccccgc gtccgtctc gtgtccgtg acgccaggc 31980
gctgggcgag ttcgtgcggg tgcgtggcaa gggccggtac aaccggtggc ggtgtcccg 32040
cgtggacttc gccgggact ccgggcacgt cgacggcatc gaggcgcggc

tgccgagga 32100

gctggccgac gtaccgccg cggcgggcgga agtgccctgg ctgtccaccg tggacggcg 32160
gtgggtggag cgcaccaggc tggacgccga ctactggtac cgcaacctgc gcgacgtgt 32220
ccgttcgac gaggcgtcc cgcgctgtgt ggacgcggg caccggcgct tcgtggaggt 32280
ctccacgac ccgtgtgta ccaccgcgt cggcgaggtc gccgacgagc ggcaggacgt 32340
gcgggtcgcc gtggcgggca cgtgcgccg cgacgacggc ggccgggacc ggtctgtgg 32400
cgcgctcgcc gaggtggcg cctcgggcgt ggcggtggac tggcgcgcg tgttcggcg 32460
gaccggggcc gcgtgtgtgg agctgccgac gtacgcttc

cggcacgagc ggttctggt 32520

caccccgtec ggccggcgagc tgcgcggtt ggggtcgcg caggccgggc acccgctgct 32580
ggcgcggtg gtacgcttc cggacaccgg cggcgctgt ctgaccgggc ggtgtcgt 32640
gtccgcgag ccgtggtgg ccgaccacgc gctgtccggc gtgcccgtgc tgccggggac 32700
ggcgctggtg gagtggtggc tgcgcggtt tgacgagacc ggcacgccgg tgggtggcgga 32760
gctggtgctg ggcaggccgc tcgtgtgct gcgcaccggc tcggcgagc tgcaggtgt 32820
ggtggcgag gaggcgcggc acggcgcgcg gccggtcgcg gtgtactcg gggcgggcga 32880
cgaccggcg tggaccgagc acgctcggg

ctcgctcgcg ccggacgagg acgccgcgc 32940

gggagcgag ggccgacagt ggcccccgc cggggccgag ccggtggacc tcggcggtt 33000
ctacgacggc ctgcccgaac ggggctacga ctacggcccg gccttcggg gcctgtgtgc 33060
cggtgggtc agggcgacg aggcgttcgc cagggtcggt ctgcccagc accagcacgg 33120
cgccggcgcc cgggttcggc tgacccggc gctgtggac ggccctgc acggccctc 33180
gctgtcgcg ggccacggc ggggcacggc gctgccgtt acctggacc gcgtgcggt 33240
gcacgcggc gggcgacggc cgtgcgcgt ggcggtggag gcggacggc cggagcggtt 33300
gtcgctcgcg gcgagcgtc

cgccggggcac gcccggtggtg accgtcgggt cgtgtctgct 33360
 gcgcggccgc gacgcggacc ggctcggggc gacagcggcg gcgacggcgg cagcggcggc 33420
 ggacgacggg ctgcacgcgc tggagtggac cccgcaccgc ctgcccagg agacgaccgg 33480
 tccccccgc gtcttgaca ccaggcggtg ggagctgccc gagggcgtcg ggccggccga 33540
 ggcatcacc acgcgggtgc tcgccgagct ccaggccgag ctgcagggga cggcgaccct 33600
 ggtcgtggtg acgcggggcg cggtagccgt gcatgacgac gccgaggtca ccgaccggc 33660
 cgccgcgcgc gtgtgggggc tggtagcgcgc cgcgcaggcc gaggaaccgc gacgcgtcgc 33720
 cgtggtcgac
 gtcgacgacg cctccgaggc cgcgttgga gcccgcgcgc acgcccggg 33780
 cgcagaaccg cagctcgccc tgcgcggcgg ggccggcgttc gcgccaggc tggtcgaggc 33840
 gtccggggcg ctggccgtgc cggacgggccc gtggcggttc gacagcaccg gccggggcac 33900
 cctggagaac ctggcgctcg tgcccacccc cgcgcggcgg gcgccgtcg cggccggtca 33960
 ggtgcccgatc gtggtgcggg cgggcggcct gaacttcgg gacgtgctga tcgcgtcga 34020
 cgcctacgag tcggagatcg gcaccgaggc cgcggcggtg gtcgtggagg tcgcgcggga 34080
 cgtcaccgcg gtggccgtgg gcgaccgcgt gatgggcatg atccccggt cgttcgggc 34140
 gctggccgtg gccgacgccc gcacggtggt gcggatgccg cgcggctggt cgttcaccga 34200
 cgcggcgggc gtcccggtcg cgttcttgac cgcctgtac gggctgcgcg acctcggcg 34260
 cctggcggag ggagagaccg tgcgtgga cgcggcggcg ggccggtcg gcatggccgc 34320
 cgtgcagctc gcccggcact tcggcgcgcg cgtgctgggc accgcgacc cggccaagca 34380
 cgccgcgtg gacctgccc cgcaccacct ggctccagc cgggacctcg cctacgcga 34440
 gcggttcggc gacgtcgacg tggtagtga ctcctggtc ggagagcacg tcgacgctc 34500
 gctgcggctg ctgcgcgcgg gcggccggtt cgtggagatg ggccggcgcg acctgcgga
 34560
 cgccgacgag gtggcgcgcg agcaccgccc cgcgcctac ctccggttcg acctcggcg 34620
 cgacgcgggc ccggaccgga tcgccgagct gctggtggag ctggtggccc tgttcgagtc 34680
 gggcgcgctc cggccgtgc cgaccggcg caccgacctg gtgcgcgccc ccgagcggtt 34740
 ccgggcatg agccaggccc gccacgtcgg caagctcgtg ctacccgcg cccgcgcgt 34800
 cgaccgcgac ggacggttc tgatcaccgg cggcacggga accctcggcg cggctctggc 34860
 ccgccacctg gtggacgcgc acggcgctcg gaacctgctg ctggtcagcc gcagcggccc 34920
 caacgcgcg ggtgcggccc acctggtcgc ggagctggcc gagcggggcg
 cgagggtccg 34980
 ggtggccgcg tcgacgtgg ccgagaagga cgcgtcacc gcgtgctcg cctcgatccc 35040
 caccggcgcg ccgtcaccg gcgtcgtgca cgcggcgggc gcgtggagc acggggtgct 35100
 caccgcctg gacgcgacc gggtagcggc ggtgctgcgc ccaaggccg acgcccct 35160
 gctgctgac gaggccaccg aggaccccga cctcgctg ttcgccctgt gctcgtcgt 35220
 ggccggcgctg ctgggcaac cgggcccagg gaactacgc gccgccaaca cctacctgga 35280
 cgcgtggcc cagcaccggt cggccgcccg tctggccgcg ctgtcgtgg cctggggccg 35340
 gtgggcgcag accagcgcgc tcaccgcga cctgcccgcg
 cccggcggtc gccgcgacct 35400
 ggtgcgcccc atggacaccg cgtccgcgt gcgcctgctc gacgcgcgcg tccgaccgg 35460
 acgctcgacg gtcgtcgccg ccgagctgga cgtcacggcg gccaccgcg cgaaccggt 35520
 gctgcgcgcg ctggtccggc ccgcccggcg cgcgtggcc acgtccgcg gggacgagcg 35580
 cggcgtggcg gcggcgctgg ccggcctggg cgaggccgac cggcgccggt tcgtgctgga 35640
 cctggtgcgc tcgacgccc cgtcgtgct ggccctggcg ggcaaggagg cgtggacgc 35700
 cgagcgcgcg ttaccgaga ccggttcca ctcgtcacc gccgtggagc tgcgcaaccg 35760
 gctcgccgcg gcgaccgggc ttcggtgccc
 ctccacgtg gtgttcgacc acgccacccc 35820
 gaccgcgctg gccgcgacc tcgcccga gctgaccggc gacgacctgc cgcaggcgcg 35880
 ggccgtcgcc gccaccggcg gggcgccgga cgacgaccg gtggtgatcg tgcggcgag 35940
 ctgccgctc cccggcgccg cgactcgcc ggaggcgctg tgggagctgc tggagcgggg 36000
 cagggacgcc atcaccgct tcccgcgcga ccggggctgg gacctggagg cgtctacga 36060
 cgccgacccg gaccggccgg gcaagagta cgtgcgcgac ggccgggttc tcgccgacgc 36120
 ggccgggttc gacgcgaggt tcttcggcat ctcgccgcg gaggcgtgg ccaccgacc 36180
 gcagcagcg ctgctcgccg
 agacctcctg ggagctgttc gaacgcgcgg gcatcgcccc 36240
 gacctcgggt cgcggcagcg acgtcggcgt gttcgccggc gtgatcaacc aggagtacgg 36300

cgtgcacagc ggcacgaccc ccgcccagct ggagggttac gtgatgaccg gctcgaccac 36360
 cagcatcgcc tccggccggg tggcgtacct gctcgggctg accgggcccg ccgtcaccgt 36420
 ggacaccgcg tgcctcctgt cgtcgttggtg gatccacctg gcggcgaggc cgtcgcgtc 36480
 gggcgagtg tcatggcga tccggggcg cgcgacggtg atcgcgaggc cggcggggtt 36540
 cgtctcgttc tcccggcagc gcggcgcggc ccccgacggg cgtgcaagg cgttcggcga 36600
 cggcgcgagc
 ggcatggcgt tcccgaggg cgtcggcctg gtgctgctgg agcggctctc 36660
 ggacgcgcgc cgcaacgggc acccggtgct ggcggtcgtg cgcggcacgg cctgaacca 36720
 ggacgcgcgc tccaacgggc tgaccgcgcg gaacggggccc gcgcagcagc gggtgatccg 36780
 gcaggcgctg gccaacgcgc ggctgtcccc cgcagaggtg gacgcggtcg acgcgcacgg 36840
 caccggcacc gcaactcggc acccgatcga ggcgagggcg ctgctcgcca cctacgggcg 36900
 ggaccgggac ccgcggcggc cgtgtgtggc ggggtcgggt aagtcgaaca tccggcacac 36960
 ccaggcggcg gcgggcatcg cgagcgtgct caagatggtg ctggcgatgc agcggggcgt 37020

 gctgcccgcg accctgcacg ccgacacccc gacgacgaag gtcgactggt cctcgggcgc 37080
 ggtggcgtg ctgtcgggg cgcggccgtg gccggagacc gggaggccgc gccggcgggg 37140
 cgtgtcctcg ttcgggatct ccggcaccaa cgcgcacgtg ctgttgagc agggcccgc 37200
 ggacgcgcgc gccacgcgcg tgcggcgcg gggcgccggg ctggtcgggg cgggtgcctg 37260
 gccggtgtcc gggcgacgc cgcgcgcgt gcgcgccag gccgccaggc tccggacgca 37320
 cctggcgggc gcgcaggcg gaccgcgga cgtgggtggt tctgtggcg gcacgcggac 37380
 ggctgtcgcg cagcggcgcg tctgtgtggc cgggacggcg gagcaggccc gtgacgggct
 37440
 ggcgcgctg gccgaaggc gctcgtccgc gctcgtgacg accggtgagg ccggggtcga 37500
 cgggcgcgtg gtgttcgtg tcccggcca agggcgcgag tggatcgga tggcgcgga 37560
 gctgatcgac gcgtcggcg tattcgcca gcggttgcgc gactgcgcgg aggcgctgga 37620
 accgttcgtg gacttcgacc tgatcgaggt gctgcgcgga cgcgggtcgc tggagcgggt 37680
 cgactgtgtg cagcccgcgt cgtggcggtg gatgtgtcg ctggcagcgc tctggcggtc 37740
 gctggcgctg gaaccgagc ccgttgtcg gcactcgag ggcgagatc cggcgcgcg 37800
 ggtcagcggg gcgtcagcc tcccgcagc cgcagccgtg gtcgcttgc
 gcagcaaggc 37860
 gatcgcccag gacctggcg ggctcggcg catgatgtcc gtcgccctgc ccgccgacga 37920
 cgtcgacctg agcgggtatc ccggacgcct gtgggtcgcc gcgcacaacg gcccacctc 37980
 gacctgggtg gccggtgacg tggacgcgt gcgcgagctc caccccact acgaggcgcg 38040
 cgaggtccgg gcccgatca tcccgtcga ctacgccagc cacaccgggc acgtcgacac 38100
 catccgcgag cggctcgccg aggcactggc gcacgtcgcg ccgaggcgcg gcacgatccc 38160
 gtggctgtcg accgcgacc gcgagtggac caccggtgag gacccgacg ccgactactg 38220
 gttccgcaac ctgcgcggcg cgggtgggtt ccacaccgc
 atcaccaccc tgcggagca 38280
 ggccaccgg gtgttcgtg aagtctccag ccaccccgct ctaccaccg ccatcgaggc 38340
 cacgtcgaa ggaaccggac ccaccgccgt caccggaacc ctccgcgcg acgacggcg 38400
 cccgaccgc ctctacca gcctcgccac cctgcacgtg cgcggcgctc acgtcgactg 38460
 ggacgcggtc tacgcgggca gcggcgcgca ccgcacgacg ctccccacct acgcttcca 38520
 gcacgagcgc tactggctca ccgagccgga cgcgccgag gccgtcgcg acgcccgtt 38580
 ctgggacgcc gtggacagc gcgacgtggc cgcgtcgcc gggtccctgg gcgtcgagcc 38640
 cgcgccctg gagccgtgc tgcggggct
 gacgagctgg cgggcccga accgggacgg 38700
 cgcggccgtg gacgactggt cctaccggat cggctgggag cgggtggagc tgcccgcgc 38760
 cccgctgtcc ggacgtggc tggctgtgtg gcccgaggca ctccggcagc acacctcgt 38820
 cgcggaggtc gcggcgcgcg tggccgcgcg cgcgcgacg ccgaggatcg tggcgcggg 38880
 cccggacctg ggcccgacc tgggtgacga gccggacggg gtgctgtcgc tctggcggtg 38940
 ggacgaccgc ccggccgggg gcggcacgct ctgcgcggc gtcgtggagc cggtcgggct 39000
 ggtgcgggag gcggtgcggc gcggtgtgtg ggcgccgtg tgggtcgcca cgtcggcg 39060
 ggtcgccgtc gccgacccg
 gcgaggtgac ggccgagttc gggcgcgacg tgtggggcac 39120
 gggcgctcgt ctgggctgg acctgccgga cactggggg ggctgtgtg acctgccgc 39180
 gcggccggac ggggtcgcg tggacctgt gtgcgcggtg gtcgcggcg cggcgacga 39240
 ggaccagctg gcggtgcgc ccggccgggt gttcgcgcg gcgatgacc gacgcccggt 39300

cgcgctggcg cccgcgtggc gaccgcgcgg gacgggtgctg gtcaccggcg gcaccggcgg 39360
 cctcggcggc tacgtcgccc ggtgggcggc ggagcggggc gcgcgggacg tgggtgctgct 39420
 ctgcgcggc ggcccggacg cgccggggcg ggagcgcctg gtcgcccaca tcacggcggc 39480
 gggcgcccg

tgcgcggtgc tggcctgcga cgtcaccgac cgggacgcgc tggccgaggt 39540
 ggtcggaac ctgccggacg ggccgctgtc ggtggtgcac gcccgggcg tggcgcgacc 39600
 gggacggcgg ctggtggaga ccacgccgga ggagttcgcg gccatcgcc ggggcaaggt 39660
 cgccggcgcc cgctgctgg acgagctgct gggcgaccgg gagctggacg cgttcgtgct 39720
 gtctctctc ggcgcgcgcg cctggggcag cggcgggcag gccgggtacg cggcgggcaa 39780
 cgcttctcg gacgggctcg gcgacgcgag gcgcgcccga gggctcgcg ccacctcggt 39840
 ggcttggggc gcgtggggcg gcgtcggcac ggtcgacgag gtgctggggc agcagtggcg 39900

gcgcgcgggg ctgctacca tggaccgcg cctggccacc ctgcacctcg cgcacgccgt 39960
 gggctcgggc gaggcgac tgcctgctgc ggacgtcgac tgggcccgt tcgccccgc 40020
 ctacgcgctg gccaggccgc gcccgctgct ggccggcgtg cccgaggtcg ccgacgcgt 40080
 ggcggtcgtg gacgcgccc cgcacgccgg ggggatcggg gcgcggctgg ccgggctgcc 40140
 gccgcggag caggagcggc tgcctaccga gctggtgcag gcggagggcg cggccgtgct 40200
 gggcctgggc ggcatcacc gcgaccgggc gtccggggag gtcgggttcg actcgctcac 40260
 ggccgtggag ctgcgaacc ggctcggcgc ggccacgggt ctacctgc ccgcgacgt

40320

ggtgttcgac caccgcgc cagagccct ggccgcgcac ctgcggtccg cgctggggcc 40380
 ggccgcgcgc ccggtggact cgggtggcggg cgtgctggcc gagctggacc ggctggaggc 40440
 ggccatccc gcctgcccgt cggccgagat cggccggtcc cgctggagc tgcggctgcg 40500
 gcggttgagc gccgcgtcg gcgagctggt gcgcgcgaac ggcgagcggg cgaacggcgg 40560
 gcgcgcgaac ggccggcgcg cggcgccga cagctggac gacgcggggg ccgaggacgt 40620
 gctcggttc atcgaccggg agttcgggga cgcgtgagcg gccacacgag ccccgaccc 40680
 ggccccacc gcggcccca caacgacgac cctggcgagg aacagatggc

gaacgacgag 40740

aggctcctca gtiacctcaa gcgggtcacc gccgacctgc accgcacgcg ggagcggtg 40800
 cgcgaggcgg agtcggggc ggacgagccg atcgcgatcg tcggcatggc ctgccgttc 40860
 cccggcgcg tgcgacccc ggacgagctg tgggagctgg tggcgtccgg ccgcgacggc 40920
 atcgcccggt tcccgacga ccggggctgg gacctggcg cgctgttcga cccgacccc 40980
 gacgccaccg gccgtccta cgtcaccgag ggcgggttc tggacgacgc ggcctgttc 41040
 gacgcgggct tcttcgggat ctcccgcgc gagcgctgg ccaccgacc gcagcagcgg 41100
 gtgctgctgg agaccgctg ggagacctc gagcagcgcg

gcatcgacc gacctgctg 41160

tccgggcagg acgtggcggt gttaccggg gtcccaacg gggactacg gctgaccgtg 41220
 gaccgggtgc cggagggtt cgagggtac ctgggcatcg gcggggcggg cagcatcgcc 41280
 tccggcgca tctgctact cctgggtctg gaggtccgg ccgtcacgt ggacaccggc 41340
 tgcctgctgt cgctggtcg gatgcactgg gccgggcacg cgctgcggc gcgggagtgc 41400
 tcgctggcg tcgcgggcg cgtgatggt atggcgacg cgggtgggtt cgtcggttc 41460
 tccggcagc gcgggctgg ccgcgacgg cggtgcaagt cgttcggcga cggcgcgac 41520
 ggcacgtgt ggtcgaggg cgtgggtctg

ctgctgctgg agcggtgtc ggacgcgcgg 41580

gccaacgggc acgaggtgct tgcggtggt gcgggctcg cgatcaacca ggacggggcg 41640
 tccaacgggc tcaccgcgc caacgggccc tcgcagcagc gggatgatcg cgccgcgctc 41700
 gacgcggcgg ggtcgggca cgcggacgtc gacgcggtgg aggcgcacgg caccgccacg 41760
 gtgctcgcg accgatcga ggcgaggcg ctgctgaaca cctacggcg gcaccgggac 41820
 ggggcgcagc cgtctacct ggggtcggtc aagtccaacc tcgggcacac ccaggcgcg 41880
 gcgggcgtgg ccggggtgat caaggcggtg caggcgatgc gccacggcgt gctgccgcc 41940
 accctcaac tcggcacgc

caccaccaag gtcgactggt cctcgggcgc ggtggaggtg 42000

ctggcgagg cccggcgtg gccggagacc gggcgtccg gccgggtggg cgtgtcgtcg 42060
 ttcggcgtga gcggcaccga cgcgcactg atcctggagc aggcacccga gcacgagcca 42120
 gcgcggagg agccgggtg gcgcgggcgc gtggcgcgcg gcggcgcgac gccgtggacg 42180
 ctgtcgggc gcaccccc gcgctcgcc gaccaggcgc ggcggctggc cgggcacgtg 42240
 acggccgacc tgcggcgga ggacgtcggg ttctcgtgg ccaccaccag ggcgcacctg 42300

gagcaccggg cgggtggtggt cggctcggac gggctggcgg cgctggccga aggccgctcg 42360
tccgcgctcg

tgacgaccgg tgaggccggg gtcgacgggc gcgtggtgtt cgtgttcccc 42420

ggccaagggg cgcagtggat cggcatgggc gcggagctga tcgacgcgtc gccggtattc 42480
gccgagcggg tgcgcgagtg cgcggaggcg ctggaaccgt tcgtggactt cgacctgac 42540
gaggtgctgc gcggacgcgg gtcgtcggag cgggtcgacg ttgtgcagcc cgcgtcgtgg 42600
gcggtgatgg tgcgtcggc agcgtctcgg cggtcgtcgg gcgtggaacc ggacgccgtt 42660
gtcgggcaact cgcaggcgca gatcgcggcg gcggcgggtca gcggggcgct cagcctgccc 42720
gacgccgcag ccgtggtcgc gttgcgcagc aaggcgatcg cccaggacct ggccgggctc 42780

ggcggcatga tgtccgtcgc cctgcccgcg gacgacgtcg acctgagcgg gtatcccga 42840
cgctgtggg tcgccgcga caacggcccc acctcgaccg tgggtggcgg tgacgtggac 42900
gcgctgcgcg agtccacgc cactacgag ggcggcaggg tccggggccg gatcatccc 42960
gtcgactacg ccagccacac cgggcacgtc gacaccatcc gcgagcggct cggcaggca 43020
ctggcgacg tgcggccgag ggcgggcacg atcccgtggc tgtcgaccgc gaccgcgag 43080
tggaccaccg gtgaggacgc cgacccgac tactggttcc gcaacctgcg cggcgcggtg 43140
ggcttcaca ccgccatcac caccctcgcc gagcagggcc accgggtgtt cgtggaagtc 43200

tccagccacc ccgtgctcac caccgccatc gaggccacgc tcgaaggaa cggaccacc 43260
gccgtcaccg gaaccttcg ccgcgacgac ggcggccccg accgcctct caccagcctc 43320
gccacctgc agtgcgcgg cgtccacgtc gactggaagg ccgtgttcgc cggcacgggc 43380
gcgcgcggcg tccgctgcc gacctacgcg ttccagcacg agcgtactg gctggaccgg 43440
ggcgcgggcg ccggtgacgt caccggcgcg ggctggccg acgcggcgca cccgtgctg 43500
gccgcctcg cccagctgcc cggcaccggc ggggtgctgc tgagcggcg gtgtgcgg 43560
gcgacgcacc cgtggctggc cgagcacgtg gtgaacggga ccgcgtggt

gcccggcacg 43620

gccctggtgg agctggcgt gcgcgcgggc gacgaggtgg acgcgccgt gctgcgcgag 43680
ctggtgatca cccggccgat gccgtgccc gaggcgggtt tcctgcacgt gcaggtggac 43740
gtcgcgggtg cgcgcgacga cgggtcgcgg gcggtgcgga tctggtcgcg ccccgaggac 43800
gcggcgagcg agacggccc ctggaccgag caccgccacc gctccctcgc ccccgacgac 43860
gcggccccgc ccgccgcgc gagcggcgcg tggcccccg agggcgcggc ggccgtggac 43920
gtggacgact tctacgacc cctcgcgggc gcgggctacg agtacgggc gctgttccag 43980
ggcctcaccg ccgcgtgggc cggggacggg caggcgtggg

ccgaggtggt gctgcccggt 44040

gaggcggcg ggttcggcgc gcaccggcg ctgctggacg cggcgctgca cgtgggcacg 44100
ttctgcctgc cggcgggcc ggggtcgcgc acgtgctgc cgttcgcgtg gacggcgctg 44160
cggctgcacg ccaccggcg gcggtgacg cgggtgcacg cccgcgccac cggcgacgac 44220
ggcctcgtcg ttgagctgcg cgacgcggac ggggaaccgg tcgtgacggt cgacgcgtc 44280
gtgctgcgcg acgccgacc cgcgacgcg caggcccccg acgtcacggc ggacgcgttg 44340
tggcggtgc ggtgggtcga gcagccgcc gcggcccgcg cggcggtg ggtgctgctg 44400
ggcgggccgt ccgggcacgc cgggttcgcc

gccctgccgg tgttcgccga ccctgcggcc 44460

gtggcggcg tccccaggg gcaccggccc gcggtggtcg tcgtggacac caccgcgtgt 44520
cgggagccgg ggcgggacgt gccggggcg gcgcggcggt tcgtggtgcg ggcgtggag 44580
ctgctggtgg cgtggctgcg cgaggacgcg ctggccggga cccgactggt gctagtacc 44640
agcggcgcgg tgcgggtgcg cgcggacgcc gaggtcaccg accccgctgc cgcggcggtg 44700
tggggtctgc cgcgtcggc gcagtcggag caccggacc ggggtgtggc gctggacgtc 44760
gacgagccgg gcgcgggcc gggcgcgctg gcctcgccgg agccgcagct ggccgtccgg 44820
gcgggcgcgg ggttcgcgcc

ccggtcgcg agggccgagg ccgcgcccg cgcgctgcg 44880

gtcgacgggc cgtgctggt caccggcggc accggcacgc tcggcgcgct cgtggccccg 44940
cacctggtca ccgcgcagg cgcgcggaac ctgcacctgg tgagcaggcg cggccccgac 45000
gcgtccggcg ctcgagaact cctggacgag ctgcgcgggc tgggtgccga ggtcgagctg 45060
tcggcgtgc acgtggccga ccgggtggcg ctgcgcgcc tgcgtggggc cgtgcgccc 45120
gccgcgtgg tcacgcggc gggcgcggtg gacgacggcc tgcctaccga cctgaccgcc 45180
gaccggttc acgctgct gcggcccaag gtgcagcgcg tcgccacct ggacgacct 45240
ctcggggacg

tgccgctggt ggtgtttctc tccgcgaccg gcaccctcgg cacccccggc 45300
 caggcgaact acgccgcggc caacgcggtc gccgacgcgc tcgtgcagcg ccgccgcgcg 45360
 cggggcctgc cgggcgtgtc gctggcgtgg ggctgtggt cggacaccag cgagctgacc 45420
 gcgacatgg acgccgcga cgtggccgc accccgcggg cgggggtgct cggcctggac 45480
 gcggcgcgcg gcctggcgct gctcgacgcc gcgctcggcg cggacgacgc gctgctcgtg 45540
 ccgatccacc tggacaccgc cgcgctgcgc cggggggccg acccggtcc gccgctgctg 45600
 cgcggcctgg tccgccgcgc ccggcgcgcg gcgggcgcgg cccggcaggc cgcgctgccg 45660

 ctggtggcgc gactggccgg ggtggacgcg gcggagcggc ggccggcgct ggtggagctg 45720
 gtgcgcgcgc aggccgcgc cgtctcggg caccgcggcc cggacggcat cgggcaggac 45780
 cagccgttc gggaggtcgg gttcgactcg ctacggccg tggagctgc caaccggtc 45840
 ggccgcggca cgggtctcgc gctgcccgcg acggtggtgt tcgaccacc gacgtccgcg 45900
 cgggtcgccg agcacctcgc ggagctgctg ttccggcgcgg agacggctca ggcccccgcg 45960
 cggcgggagg tggtagccga cgacgaccgc atcgccgtgg tggcatggc ctgccggttc 46020
 cccggcgggg tcgccagcg ggacgggctg tggcggtg tgcgcgagga gcgcgacggc
 46080
 atcgcccgct tcccgagca cgggggctgg gacctggcgg cgtgttcga cccggacccc 46140
 gaccacgcgg gcacctcgt cgtgcgggaa ggccgggttc tcgacggggc gaccgggttc 46200
 gacgcgccgt tcttcggcat ctccccgcgc gaggcgtg ccatggacc gcagcagcgg 46260
 ctgctgctgg aggtggcggt ggagacgttc gagcagcgg gcacacccc gcgtcggcg 46320
 caccgacccg acaccggggt gttcgcgggc gtgactacc acgactacgg cgaggcggcg 46380
 ggcgagctgc ccgaggcgcg ggagacctac cgcagcacc gcacgtcggg cagcgtggtg 46440
 tccggccgcg tcgctacgc gctgggctg accggcccg cgtgacat
 cgacacggcc 46500
 tgctcgtcgt cgtggtggc gatccacctg ggccgcgggg cgtgcgggc ggccgagtg 46560
 tcgatggcgc tggtcggcg ggtgacggtg atgtcgacgc cgggcgggtt cgtgagcttc 46620
 tcgccgcagc ggggctggc cccggacggg cggtagaagt cgttctcgga ggccgcggac 46680
 ggccacgggt tcagcgaggc cgtcgggctg gtgctgctgg agcggctgtc ggacgcgcgg 46740
 gccaacgggc acgaggtgct tcgggtggtg ccggggtcgg cgtgaacca ggacggggcg 46800
 tccaacgggc tcaccgcgc caacgggccc tcgcagcagc gggtgatccg cgcggcgctc 46860
 gacgcggcgg ggttggggca cgcggacgtg gacgcggtg
 aggcgcacgg caccggcacc 46920
 accctcgggt acccgatcga ggccgacggc gtgctcgcca cctacgggca ggaccgcgag 46980
 cagccgctgt ggctgggcac gctcaagtcc aacctcgggc acaccaggc ggccgcgggc 47040
 atcggcagcg tgatcaagat gatccaggcg atcggcacg gcgtgctgcc gcgaccctg 47100
 cacgtcaccg agccgaccac ggccgtggac tggggcgcgg gcgcggtgga gctgctgacg 47160
 cgggcgcggg agtggccgga gaccgggctt ccgcgcggg cgggggtgtc gtcgttcggg 47220
 gtgagcggca cgaacgcga cgtgatcctg gagcaggccc ccgaaccggt ggccggtggag 47280
 gcggcgccgg aggcgggggt gctgccgtgg
 gtgctgctcg cccgcacgcc cgaggcgtg 47340
 cgggagcagg ccgaccgct cgtggcgcac ctggcggtg agtcgtctc ggccggcgtg 47400
 gcccgtcgc tgggtgctggg tcgggcggcc ctggaggagc ggcccggtg cgtggcgac 47460
 cgggcgcgcg ccggggaggc gttgcggcg ctggccagg ggccgcccct cccgcgctc 47520
 gtaccgggc ggaccggggt cgaggggcgc gtggtgttcg tgttccccg tcaggcgcg 47580
 cagtgggtcg gcatggggcg tcgctgctg gacgcctcg cgggtgtcgc cgaacgcctg 47640
 cgcgagtcgc cggcgccctt gcgcccgtac accgactggg acctggtcga ggtgatcacc 47700
 tcgggtggcg cgtggacga
 cgtggacgtc gtgcagccc cgtcgtggg ggtgatggtg 47760
 tccctcgcgg cgtgtggcg ctgcctcggc gtcgaaccgg acgcggtgat cgggcactcg 47820
 caggcgaga tcgccgcgc gaccgtcgcg ggtggctca gcctccagga cggcggaag 47880
 atcgtcgcgc tcgcagcca gctgatcgac gaggagctga ccgggctggg cggcatgatg 47940
 tccgtcgcgc tccccgcga ggacatcgac ctgagcgggt acgagggcgc gttgtgggtc 48000
 gcgacggtca acgggcccag cgcgaccgtg gtcgccgggg acaccggggc actggaggag 48060
 ctgcggcgcg gctgcggcga ggcggtccgc acgcgggtga tcccgtgga ctacgcagc 48120
 cacaccgggc
 acgtcgacgc catccgcgac cagctcgccc ggatgctcgc cgacgtcacc 48180
 ccggggcccg gcgagatccc gtggctgtcc acggtgaccg gcgagtgat cacccccggc 48240

gacgacgacg ccgactactg gtccacacac ctccgcccga ccgtccactt cgcgcacggg 48300
atcaccaccc tgcctgacgc cgggcaccgg gtgttcgtgg aggtctcttc gcaccccgtg 48360
ctggcggcgg cgggtgcagga gagcggcggg gcggcggggg acgcgcgggt cgcctgaccc 48420
ggcacgctgc gccgcgacga cggcggctgg gaccgggtcc tgaccggcct ggccgagctg 48480
cacgtgcgcg gcgtggacgt ggactggacg cgggtgctgc ccgaggcggg gcgggcgccc 48540

ctgccgacgt acgcgttcca gcacgagcgc tactggccgg aaccgcgcgc cccggccgcc 48600
gcgcccggcg gtgtgacga cgcgtgtgg gcggtgatcg aggttggtga cgcggcggac 48660
ctggcggggg agctggccgt ggacgaggac gagctggcgc ggggtgctgc cgcctgaccc 48720
tcctggcggc ggccgagcgc ggcaaggagc gcgctcgacg gctggcgcta cgggtcgac 48780
tgggtcccgg tccccacgag cgggtctggg ctgcccggcg ggcaagcgt gtccggcggg 48840
caggcgtgt ccggcgggccc gaggtcgtcc ggccggggcag ggctctccgg cggtcagggg 48900
acgccaggcg ggtccgggtc ccccggcgga gcggcactgc caggcgggccc agggctgccc 48960

ggcggagcgg cgtgcccgg cgggtggcc gtgtgtgtgc ccgcaacga cgagcggcg 49020
cgggcggtcg cgggcgggct ggtcgcgcgg ggtgtggacg tgaccgtcgt ggccggcggtc 49080
gacgccaccc gcgacgggtt ggcaaggcgc ctgcccggac gcccgcacgc cgtggtgtcg 49140
ctgctgtcct gggacgcggg ggccgacgag ccgggcgcgc ccggttcggc cacggccgcg 49200
ctggtgcagg ccttggccga cgggggtgcc accgggcgcg tgtgtgtgcg gaccgggggc 49260
gcggtgagcg tcgcccgcga ggacccgac cccgaccagg ccgcccgtgt ggggttgggc 49320
ggggtgctgg ccttggacct gccggaggcg ttcggcgga cgtgtgacct

gccgcggcag 49380

cccaccgacg ccgacctga cgcgttcgcc gccgcgtga ccgccccgg cggcgaggac 49440
cagctcgcgg tgcgcgacgg ccgctgtcg gccgcgcgc tggtcgcga cggggccgac 49500
gcgcccggagt ggacgccgc cggcgcgggt ctggtaccg gcggcaccgg cggcctcggc 49560
acgacgtgg cccgtggct cgcctgtcc gggccggggc acgtcgtgct cgcagccgc 49620
tcggccccc cgcgcccg cgcggccggg ctggccgcgc aggtggaggc gctgggcgcg 49680
cgggtcagcg tgggtggcct ggacgtggc gaccgggacg cggtgccgc cgtgtcgc 49740
gacgtcgagc gggacgggccc gctgaccgc gtgtgtgacg

cggcgggcgc gggactggcc 49800

ccgacgccgg tgggtggagt gaccgccggg cgtacgcgg acgtcgcgg cggcaaggct 49860
gagggcgcgc ggggtgctga cgaggtgtc gccgaccggg cgtggacgc gttcgtgctg 49920
ttctctccg gcgcggcgt gtggggcagc ggccggcagg ccccgtagc ggcggccaac 49980
gcgttcttg acgggtggc cgcgccgagg cgggcgcgc ggtcgtggc cactcggtg 50040
gcgtggggcg gctggggcg cggcctcg atgatggcg acggggacgc ggagcgggtg 50100
gcccggctgg gcatccgac gatggaccg gaggcggcgc tgcgcggcat ggcgtggcg 50160
gtcggctccg ggcgggccc gagcgtgtg

gccgacgtcg actgggccc gtccgcccc 50220

ggctacgccc tggcgcggga gcgcccgtg ctgcgcgggc tgccggaggt ggtggcgctg 50280
ctggcgaac cggacgagcc cgcgcggcg gtggacgcgc ggggcgcgt ggcggcccgg 50340
ctgaccgggc tggacgcggc cgggcaggac gagctgctc cggacctgtt gcgggcgag 50400
gcggcggcgg tgcgtgggtt gcggaccct ggccgggtcg cggcgagacc ggcgttaag 50460
gacgcgggt tgcactcgt gaccgccgt gagctgcga accggtggg cgcggccacc 50520
gggctgcggc tgcgcggac cgtgtgttc gaccaccga aaccctggc tctggcgcgc 50580
gtgctgcgcg ccgagctggt

ccccagcgg ggggacggg tgacggcggc gcaggtggcg 50640

caccgggagg acgcatcg gcgggtgtg gcgtcggtgc cgtggcccgt gttcaggag 50700
ctggcgctgc tggcgcgct cgtggacctc gtcccgcgc gccaccggc gggcgccgcg 50760
gcgacagcgg agcgggacga cctggcggac ctggcgagc tggacctgga cgtctggtc 50820
cgcaggcgga tgcgcggcac caccgccggg aacgactgag gctttgatgc ggagcggaga 50880
gagcatgagc gcgggacact gcgggagag cgtcgtccag gccctgcgga ccacgtggt 50940
ggacaacgag cggctgcggc gggagaacga gcggctggt gccgaggcg gtgagccgt 51000
ggcgatcgtg

tcgatggcgt gccggtgcc cggcggcgt accgaccgg agtcgtgtg 51060

ggagctggt cgcgaggcc gggacgcat cgggcgttc ccgaccgac ggggctggga 51120
cctggggtc ctgttcgac acgaccgga cgcggcgggc tcctcgtac tgcgggaggg 51180
cgggttctg gcgcgggcgc cgggttcga cgcgcgttc ttcggcatc cccgcgcga 51240

ggccctggcc atggaccgc agcagcggt gctgctggag gtggcgtggg aggcctgga 51300
gccccggg ctcgaccgc gctcgtgga gggccgggac gtccggtgt tcgccccgg 51360
caaccgcag ggctacggcg gcggaccggg tgacccccg gagggcctgg aggggttct 51420

gggcgtcaac gcctcgtcgt cggatgatctc cggcggggtc tctacaccc tgggcctgac 51480
cggcccgcc gtcaccgtgg acacggcgtg ctcgtcgtcg ctggtggcga tccacctggc 51540
ggtgcggtcg ctgcgtcgc gggagtgtc gatggcgtc gcggcgggg tgaccgtgat 51600
ggggcagccg acccggttcg tggagtctc gcggcagcgc gggctcgccc cggacgggcg 51660
gtgcaagtcg ttcggcgacg gcgcggacgg cacgtcgtgg gccgagggcg tcggcgtgct 51720
gctgctggag cggctctcgg acgcggcgcg cgacgggcac gaggtgctgg cggatgatccc 51780
cggctcggcg gtgaaccagg acggggcgtc caatggcctg accgcgccga acggccctc
51840
ccaggagcgg gtgatcgcg cggccctggc cgacgcgggt ctggcctgg ccgacgtgga 51900
cctgctggag gcgcacggca ccggcaccag gctggcgac ccgacgagg cgcggcgct 51960
gctcaacacc tacggccggg gcagccgca ggaccggcg ctgtggtgg ggtcgtgaa 52020
gtcgaacctc gggcacgcc agtcggcgtc gggggtggcg ggcgtgatca aggtggtgca 52080
ggcgatccgg cacggctga tcccgccac gctgcacgcc gacgagccga gctcgaact 52140
ggactggcg gcggggcggg tggagtgtc ggcgcgcgag cgggagtggc cggagaccgg 52200
gcggcgcggg cggggcgcg tgtcgtcgtt cggggtgagc ggcacgaacg
cgacgtgat 52260
cgtggagcag gcgcccagg aggcgccgc cggggtcgcg gcggcgggc gggccgcgc 52320
caggtcggcg ggccggcagg acgcgggat cgcggcggtg accggcgagg cggccccgc 52380
cgctggcccc gccaccgcg aaccgcgcg gtcggcgctc gaggacggga cggcgctcg 52440
ccccggccc gtcgcgacc gcggggtcgt gccgtggcg ctgtccggc ggaccgcgc 52500
cgcgctggcc gccaggcg cccggttgc gcgcacctc gcccgccacc cggcgcccc 52560
cccgtggac gtggcctggt cgtggccac gaccgctcg gtgtggagc accgggccgt 52620
cgtgccccg gcctcgtcgc acgaggccct ggcggggtt
gacgcgtcg cctcggcgcc 52680
cgccgaccg tcggtgtcg tcggcgaggc ggcgccggc cgggtggcg tgctgttac 52740
cgggcaggcg agtcagcggg ccgtgcggg gcgcgagctg cgggagcggt tcccggtgtt 52800
cgcgcgggcg ttcgacggc cgtgccccg cgtggcgag ctgcccacc gcgacggcg 52860
cgcgatcggg ctgcggagg tggcgtggc cgacccggc acgcccgcg ccgctgct 52920
cgaccggacc gcttcaccc agcccgcct gtgcgctg gaggtcgcg tgttcggct 52980
ggtccagtgc tggggcgtg ccccgcggc gctggccgg cactcggtcg gcgagatcg 53040
cgccgcgac gtggccggg tgcctcct

cgccgacgc gcccgctgg tgcgcgccag 53100
ggggggcgt atgcaggag tcccaggag cgcgcgatg gtggcggtgg aggcggccga 53160
ggacgaggtc gtccgctgc tcgggacgg ggtgtcgtg gcccgctca acggccgac 53220
ctcggtggt ctctccggc acgaggagg cgtcacgcc gtcccgcgga ggctggcgca 53280
gcggggcagg gcaccaaga ggctcgccgt ctgcacgcc ttcactcgc acccggtgga 53340
cccgcgctg gccgccttc gcgcgtggc cgaggagctc gcctacgcg cccccacgat 53400
cccgatcgt tcaccctca ccggcgccc cgtcacccc gacgagctg gctccccga 53460
ctactgggtg cggcacgcg

gcggcgccgt ccggttctg gacgccgtg gggcgctggg 53520
ggacgcgggc gcgcgacgt tcctggagct gggccggag ggcgtgctca cggcgcggg 53580
cgcggaactg ctgcccggc cgggtgttc ggcgacgtg gcgcggcag tccccaggc 53640
gcgggcccgt ctgcggggg tcgcgggct gcacgtgcgc ggcgcgacag tcgactggg 53700
ttcgctgttc acggcgcggc acgcggcgcg cgtcccgtg cccacctag cgttcagca 53760
cgaggaccac tggctgtgc gccgtccac gcgcggcag gtggcgcgcg tcggcctgcg 53820
cgaggccggg caccgctgc tggcgcggt cgtcgctg ccggagagcg gcggggtgca 53880
gctgagcgt

cggttgtcg tggcgcgca gccgtggctg gccgagcac tegtctccg 53940
cacggcgct gtccggcg cggcgtgtt ggagctggcg gtgcggcg gcgacgagac 54000
cggcacgcc gtgtggagg agtgtgtgat cggccggcg atgccgtgc cggacggcg 54060
cgcgctgagc gtgaggtgc tegtggccc ggacgaggc gggcgccgt cgggtgcgt 54120
gtactccgc gcggacggg cgggtggactg ggtcgagcac gcggcgggg cgtgaccgc 54180
gccggaggcc gcggcgacc ccgacgggg cccgtggcg ccggagaac ccgaaccgt 54240

ggacacgcgg ggcttctacg acaccctcgc ggagggcggc tacgcctacg gcccgtgtt 54300

ccggggcctg acctcggcgt ggcgcggcga ggcgcaggcg tgggcggagg tggcgtgcc 54360
 cggtagcgc accgggttcg gcatccacc ggccctgtc gacccgcgc tgcacaccgc 54420
 gcacttctgc ctgccaccg ggaccgagcg gcggccggg ctgctgccgt tgcctggac 54480
 cggcgtgcgg ctgcacgcg gcggcgcgac gaccgcgcg gtgcacgcc gcgccaccg 54540
 cgacgacggc gtgaccgtgc gcctgtcga cgtgcccgt cagccggtcg cggacgtggc 54600
 cgccctgacc ttccgcgcg cagccgacac cccgtccgc gaggtcccgg acgcgtgtg 54660
 ggccgtggag tggaccgagc acccgtgcc cgcggacggg accaccccg cggcggggac
 54720
 caccacggcc gtggtggtcg tggacaccg gagcgtcgac gccccgacg acggccccgc 54780
 ccgcgccgc gcgtgaccg cccacgtcct cgcgagctg cagcggcacg ccgacgacga 54840
 ccggccggtc gtctgtgca cctcaggcgc ggtcgcctg cgcgtcgac gcgaggtcac 54900
 cgaccccgcg tccaccgcg tgtggggcgt ggtgcgggccc gcgcaggtcg agcagccga 54960
 ccgggtccgg ctggtcgacg tcgagccggg ggcgcaccg gtgtcacct cgcgcgagcc 55020
 gcaggtggcg ctgcgcggc ggaccgcga cgtgccagg ctggtccgc cccgcgcgc 55080
 cctcccggcg ccgaccgca cgtctggcg gctgggtcc gaccgcccc
 gcacgtgga 55140
 ctccctcgcc ctgctcccgg acgactccgg cacggccccg ctgccccg gcgaggtgcg 55200
 gatcgcggc cgccggcgcc gcctgaact ccgcgacgtg ctggtcgcgc tggggatgta 55260
 ccccggtcgc gcggtgatcg gcgcggaggg ccggggtgtg gtctgtggagg tcggccccgg 55320
 ccccgacgac accgacgcg gcgacaccg ccccgcgac accggctcgg gcggcctggc 55380
 cgtggcgac cgggtgatgg gcctgttccc cggcgcgttc ggcccgctgg cgtggccga 55440
 ccaccgaatg gtgaccgga tgcggaggg ctggtcgttc accaccggcg ccggcgtgcc 55500
 catcgcttc ctgaccgcc tctacgggt cgcgacctc
 ggccgggtca ccgcggcgca 55560
 gaccgtgctg gtgcacgcg gcgcggcgcc ggtcggcatg gccgccgtgc agctcgcgcg 55620
 ggcttccgc gctcgggtgc tgggcaccgc gacccggcc aagcacgcg ccgtgaccgc 55680
 cctggcgctc cccgagtcac acctgtcct cagccgcgac accgcctacg ccgacctgtt 55740
 cggcccggtg gacgtggtgc tgaactcgt caccggcgag cacgtggacg cctcgtggg 55800
 gctgtcgcg gcggcgccgc ggttctctga gatgggcaag accgacctgc gcgacccga 55860
 cgaggtcgcg aaggcgcacc ccggcgtcgc ctaccgccc ttcgacctgg gcggcgaggc 55920
 gcccgcgag cgctcgcg agctgtggc
 cgagctggtc gcgtgttcg aggcgggccc 55980
 catccaccg ctgcccacc ggccctggga gatcaccgc gcgcggagg cgttcggctg 56040
 gatgagccg gccgggcacg tgggcaagat cgtgtgacc ctcccccgc gccccgacc 56100
 ggacggcacg gtgtgtgca ccggcgccac cggctcgtc ggccggtcg cggcccgca 56160
 cctgttcacc gcgcacggag cccgccacct gctgtcgc tcccgcgac gcgagcaggc 56220
 ccccgcgcg gcggagctga ccgacgggct gcgcgggctg ggccgggacg tgcgggtcgc 56280
 ggctgtgcgac gtgcggacc gggacgcgt cgcgcgctg ctgcccacga tccccgcgc 56340
 gcaccgctc accccgtcg
 tgcacacggc ggccgtgctc gacgacggcg tgcctgcgc 56400
 gcagacccc gagcgcctg acgcggtgtt ccgcccgaag gtgcacgcg tcgcaacct 56460
 gcacgagctg accggcgacc cggccctgtt cgcggtgtac tctcggcct cggcgtgtc 56520
 cggcggcgcg gccacagca actacccgc cgcgaacgc tggctcgac gcctcgcca 56580
 cgtccggcg gcggcgggc tgcgcgcgac ctgctggcc tggggcctgt gggcgagga 56640
 cggcggcatg acggcgggc tggcgggccc accggcggg ccggcgggc gggcccgcc 56700
 gggagccgtc gcgcgctgt ccaccacga gggcatggcg ctgttcgac cggcgtcgc 56760
 gtcgggccc
 ccgtcctgg ccccgatcag gctcgacccc gccgcgtca ccgccgacg 56820
 cgcgcagcc cccgcgtcg tgcgcggcct ggccccccc accgcgcga ccgcgtcgc 56880
 ggccaccacc gacgacggc tcgcgggacg gctcgcgcg ctgcacggc ccggcaggca 56940
 gcggtgctc gtggagctg tgcgggagca ggccgcgcg gtgtgggtc tcgcgacccc 57000
 ggacgcccgt tcgccgggc gggcgttcg ggacctgggc ttgcactcg tgcggcgt 57060
 ggagctgcg aaccgctct ccgcgcac ccgctgcca ctgcccga ccaccgtgtt 57120
 cgaccaccg accccgtgg acgcggcgcc ccacctgtc gacgcgtgg gcgtcgc 57180

cgcgcccgcc ccggccaccc cggctcgtgac ggccgcgcgg gacgacgacc cgatcgcggt 57240
 cgtcgccatg ggctgccgcc tggccggcgg cgtgtcctcc ccggaggacc tgtggcggt 57300
 gctcgacggc ggctcgacg ccatcgcccc gtccccggac gaccggggct gggacctggg 57360
 gtcgctgttc gacgacgacc ccgacgcggt cggcaagtcc tacgtgcgcg agggcggggtt 57420
 cctggcgggc gggggcggtt tcgacgccgc gtctctcggc atctcccccc gcgaggcgct 57480
 cgccatggac ccgcagcagc ggctgctgct ggaggtggcc tgggagaccg tcgagcgggc 57540
 cgggatcgac ccgacctgt tgcgcggcgc ggacgtcggc gtgttcgccc gggcgggcgc
 57600
 gcagaactac ggcagcggcc ccggcccggt gcccaggggc ctggagggtt acctggcgct 57660
 gggcggcgcg acgagcgtgg tgtccggccg cgtctcttac acgctcgcc tcaccgggcc 57720
 cgcgctgacg atcgacacc cgtgtctctc gtcgctggtg gcgacccacc tggcggtgcg 57780
 gtcgctgcgc tggcgcgagt gctcgatggc cctggcggggt ggggtcgcg tgatggcgga 57840
 gcccgcggcg ttcgtggagt tctcccgga gcgcgggctc gcccgcgac ggcggtgcaa 57900
 gtctgtcggc ggcgaggcgg accgcacgac gtgggcccag ggccgcggac tgggtgctgct 57960
 ggagcgggtt tgggtggcgc gggcgcgcg gcacaggtg ctggcggtgc
 tgcgcgggtc 58020
 ggcggtcaac caggacgggg cgtccaacgg cctgaccgcg ccgaacggcc cgtcgcagga 58080
 gcgggtgacg cggcgggccc tggccgacgc ggggatcacc ccgacgcgg tggacgcgt 58140
 ggagggcgac ggcaccgga ccacctcgg tgaccgatc gaggcgcagg ccgtgctggc 58200
 gacctacggg caggaccgcg agcagccgct gtggctgggg tcgctgaagt cgaacatcg 58260
 gcacgcgcag ggcgcggcgg gcgtcgcgag cgtgatcaag tccgtgctgg cgctgggccc 58320
 gggcgctgct ccccgctccc tgcacgccag caccgccacc ccgcaggtcg actggtctc 58380
 gggggcggtg gagctgctgg cgcgggcgcg ggagtggccg
 gagaccgggc gtccgcgcg 58440
 gatcggggtg tctcgttgc ggggtgagcgg caccaacgcg cacgtggtcc tggagcaggc 58500
 ccccgagccg gaaccgcgc gggagggcga accgcgcgg gactccgcgc caggcccgga 58560
 gtccgttccg ccgctgacc gggccacgcc gtggctgctg tccgccgct ccccgaggc 58620
 gctggcgac caggccccc ggctgggtga cgcctgccc gccgagtggc gggcctccga 58680
 cgtgggctgg tcgctggcca ccacgcgggc ccgctggag cagcgggccc tggctgctggc 58740
 gcgggacacc gcgcgcgggc tgcgcgccgc gtccgcgctg gccgccggac gccccgacc 58800
 gcacgtggtc accgggaccg ccgacgtgga
 cggcaggacc gccttcgtct tcccggcca 58860
 gggcgcgag tggcgggca tggggcgga actcctggac gcctcgccgg tgttcgcga 58920
 acgctgcggc gactgcgccg cggccctgcg ccgctacacc gactgggacc tggtcgaggt 58980
 gatcacctcg gttggcgccg tggaggacgt ggacgtcgtg cagcccacca gctggcgcat 59040
 catggtgtcg ctggccgcgc tgtggcgctc gctcgccgtc caccggacg cgggtgatcg 59100
 gcactcgag ggcgagatcg ccgcgccac cgtcgcgggc tggctcagcc tccaggacgg 59160
 cgcaagatc gtcgcgtgc gcagccagct gatcgacgag cacctgaccg ggctcgccgg 59220
 catgatgtcc gtcgccctgc
 ccgcgagga catcgacctg accggtacc agggccggtt 59280
 gtgggtggcc gccacaaac gccccaccgc gaccgtggtc gccggggagc ccgacgccct 59340
 ggcggagctg cgggacgcgc tggaggcgga ggcgcgacc cgcgtgatcc ccgtcgacta 59400
 cgccagccac accggccacg tcgacgcat ccgcgaccag ctgccccga tgcctcgcca 59460
 cgtcaccccc cggcccgccg agatcccgtg gctgtccacg gtgaccggcg agtggatcac 59520
 ccccgcgac gacgacccg actactggtt ccacaacctc cggcgaccg tccacttcgc 59580
 cgacgggatc accacctgc tcgacgccgg gcaccgggc ttcgtcgagg tctccacga 59640
 cccgtgctc
 accccggcgg tgcaggagcg ccgcgaggcg aaccggcggc tgcgcaccgt 59700
 cgccgtgggc acctgccc gcgcggacgg cggcgcgag cgggtggtgg cgggcctggc 59760
 cgagctgctg gcgcgcgggg tggcgtgga cccggcgcg gtgttcccc gtgcgaggcg 59820
 ggtcgcgctg ccgacgttcg cgttcgggca cgagacgttc tggctctcgc gggcgctgcc 59880
 cgacgcggcg ccggtgccc agggcgggca ccgctggcc ccggtggtgg tagcgatcc 59940
 gggcacgggc ggggtgatcc tgtccggccg gatctcgcg gccaccacc cgtggctgct 60000
 cgaccacgcc gtcgcggcg cggtgctgct gcccgcgcg gcgctggccg agctggcggt 60060
 ggcggccggc gacgagacc ggacccccc cctggaggag ctggtgatcg gcaggccggt 60120
 ggtgctgccc gaggacgggg agctgcggct ccaggtggtc gtggcgccg aggacggggc 60180

gcgccgcgag gtgcgcgcct actcccgcgc cgcagacgcc gcgccgtgga ccgagcacgc 60240
gagcggcacg ctgtcggcga agtctctcgt gcccgccgac gtcccgcccg ccccggtggcc 60300
gccccggggc gcggagccga tcgcgttgga cgggtttctac gaggccatgg caggggccgg 60360
ttacgggtac gggccccgct tccgggggct gcgcgcggcc tggcgcgacg gggacgacgt 60420
ggtcgccgag gtggccgtgc cgcgggcgca ggagcaggtg gcgggcccgt tcggcatcca
60480
cccgccgctg ctggacgccg ccttcacgc cgggaacttc tgcttccccg cgcaggacgg 60540
cgagcgggcc acgatgtgc cgttcagctg ggacgacgtg cggttgcacg ccaccggcgc 60600
gacgtcggtg cgggtgcggg cccgcgcggt gggcggccct ggccgcgccg cgtgaccgt 60660
ggcgaacacc gacccgagcg ggggtccggt ggccgggggt ggccgcgctc ggatgcgcgc 60720
ggtcagcccc gagcagctgg gcgcgccggg cgtcggcggt gacgcgctgc ggggtgctgga 60780
gtgggcccag gtggcggtgc aggcggcgga ccggtgggccc gtgctgggct ccgagcggca 60840
cccgacgtg gacgcctacg cggccgaccc ggaccggccg ggggcgctgc
tggtggacgt 60900
gggcgccttg ctgggcggcg acgacgccgt ggcccgcgcg cagcgctga ccagcgcggc 60960
gctggagctg gtgcgggact gggcgaccgg cggggacctg ggcggtgagc ggctggtgct 61020
ggtcacgacc ggggcccagg acgtgcgcga caccgcgcc cgcgaccgg cgcaggccgc 61080
cgtgtggggc ctggcgctc cggcccgtc ggagcaccgg gaccggttcg cgtggtcga 61140
cgccgacgac cgtccccg cgacgtcgc cctggcgccc ggggtcgcgct tcccgaggt 61200
ggtctgcgc ggcgagcggg gcacgcgcc gaggtggcg cgggcccgtc ccggcaggcc 61260
ggtggcgctg gaccggagc gcacggccct gatcaccggc
ggcaccggcg ccctgggcgc 61320
gctcgccgcc cggcacctgg tgaccgcga cggcgtgcgg cgcctgctgc tcaccggccc 61380
ccggggggcg gacgccccg gcgcggcgga gctggccgag gagctgcgcg ggctgggcgc 61440
ggacgtgcgg gtggaggcgt gcgacgtgc cgcggggac gcgctcgccg cgtgctcgc 61500
gtcgatccc gccgggcgcc cgtcaccgc cgtcgtgcac gcggcgggcg cgtcgacga 61560
cgccccgtg accgacctga ccccgagcg gctgtccgc gtgctggccc cgaaggtcga 61620
cgcgctggcc aacctggacg agctggtcgg ggacgggccc gcggtgttcg cggctctactc 61680
ctcggcgtcc ggggtgctcg gcacggccgg
gcaggcggcg tacgcggcg ccaacacctt 61740
cgccgacgcg ctggtgcgcc gacgcggggc caggggcccg gcgggcgtgt cgtggcgctg 61800
gggcctgttg gcaggcgcca gcgagctgac cggcgacctg gccggtgacc ggctcgccc 61860
caccgccggg ggcgggcttg tgccctgac cgcgcgccg ggcatggcg tgttcgacgc 61920
gggcgcggtc accacggggc ccccgcgct ggtcgtccc ctgccgtgg acctggcggc 61980
gctgcgcgcc tccgcgcgcg acgaggcggt gcccgcgctg ctgcgcgcgc tcgtccccgc 62040
cgcgccggcg tcgctctccc ccgccaccgg gcaggccgcg ccccgggccg ggttgcgggc 62100
gcgctggcc gggctgtcgg
gcgacgagca ggaggccgtg ctaccgagc tggtcgcga 62160
cctggccgcc gccgtgctcg ggcacggcga gaaggcgcg gtgggcccgg acgacgcgtt 62220
cttcgagatc ggcttcgact ccatgacggc cgtgcagctg cggaaccggc tgaacaccgc 62280
caccgggctg cgcctgccc cgcgctgct gttcgaccg ccgacgccg cgtcgccgc 62340
cgaggcgctg cgcgagcgac tggccgccga gcaatcgggc tcagggcaat cgggcgcagg 62400
gcagccgggc gcagggcatt caggcgagg gcagtcgagc gcagggcgat caggcgagg 62460
gcagtcacc gaccgaccg acgagaggtg agcaccagca tgatcgacgt ggccgagtac 62520
ctgcggcgca
tcggcgtgga gggcggcgtg ccgagcccga cgtggagtc gttgcgggcg 62580
ctgcacaagc ggcacctgat gtccgtgcc tacgacaacg gcggcgccgc cagccggttg 62640
ccgccgaacc gggggctcgc ggagatccc ctgcccgtg tgttcgcga cgtggtgacc 62700
ggccgcaacg gcggggtctg ctacgagctc aaccggctct tccacgccct gctaccgcg 62760
ctgggctacg aggtgctgat ggtcgcggcg gcgatccggc tggccgacga ccggttcggg 62820
ccggacgagg agcactcgt caacctggtg gcctggagc ggccgacctg gctggtggac 62880
gtggggttcg tcggccgctc ctacctggag ccgctggagc tgtcggcggt cagcaggag 62940
cagtacggct gcgctaccg ggtcgtggag gcgggggacg gcacgtggt ggagcgcagg 63000
cccagggacg gggcgtggca ggcggtgtac cgttccggc cggggcgggc ggaccgggac 63060
ggctgggagg cgggtgcggtt ggacgggctg gacgactacg gcggggaactc ggtgctggcg 63120
ggcaccacgt tccggggtcg ggcggcgagg aacgggcagc acgtgctgat cggccgccgc 63180

tacttcaccg tgcctggacgg ggtggagacg acgcgggtgc tctgaagaa ggacgagttc 63240
 gcccgcgtca ccgagtcgat catgatcggg gggtagagcg gtggcgggcg aggtcgagca 63300
 cgacgtgggt gtcgtcggct acgggccggt ggggcagctg ctgtcgggtgc tgcctggcgca
 63360
 gcgcggctgg cgggtgctgg tgcctggagcg ctggccgacg ccgttcgggc tgccgcgcgc 63420
 ggtcgggttc gacacgaggg cgaaccgcgt gctggcctcg gccgggctcg ggcccgcgt 63480
 ggccgagttc ggggagcccg cgggcgacta cgagtggcgc accgcgtccg gggagacgct 63540
 gatcgcgttc accgtgcggg aggaggggca ctgcggctgg cccgaggcga cctcggccta 63600
 ccagcccgcg ctggaggacg cgtgatcgc gcgcggcgag gcgtgccgg gggttcaggt 63660
 gcggcgccgc tgggaggtga ccgggctgac cgaccggggc gaccacgtgc gggtggtggc 63720
 caccgacccc ggccggggcg gcgtgaggct gacggcgcggt ttcgcggtcg
 gctgcgacgg 63780
 ggcaaacagc gtggtgcggg ccgcacccgg caccgacgtg accgacctgg acttctcgca 63840
 cgactggctg gtgtgcgacg tgcgctgca cgaccggcg cgggtgacgc cgaacaacct 63900
 ccaggtgtgc gaccggcca ggccacgcac gcgggtgtcg gcggggccag ggcaccggcg 63960
 gtacgagttc atcgggtgc ccggcgacga ccgggagcgg ttcggcacgc cggagagggc 64020
 gtgggagctg ctggcgtgt tccgctcgg gcgcggcgac ggggtgctgg accggtggc 64080
 cgtgtacacg ttccaggcgc ggtgggcgcg gcggtggcgg gcgggcccga tgcgtgctggc 64140
 cggggacgcc gcgcacctga tgccgccgtt cgcgggcgag
 ggcatgacct ccgggttcg 64200
 ggacgcggcg aacctggcgt ggaagctgga cctggtgctg gcgcggcgagg ccgggtcggc 64260
 gctgctggac agctacacgc tggagcgcg cgagcacgtg cggcacgccg tgacgatctc 64320
 ggtgggcctg gggcgggtgg tgtgctggtg cgaaccggcg gtggtgctgg accgggacgc 64380
 ggcatgtcg gcggcgcgcg agcgcgagct gacaccgggc gcgtcggccc ggtcgggtgt 64440
 caagcccctg gaggacgggg tgcctgaccg ggacggcgac ggcccccctc gcgccacgc 64500
 gggggccgtg gggccgcagt ggccgggtgg gcgcggcggg ccgggtcggc tgttcgacga 64560
 cgtggtgggg accgggttcg cgtgctcac
 caggggcggg ctggtggcgg ggccggaggt 64620
 gcgggcgcgg ctggacgggc tgggcgcgcg ctacgcgcac ctggtgcccg ccggggcggc 64680
 ggccgacggg ccggacgacg tggctgacgt gagcgggaac tacctgacgt ggctggagga 64740
 gctggacgcg gcggcggtgc tgcctgcacc ggacttctac gtgttcggcg cggccgggga 64800
 gcgcggcggg ttggccgggc tgggtggcga cctgcgcgcg cgggtggggg gacgccccgc 64860
 aggccccgcg acgtgccgcg ccggggcctg ctgcgcgtc acgtccggtc gtcggcgagg 64920
 tgggccaggc accagtcgag cacttcgag ggcttgcgga ccaccgcgtc cgggttcgcc 64980
 gccagcagct ccgcctcgtc
 cgtctcgccc cacagcgcg ccagcgccgg gtagcccgcg 65040
 gcgcggggcg tggccaggtc cgtcaggcg tgcgccacca tcaccaccg gtcggccggg 65100
 acgtcgagca ggccggtggc cagcaggagc atgtccggcg cgggcttggg gttcgcgacc 65160
 tgcctggagc cgatgatatg gtgcgaacgc ccgccatgc cgagggtggt cagcagcgac 65220
 cgggcgcgcg gccgcgtctt gccggtgacc acggcggtgc cgaagccgtg ctgcccgagg 65280
 tccgccagca gtcggcgcg gccctcgaac acctccact caccgccag ccggtagctc 65340
 tgcggagca acggaccctc catctccagc ggcaggtcca tgatccgcat gatgtccggg 65400
 aagtaccgcc
 ccaggtgccg gttgtaactc tcgaacggcg cgggcccgtc gccgacgacc 65460
 tcggcgtagg cgatctgaa ccctgccgc atgacggcga agctgttgac cagcaccgcc 65520
 tcgaggtcga acagcacgc cgggtcgtag gtgcgcggg ggacgtgccg gtggggcgcg 65580
 ggggtcggcg gggcgagggg gcgcggggcc gcgggcggcg gaaccgcggt gcgggccgc 65640
 tgcctcccgg ctccggcccg cagactcgg gggttggtct gtccggtggt catcacgggg 65700
 ctcccgtcgg gacgaggtcg accggcgcg gtgcgtcgtt gcgcgaccgc acggtgtcgg 65760
 cggcgcggtg gaccggtcg atcgcggcg cgatccagcg cggcccgac gccgcctcg 65820
 cgcgctggc ggggtcggcc aggcgggtgg gcaggctcgc gagctggcg tgcactcgg 65880
 cgccacccg ctccggggcg agctcgaccg ggggtggtgc gccgtcgggt gtgagcagga 65940
 gccgcgacgg gccctcggg ttcgggctga agccgaagg gcagcgagc tccgccgtgc 66000
 cgccgtgcc ctccacgcg acgaccgtgg tgcagcgcg ctggtgcgag gccagggcg 66060
 cgccacccc gatcgagatc ccgacgggg tgacgaggaa cccctggcg gtgtctcca 66120
 cgtcgccgac caccgggtcc accggcgccc cgtcgccgcg ccaggcggcc gggaacggt 66180

ggtcgttgac gaagtcgcgc gacaccgcgc cggtagctg ctcagctcc gcgcctccg
 66240
 ggtcgccggt ggcgcgcgc agcagcacgc gggcgggtgc gagcaggtgc cagccgaggt 66300
 cgaccagcgc gccgcgcgc gagcgggtgc ggttggtgaa ccagccgccc cggtcggga 66360
 tgcccttgga ccgaccag gacagctga cgtgccgcag cgcgccagc gacgcggcca 66420
 cctggcgcag cgcgcgcgc tcggcccggt gccgggcgc gctccgccc agcagcacgc 66480
 cgccaccggc ctgctcggc gcggtgagcg cggcgccctc ggcggaaccc aggcacagcg 66540
 gcttctccag gaacaccggg acgccccgc gcagcagacc ggacgcgacc ggcgcgtgca 66600
 ggtggttcgg cagggcgacc acggccaggt cgacctctc gcggcgagc
 tcctccacc 66660
 gctccagcgc ggtgatccc cgggagccgg gcacggcggc gcgggcctgc gcggacggct 66720
 cgaccagcgc gacgaccgg aaggcggggc tgcccagcaa ccggggcagc cacacctccc 66780
 gcgccacca ccgagcccg accaccgca ccgcaccgg accaccgtc ccggccctcg 66840
 gcccgtcgt cacaccacca cccccgtcc ccgcgccgc caccgcgcgc tcacgcgcc 66900
 gcgaccagct cgccacgac ggcggcaagc cggtagct gctcctcggt gccagcagc 66960
 acccggtggt gcagccacac gcagtgcgg gtgatctct ccgacaccgg gcaccgggcg 67020
 gccagctct cggtagtcag gtcgggcgc cgggtctcc
 agaacgcctg ggtgcggtag 67080
 accgcccga acgcatgaa cgccgggatc ccgcgccga ccagctctc caccaccgcg 67140
 ttgcgcgct cctcggtgac gccgggcac cggaacatc ccatgtagct cgggttgcgg 67200
 tcgctgcgc ggtcgacggt ctgcggcac acgcccga tccccgcag cagcgcgac 67260
 agcaccggc agcgggcctg cctggtcgc atctgcgagt ccagcctgcc gagctgggcg 67320
 cgcagcacgg cgccggagaa ctggtcatc cggaagtgc agcccgaggt gaggtggaag 67380
 tagcccggt cgccttggg cctgccgcag ctgtgcagga cgaacgcct ctcccactgg 67440
 gcctcgtct cgaacagcac ggccccgcc
 tcgccgcgc tcatcagct gccgttctg 67500
 aagctgaac tggcatcga ccgagctcg ccgaccgct tgccgcgcca gtgggcgcgc 67560
 tggcggtgg cgcgctctg caggaccggc acgcccgtgc tcgtggacag cttgtccagc 67620
 cggctcatgt cggcgaactg ccccgcctg tgccagggca tgatcgccga ggtgcgggag 67680
 gtgacggcg cctcgccggc ggcgacgtcc aggcagtagg tgtcgggtgc gacgtccacg 67740
 ggcacggcga ccgcgccgag gcgtgcacg gcctgcgagg acgagatgaa ggtgaaggcg 67800
 ggcacgatca cctcgccgcc ggggcccacg tcgagcacct ggagcgccag ctccagcgcg 67860
 tgcgtcccgt tggtagcggc
 gagcgctgg ccgcgcctg ggtactcggc gaactcgcgc 67920
 tcgaactct cgacctcgt gccgccgacc cgccaccact ggccctggtc cagcgcgcg 67980
 agcagggcg tcgctcgc gtgctcgtgc tcggccagg ccgggaactc gatgctgcg 68040
 tccggagaat tgctcatgag cccctgtccc gtcgttcgcg gaaatggcg gggggaattc 68100
 gccgcggcct gctttcgaa ttcgacgta ccgattccgc agatccgac caacccctt 68160
 gacctcccc taatcccc tgttccagc ccatcaccgc agcacgcggg cacagcgga 68220
 cagccgtgc cacaatggg gcgaacggga accggggcgt ccgcgcgcc cgcgcgct 68280
 ttcgggaaa
 ggtgtcaggc gtggcgagc tgcgtcgtg gaacgggcgc aacctcggca 68340
 tcctggggcg ccgcgaggtg tcggtgtac ggaccgacac gctcgcggac gtcgagaagg 68400
 cggtcggcga ggaggtcgc gggcgccggt ggtcgggtcc ctcggtgcag cgcaacggcg 68460
 agggccagct cgtggacgag atcgaggct cctacgacac ggtgggcgcg atcgtgaacc 68520
 ccggcgcgct gatgatggc ggctggagcc tcggggacgc gctggcgaac taccgcgcgc 68580
 cgtggatcga ggtgcacctg tcgaacgtgt gggcgcgcg gagcttccg cacgagtcgg 68640
 tgctggcgcc gctggcgagc ggtctcatcg cgggcctggg cgcgcgcggc taccggttgg 68700
 ccgccgcgc gctgctggac ctggtggact gaccgccgtc gcgcgcgagc ccggcccgct 68760
 gcacggcccc gcgcagcgag gacaggccgc cagcagcgc gggccgcagc ggcgcggtcg 68820
 ggtggccggg ccggcgaggt gcggcgagc ggtcggcgac cgcgtcgagc tatccgggca 68880
 cggcggcggc gaacccgcc ccgaccacgc acagcgaggg ccgcgccagc tcgcgcagc 68940
 cgacgagcgc ggcggccagc gccggggccc ccgctcgac cgcggcccgc gccacccgc 69000
 gccgctgcgc gagcggccc accaggtct cccgggtgac cggcgcgccg ccgagcctgg 69060
 cggcctcggc gagcagggc ggtccggagc cgaacgcctg cagcaccgc gcccgccgc
 69120

acgggcaggg cggcccgtcg agcgccacca cgacgtgccc cagctcgag gacccgcgt 69180
 cgggtccggg gaacggcagg ccaccggaca cgacgcccc gccgacgccc gtccccacgc 69240
 ccgctagac caggctggcg caccctggg caggggcctc ggcgagcgcg gcgaggtcg 69300
 cgtgctccg gacgagcacc ggggcggcca gcccgcgag gaaccccgcg aggtcgacgc 69360
 cgacccacc cggacggctg gggcaggccg tgacgacccc gccgtcgacg gtgcccggga 69420
 acgcatccc gacccgtcg agcgcgccc cggcccgccc ggcgaggtcg gcgacggcg 69480
 ggccgagcag gtcgaggtcg gcgcgaggat caccgtcccc aggccaccgg
 aagccctccc 69540
 gcagcaccag cggcccgcgt tcgagccgca gcgccacctt ggtcccgcg acgtccacc 69600
 cgagcagcgc ccgctcaca cccgacctc ccgctcgcc caccctcgc cgcaccacca 69660
 cccgcgggg ccgcccaca cgacgcccgc cgcacacccg ataccgcgc ggtcctcgt 69720
 cagcagcgc ccacaccacc accgacggg cctgcggtca cgacgcccgc acacctccac 69780
 ccagcgacc accaccgcg cgggcccgcg ctacgaggc caccgtcac gacgcccgcg 69840
 cccgcccagg cgcaccgcc tcggcccgcg gggcgctgcc gctctccacc agcggaacc 69900
 ggatcgccc cgtggccgcg ttccgcccgt gcagcgctc
 gtgcccgcg ggtcgggg 69960
 cgctgcccc ggtgccacc tcggtgatgc tgcgcgcgc ctcaggcac gccaggcagg 70020
 ccgacgcta cgcgtccgc ccgctcccgc cgcgcccag ctctccagc agcccgctca 70080
 cgtcgcgctg cactcgccg acggcgctc caccggcc cgcgcccgg ggtgtgccg 70140
 ggatgggggt caccgtgcc tcccgtgcc tgacgaggc ccggtcagc gaggccggg 70200
 atgagtcca cgaaccgacc ctgccacaac cggcgagct cgcgctcaa ctctcgac 70260
 ggcgccgcg cgaccagtc cgcagggtc gtacgcccgt ccaccggct gagcagcgcg 70320
 tgcgctgcg cgggtgtggc ggtgacggg
 ccgtggtcgt actccagca cactcgtgc 70380
 accggtcgc ccgcccgcg gctgcccgc cggggcgcg tgcgcagcg caggcgggtc 70440
 accggcgca gctgggcac cagcgcccgc aggtcctgt cggggcgggc ccgaccagg 70500
 aagccctca cgaccaggc gtccaggctg gtggtcagga agctggtag cactcgtcc 70560
 aggtctcgc gatcggtc ggcgtgtgt ttgaacagg tgttgagcag caccggggtg 70620
 ccggtcagct cgcgaaccg cgcaccagc cgggtgaagc gctctcccga ctcgggcgtg 70680
 acgacctga cgcgcccgt gccgtccag tgcgtgacc cgcagctc gggccgctg 70740
 gcgggcagca ccggcaccac
 gaacgacatg aactcgtgt gcccagcgc cccggacagg 70800
 tcgaaccagt ccgcccgcg ctcggcggtg accacggcg cgaacggcg gaagctctcc 70860
 cgcttctca ccatggcgt gatccgctc tggttctcc cgggcccggc gtccgcatg 70920
 atgctcgggt gcccagcgc gcgcccgc aactcgagc ggccgtgcgc ccagcccagc 70980
 acctcggct cggcgagcag ctccgcccgc gtctccacc ggtccaccag cggcgtcacc 71040
 tccaccacc gcgaccagtc cgcgagccgc cggcgacct gctcgtccgt gccgaggtcc 71100
 ggcccagcgc ccgcccagc cagccgcgc gacggccgt ccagcacgc cagcgcgcg 71160
 gctcggcgt
 acgcccgcg ctccggcg cccgctcgt gcgaggcggg gtggatgaac 71220
 acctcgtga acagcccgc cttaggatg cggccgtga gcgtggagt gtggcgacg 71280
 ccgcccga acgagcgt gcgagcccgc gtgacctcg ccagtgccc gagcacgtgc 71340
 agcgcgatct tctcgtcgc ctctgcagc gcggcgcgga agtcccgtg cgcctggctg 71400
 aacggctcgt ccttgcggc cggccggaac cggcgcgga ccagcgcggg ggtgaccagg 71460
 ttcggcacct tgggtgtgc gatcaggtc tactcgccct tgtcgcgag cgcgtgcagc 71520
 ccggaaga cctcgcgta ggtcgacggg tcgcccagc gggcgagccc catgacctg 71580
 tactcgtgc cgaagccgta gccgagcagg aactggcgt tcaggtacag cccgccagg 71640
 gacttctca cgggtagtc gtgcagctt tccaggtgcg gccacgcgc gtggtagacc 71700
 gtgcccaggt tgcctcgc ccggcgtcg aagatacca ccagcgctc gtccgcgcc 71760
 gagtgcaggt aggacagta ggcgtgcgc tcgtggtgcg gaacgtagac gagcttgtcg 71820
 tcggcgagct ccagccgag gtctcgcgc agccgtgct tgatcagtc gcgggagaac 71880
 cgcagcgga cctcgggtg ctcggtgtg acgtggtga gcaccagtc gaggtggtcc 71940
 tcggggaagt agtagccgac cgcgtcgac tcgtccacg tcgccccgc gagcgccagg
 72000
 cactcggga tggcggtgga ggggaactt gtcgtcttct tgacgcggt gagccgttc 72060
 tctccaccg cggccagag ctgcccgtc cgcaccagg acgtgccgc gtcgtggaag 72120

aacagctccg acatcgacgg gacgaggtcg gtctcggcgg gcgagaagtt cccgttgatc 72180
 ccgagcacga gcatgtggca tcaccttgat ccgggaggcg agggctgggg cgcggagggg 72240
 gtgcgcgtca ggccgggggc gcgacggcgg cgaggtcggg cgaggtcagc cgcagcgcgg 72300
 tgggcgcggg cttcgcggtc ggcacgaggt ggaagcgctc cacgccctcc tcggtgggcg 72360
 cgggcagctc ggccggcgag gcgcagtcgg cgggggcgaa cccggcgaac
 cggtaggcga 72420
 tctccatcat ccggttgccg tcggtgcgcc ggaagtcggc gaccaggtgc gcgcccgcc 72480
 gcgccgcctg gtccgtgagc caggtcagca gcgtcgaccc ggccggcagc gagacgacgc 72540
 ggccagaggt ggccagcagc ttgaggtgcc acaccgcgg gcgccgctcc agcagcacga 72600
 tgccgaccgc gccgtgcggc ccgaaccggt cggacatggc cacgaccagc acctcgtgcg 72660
 cggggtcggc gacgaggccg cgcagcgccc ggtcgtcgta atgcagccg gtggcggtca 72720
 tctggcttgt gcgagggtc agtccctcga cgcgggtcag gtccgcctcg cccgcgcgcg 72780
 cgacgaccac ctccaggtcc aggggtgcga ggaactcctc
 gtcgggcccc gtgaagccct 72840
 cgcggctggc gtgcgctcg aagcctgcgc ggtacatcag ccgccgctgc cgcgagtcgg 72900
 ccggtgaccac ggccgggctg aactcggggc gtcgggcag ggaggcgacg tcggcctcgg 72960
 tgtacaggcg cacctcgggc agggcgccgg ccacctcggc gcgctcgacg gggctgtcgt 73020
 cgacgaacgc gatcgtgcgg tggcggaagc cgagccggtc ggcatggcg cgcaccgacg 73080
 ccgacttggc gcccagccg atctcgggca gcacgaagta gtcggcaagg cccagcgctt 73140
 cgagcagggg ccaggcgtgg tcgtggtcgt tgcggctggc cacggactgc aggacgccgc 73200
 gcccgtcgag cgcggtgatc acctcgcgga
 cccgctcgaa cgggacgacg tcggcgtcct 73260
 ccaggagggt gccgcgccac aggggtgtgt ccaggccca gaccaggcac ttgaccgtcg 73320
 gtgcgggggt ctccgtcagc gctgctgctc cctgagcgga gttcggtgc gctggtcaag 73380
 tccgcgcggg gcccggtcgc gcacgtgctg ggccgagcag agctggcaga tctcgagggt 73440
 gccctcgatg atctccatga gcttcgcgtc ccggtgcgcc cgcgccacca cgtgcccgctc 73500
 gctggcgccc gcggagccga gcagctgcac cgcgcgcccg gaccggcggg cggcctcgcg 73560
 cgaggccagg tacttggcct gcaccgccgc caccgccagg tccggcgagt tcgcgtcca 73620
 cagcgcgctg gcgtgctcgc
 tcgcgcgggc ggccagctgc tcgccgacgt gcaactcggc 73680
 caggtgccgg gcgacgagct ggtggtcggc cagcacgccg ccgccctgct cgcgggtcgt 73740
 ggtgtgctcg acggcgccgg ccaggcaggc gcgcaggatg ccgacgcagc cccacgccac 73800
 cgacaccgc ccgtaggtca gcgcggcggt gaccaccagc ggccagcgga gcccggtgcc 73860
 gcccgaggagc tcggcgccgg gcaccgcac cccgtccagg gtgatccgg agtgcccggc 73920
 ggcccgccac ccgtgggggt tcggcacctc ctccaccgc acgccggcg cgtcgcgggg 73980
 cacgacgacc gcgctcgccc cgccccgta gtccccgaag accaccagca ggtccgcgta 74040
 gtggcgggcg
 gtgatccagc acttgccggc ggtcaccacc acctcgccgt cgcgggtgc 74100
 ggtgatggtc gtggtcatcg cggacaggtc gctgcccgcg cccggctcgc tgaaccgcac 74160
 cgccgcagc ccgcccagg tgagcctcgc caggaaaccg tcgcgctgct cgcgggtccc 74220
 gagcctgcgc gcggtccacg ccgccatgcc ctgggaggtc atgacgctgc gcagcgagcc 74280
 gcacagctcc ccaccgacg ccggtcagtc gccgttctcc cggctgcca gcccgaggcc 74340
 gccgtgcggg gcgccgacct gggcgcacag caccgccagc ccgccagct ccaccagcag 74400
 ctgcgcggc agctcgccc ccaggccca cccggcgcg cggctgccga cgcgctcggc 74460
 gaccagcccg gccagtgcca cggcgtcgt caccgccccg cctcccgcag ccgacgacc 74520
 agcgtggtca tgggtgtgac ggtgcggaag ctgtccaggc ccaggctcgg cccgtcgatc 74580
 acgagctcga aggtcgactc caggtgcacc acgagctcca tcgcgaacat cgaggtagc 74640
 gtgccggagc cgaacaggtc ggtgtccggc tcccaggtct gcttggtgcg ctccggcagg 74700
 aacgcctgca cccgctcggc caccgcgtcg gcggtgagcg cgcggggctg ggaggaggctc 74760
 gtcacagctg tgcttcccg tagtcgtaga agccccccc ggacttgcc cgcaggtgcc 74820
 cgtcgcgga cttgcgcagc agcagctcgc agggcgcgga gcgggggtcg ccggtgcgct
 74880
 cggccagcac gcgacgagc tcggccaggt tgtccaggcc gatcaggtcg gccgtgagca 74940
 gcggtcccgt gcggtggccg aggcagtcct gcatgagggc gtccacggcc tcgacggagg 75000
 ccgtgccctc ctggacgacg ccgatcgct cgttgatcat cgggtggagc atccggctgg 75060
 tcacgaagcc ggggcgctcg ccgacgacga ccggtgtgcg ggccagctcg cccagcacgc 75120

ccacgagggt ctccagcgcg tccgcgccgg tgcgcgcgcc ccggacgacc tgcacctgg 75180
ggatcaggta cggcgggttc atgaagtgcg tgcgatcag ccgcgccggg tcggggacgt 75240
gccccggcag ctctctgacg gggatcgagg aggtgttga caccagcggc
acgcgcggcc 75300
cggtagagcg ggcggccccg gccagcacct cggccttgac cggcagctcc tccgtgaccg 75360
cctccaccac cagcgagacg tccgcgacgt cggcagcgga ggtggtggtg agcagctcgc 75420
cccgtcgcg gtctctgggc agcgcgcgca tcagcctggc catgcgcagc tggcgggcca 75480
ccgctccccg cgcgcggccc accttggccc ggtcggcttc gaccagcacc accggcacgc 75540
cgtgccccgac ggccaggaggt gtgatccca ggcccatcgt gccgcgcgg agaacggcga 75600
gcaccgtcct gccgtctcgc tctcccatcg cgtcccccg ccgcggccac cgcggccgcc 75660
gtccggtccg cgcgcgctcc cggcacgcgc attccacct
cgatcgtgtg ccgggaaagg 75720
cgcgcggcgc cccctgacct gccccctga accccctca acggaaccgg aaatcgaatg 75780
tcccgaacgc gccgtcaaat cgtcgattga cagccgcaga actgttcata gactgtggcg 75840
gcagtaccga tctccgaatt ccacggaaga gtctctcccc atggctcagc agatcagcgc 75900
cacctcgaa atctctgact acgtccgcgc gacctcgttg cgcgacgacg acgtgctcgc 75960
cggctcgcgg gagcggaccg cggttctccc ggccgcgtcc gcgtgcagg tggccccgga 76020
ggaggggcag ctgctcgccc tctgtgtgcg cctggtcggc gcgcgctcgg tcttgagggt 76080
cggcacctac accgggtaca gcacgtgtg
catggccgc gcctccccg ccggcggacg 76140
tgtcgtgacc tgcgacgtcg tccggaagtg gccggacatg ggccaggccgt tctgggagcg 76200
ggcgggctgc ggcgaccgca tcgacgtccg cgtcggcgac gccgcgcca cctggccgg 76260
cctgcacgcc gagcacgcgg tgttcgacct ggtgttcac gacgcgaaca agtcggatta 76320
cgtccactac tacgagcgcg cgtgacgtc gctgcgcacc ggccgctgg tctcgttga 76380
caacacgtc ttttcgggc gggtcgccga tccgtccgcg accgatccgg acaccaccgc 76440
cgtgcgcgag ctgaacgcgc tctgcacgc cgacgagcgg ttcgacatgt gcctgctgcc 76500
gatcgcgac ggaatcacgc
tcgcctgaa gcggtgaacc cgcgcgaatc gcgccgaatt 76560
ccccggaga gaaaggccgc cgcagtgctt accgaggacg tggccaccga cctgcccgc 76620
taccgttcc tgcgggacgc gggcgactgc ccgttcgcgc cacccccgc ctacggcca 76680
ttacgggagg agcagcccgt caccagggtc cgcctgtggg acggcagcac cccgttctg 76740
ctcaccgtc acgaggtgtg ccgcaccgcc ctgaccgacc cgcgttcag ctccgacggc 76800
gccaaccgcg ccagccgcg cttcgtgaag ttcgacatcc cggacgacgt gttcaacttc 76860
ggcaagatgg acgaccggga gcacgcgagg ctgcgccga tggctgcgg gcacttcgcg 76920
agccgccccg
tggaggcgt gcgccccgcg atcaccacga tctgccacgc ccagctgcgc 76980
cagctcgtgc aggcgggctc ccccgccgac ctggtggccc actacgctt cccgatccc 77040
tccctggtga tggcgcgct gctcggcgtg gcgggccccg gcctggacga gttcgcgcg 77100
gactcgacgc gcgcccgtga cccgtccctg tccgcccagg agatggcgcg gccatcaac 77160
tcgatggtcg ggttcgtgga cgacctgtc gcggccaagc ggccgcccc cggcgacgac 77220
ctgatcagcc gcctggtgct ggacttcgag cgaccggcg agctgaccg gaagcagctc 77280
gtcgccaccg tgatggtcgt gctgctggcg ggctacgaga ccaccgcgaa catgatcgcg 77340
ctgggcacga ccgcgtcct gcgcgacccc gagcagctgg ccttctgcg cgcgagccc 77400
gccggtttcg ccaacgcctg cgaggagctg ctgcgtggc acaccatcgt ccaggacggc 77460
accggccgcg tggccctgga cgacgtcgag ctggacggcg tctcgttcc cgcgggctcc 77520
ggcgtgatcg tcaacctgcc cgcggccaac cgcgacccc acgtcttccc cgatcccgc 77580
cgctcgacg tgaccaggca caacccccg cggcacttcg cgttcggcta cggcgtccac 77640
cagtgctgg gcacgtgct ggcgcgctc gagctgcaga tgcgctgga gacctgctg 77700
tgcggcctgc cggccctggc gcctgccacg ccgttcgagg acctggactt cgcctggag
77760
tccatgaacc tggcctgcg ctcgtgcgc gtacgtggt gagcaccgac cgtccaccag 77820
gggagagcgc atgaccgca ccaacccac ccccgacctg gcccggagt tcccgatgcc 77880
caggtcgccc gagcaccgt tcgaccgcc cctcgaact cgcgaggcg aggaggcggg 77940
cggcctgtcg cgggtgcgc tgtgggacgg cagcaacccg tggctgatca ccaagcacgc 78000
ccaccagcg gagctgtgc gcgaccccc cctcagcgcg gacttctgc gccctggcta 78060
ccccagccc attcgcacg aggacaagtc gacgttcac agcagcttcc cgctcatgga 78120

cgaccccgag cacaaccggc agcgccggat ggtcctgggc ccgttcaccg
tccgaaggt 78180
ggaacgcctg cgcccgcttg tgcagcggat cgtcgacgag aagatcgacg aactcctcgc 78240
gggcccacac ccggtcgacc tggtcaccgc gttcgcgctg cccatcccgt ccctcgcgat 78300
cagcgccgtc ctgggcctgc cctactccga ccacgaggtc ttcgagcgca acagcgccgt 78360
gctgatccgc caggacgtgc cccgcagga acgggcccag gccagcgagg agctccagca 78420
ccacctcgac cgcgtcctgg gcgacaagat gaccgacccc gccgacgacc tcctctccga 78480
cctgggcgca cgggtgctgg caggcgagat cagcaggccg gaggcggtcg acatgaccgt 78540
cctggtgctg gcgggcgggc acgagaccac cgcgaacatg
atcgcgctcg gcaccctcgc 78600
gctgctccgg caccgccacc agctggcgct gctccaggcg ggcgacgacc ccgccctcgc 78660
cgagaccgcc gtcgaggagc tgatgcgcta cctgacgatc tcgcacaccg ggatgcgccg 78720
cgtggcgacc gaggacgtgg agatcgacgg ccaggtgatc cgcgcgggcg agggcggtgt 78780
gctggcgacc tcgatcgcca accgcgaccc cgacgtctac gacggcgacc cgcacgtgct 78840
ggacctgcgc aggccgtga agcagcactt cgcgttcagc ttcggcaccc accagtgcct 78900
gggcccagtc ctggcccga tggagctgca ggtcgtcgtg aacaccctct accgcccgct 78960
cccgaccttg cgactggcga ccgcgtgga
gcgcatcccg ttcaagcacg acgggatcgt 79020
ctacggcgct tacgagctgc ccgtcacctg gtgaccccg cccaccagac ctctgccac 79080
gcagacctcc cgcaagccga cccgaaagg ccgttccat gagcgacacc acgtgtccg 79140
tgcccgctcc cgaggaggtc ggcaagctct acgaccagat cctgaaggac gagcacacct 79200
acgagcagtt cgagaagttc aaccaccagc tgcacatcgg ctactgggac gaccgcacct 79260
cggacgtgcc catgcgcgag gccgtggtgc gcctgaccga gctgatggtc gagcgctgc 79320
gggtggacgc cgaggaccgc gtgctggacc tgggctgcgg catcggcggc ccggcgaccc 79380
agatcgtgcg caccaccggc
gcacgcgtcg tcggcgtag catcagcgag gagcaggtca 79440
agctgccac caggctggcc accgaggcgg gcgtgggcga ccgcgccacc ttccagcgcg 79500
ccgacccat gcggctgcg ttcgaggacg agtccttcga cgcggtgatg gccctggagt 79560
cgatcctgca catgccgtcc agggagcagg tcctgtccga ggcgcgccgg gtcctgcgcc 79620
ccggaggccg cctggctctc accgacttct tcgaacgcgc acccgccacg ccggggatgc 79680
accccgcat cgagggtctc tgccgaaccg cgtgacgac gatggccgac gtggacgact 79740
acgtgccgat gctgcaccgg gtgggcctgc gcgtgcggga gctgctggac atcaccgagc 79800
agaccatgga
acgacttgg cgggagaccc tggagatcgt cagccagaac gaccgcccgg 79860
tcgacttcga cctggcgagg ctgttcggcg tggacagatt cggtgcctg ctggtcgccg 79920
cagaccgcc gtgaggccg tcccagaggc cgtgggcgc ctgtacgac acctgctgga 79980
ggccgagctg gagggggcg cagccgaccc gaacctgcac atcggtact gggacgcgc 80040
ggactcgcca acgccacgcg cggaggcggt agtgcgctc accgacgaac acgtccgccg 80100
cctgcacgtg accacgggcg accgagtgt ggacgtgggc tgcggcgtag gcggcccagc 80160
cctgcgcgcg gtggacctga ccggcgccca cgtgaccgga atcagcatca gcgcccca 80220
gatcaccac gcgaccacc tggccaagt cgcgggccac gcggacaaca ccaagtctct 80280
ccacgcagac gcgatggccc tcccgttccc ggactcctcg ttcgacgcgg tcatggcgat 80340
cgagtccctg atccacatgc ccgaccgcga gcgggtcctg aacgaggcaa gacgcgtact 80400
gcgccaggc gggcgactgg tcctcaccga actgttcgaa cgcgccccaa gacccaccgc 80460
cagacaccca gcgataaccg agttctgccg agcatcgatg gtgtccctgc ccaacgcaga 80520
cgactacccc gactactac accgagcagg cctacgccta cgggaactcc tggacatcac 80580
cgaccacacc gtccaacgca acttcgcgca actggccgat ctggtaggcg acgcgaaggg
80640
cctgctgttc caccacgcg acctggtggg cgtcccagaa ttcggctgct tcctagcagt 80700
agccgaacac ccgtaaccac gcggtggcgt cccccacgga cgccaccgcc tcgcgggctg 80760
cggggcgagc gcagcgagcc cgcgcagccc cactcccgcg tccctcttct ccgtgtggcc 80820
tggcgcatgt caaatccca ctgactgcca acagatcatg tgccgtttga gcaggtcagc 80880
gacttgtcgc gcttcggtgc cttaaggccg agctgggatg ggggcactgt ttccggactg 80940
agcggggcag cttggaaggt ggagttcggt gagcagaggc agcacgtccc gtgcacgta 81000
gaggtggttg tacacgcggt ggccgggacct gcgcagtagg ccgtatccg
caagctgctc 81060

caagatcagg agtgcggcgc ggtgcgtata gccgagttcg gcggtcagca tgggtgctgtt 81120
 gagcagtgagg gcgacgagca gcggggcgagg aagcgctttg accttcctcc gcccggtgag 81180
 catcgccag gtggcgatc gcgcgagcct caccgagtcg ggtcacctca tgcaggctgg 81240
 cgctcaacct ggaacgcgcg actgtttcgt ccagacgtgc caggcggtg taggcgtgca 81300
 acaaggtctt gctggtttcg gagcgagtc tgagccggga ccaggacgac aactccgca 81360
 tcctcgcgga cggggcgagg ctctgtctt caccggtggt agttgacctg cgcggggcgg 81420
 aggtgcccta ttgtgccgg gacgaggtca tccccggag
 cagtttctca gcacgccgtg 81480
 aatcgagatc cggggcgctg agcgcggtga acgctcgtc cagcgagtcg cagcgcacg 81540
 tcgtcctgac atcgggccgc gcatggcccg aggtggtcag cggtagcgag gaaggcgagg 81600
 cagggtgtgt gcgagacact ccgggactcc gtgcagaagg tcgacagcg gaaagggttg 81660
 aactgcgaat cgcaaagcgg ccggcccgca aagggtcgg gccgcctgag acgattggtc 81720
 acgctgctgc ggcggggtcc gcccggaact gcttgccgag caggtagatc gccccctgt 81780
 gatcttctgc cagcgctcc agaaccgaga gcagtcgtcg ggctgagct gcatggccaa 81840
 taccatctgc gcgtaccca gaggtgtcg
 ctcccgttca gggcgagca tttccacgc 81900
 ccgcttgcc tccttgccg ccggcccaag atcgccgagc atcaggtagg tgcccgacaa 81960
 cccgacaacc ctgctgcca acgcggttc cggcaccgc cgcgctcgt cggcttccaa 82020
 cggccgaaca ccgtgccca gcacggcccg cgcgttgccc tcgctcgtct ccagccatcc 82080
 catgacaccg tgcgttcgg ccagtgaaca cgatcggtg tcgggagcgg tgttgacaa 82140
 cgccagctcc agcgctcgt cagcagcgt accgaccaca gcgcggcgcc gatgtccagc 82200
 acttcttgcc ggtaccgcg cagcagtcg gcggtgcgt gcacggccac gacttccgc 82260
 cgatgcacga tcagccactt
 gtacccgcg aaggcgtgt cgaacagcgg ctctgccccg 82320
 acctgaagc cgtcgacga cactcgcgc aaatcacga gcagtttccc tgcggccaag 82380
 gtgcgccgat gcaggtacct gcccagcgc tccaactctt gcgggaactc ctgctgcaca 82440
 gcccacgca gcagtcctg ggcttggtct gtctctgag cgcgagggc accggccagc 82500
 cggtaacgcg aggaggtgaa ctcggggtgc gtgatgtcg ggtgaagtgc agtccacga 82560
 ggctgcgtca gcaccagcag gccctggttc acccagtcg gcgcgtgtg ggcggtctcc 82620
 tcgacggtga ttcacgcat cgcggccaac gacgaggtcg agaccaggg gtccggcagc 82680
 aggtccagca
 atctcagtc ttgcggaatg ggcacaagag tgtgatcat cgatgccct 82740
 cccgaggagc ggcgatgatt ggagtggcga acagaagggg aaacgccagt tcgccgggtt 82800
 ccggcggtcc acgcgcttc gcccgccac ttggactccg accggcagaa gttaccggc 82860
 aaggactctg gtgacgtgg agcggtgcac gcccatcgt tcggccaagg cgtagtctc 82920
 gtggtaacca gcgaactgag ctagtcttcg catctgtcg ccgcgcacc cgacgacct 82980
 ctgtatctt tcggtctcg tgcgttgtc gtgcagatgt ccgcgctcg gcgctgacac 83040
 cgttctctt gagatcgccg agctgaatgg gggatgcttc gacgtaaggc gttgcgtatg 83100
 cgcaacaggt caggcggtc cgagtcctcc cattaccgag gtttcgctg atcgccgagc 83160
 gggcccgct cgaagaagtc caatcgagc ggcatccct tcgattgac aatagcgca 83220
 cgggtgtcg tcgacatcg ccaccgcct gtcctgacg tgccacgagc agggaggagc 83280
 gacctcctc gggactgcac cgaccgttc tcctgtccg ccgattcagt tgcatcgc 83340
 cagctaggt gccggtgag gcccgaggg acaacgaagg gacaagtcga acagccagg 83400
 tgcgaggtat ctgaaatag ccgaatcct ccgtcgca gacggtcgc atgccactg 83460
 acgaacagtc cagggtgtc ggagagcgca tagccgtcca acgcaactg gctggctga
 83520
 ctacgaagc tctggcgaag gcgcacacg tcagcctcag cctcatcaa ggggtggaac 83580
 agggaaggat tccgcctct cccgcgctcg tgtccaggt ctgcggggc ctcaaggtcg 83640
 aggcgacgat ctgtggtgg cagccgtacc gccccagga tcggagcagt ctgcggtc 83700
 actccgtcat cccggtctg gcgcgagcct tggcggtcct ccggttgccc gctgatgag 83760
 gcatcagccc tcgcggtac gacgagctgg ccggcggtg agccgcccg tcgaagatgc 83820
 gccacgccg gacgttgag gtctggggg ctgaactcc cggcctgct gacgagatcc 83880
 gctcgccat cgacgaggt cgggaggtg agcggcagcg cctgttcagc
 ttgtggtgag 83940
 aggcatacgc agccgctggt caagtcgct ggaagctggg ttacgaggc ctgtcctcc 84000
 tggcgacgga gcgctggag tggcgggcca aaggtccg cgatccgct gcgatggcg 84060

cagcggactt ctacatcgcc ggtgagctga tgcagcagc ggagtggcgc ggcgccctct 84120
 cctacctga cggctccgt cgccgcctgg agcacgtggt gcgcaaggac gacgaggcgc 84180
 ccttctcat ctacggagtc ctgcacctga agtcggggct cgccggcgca cgggcccggga 84240
 aagccgacga atccgacgcg cacctcgctg aagcccgtgg catcgcggaagggtgccgc 84300
 tgggcagtgga ccactaccgg ctgcgttcg accgggactc
 ggtcaacatc tggaccgtgg 84360
 ggctggcagt ggagcgcagt gacggcacgg aagccgtcaa acgagccac gggatgcgct 84420
 tcagcaagac caccctcggt gaacgcgtgg gccaccacta catcgatctg gcgcgcggct 84480
 accagctgca cggagaccgt gaccgcgcc tgcacacct tcagatcgcc aggcgaacct 84540
 caccgcagca ggtgcgtac caccgcagg tcagggaac ctttctcag ctgcgggaac 84600
 aggaccgcag gcctcggat tccctggcag ggctcgcgcg ctggatcggt atgccggtgt 84660
 gacaggacgg cgagctgacg tcgctgttga ggggcagccc cccatcgcc gccctcaac 84720
 agcaggtgcc ggtacgtccc tcacagcgcg
 acgtgacga tcaggctggc gaacatggcc 84780
 acggccagcg cgatcatctg cttgggcgcg cgcggaaga agagggaccc caccaccgc 84840
 agtggtaaac cggcaccgag caccaacggc caccggccgg cagagccgt cccctcttt 84900
 tttggaggtc tgccccgcg gcgagcgctg ccttcagct tcaagctct cactctcga 84960
 tcttctggtc cgaacacccc ccgaccccc actacgatcc cccatgggg gctctgatca 85020
 tcgcgtagt gctgctgctc gtcttctcgc tgcaactcaa gcgggaaccc agacgactgg 85080
 gcaacggcgt ctacctgctg atgagcctgg cgttcttcgc cctctggctg ctacacctcg 85140
 ccacccccca gaccaggacg
 ctggtggtag gcgcgtagt cctgatcgcc ccggtattcg 85200
 tcaccgtgat cgcctgttc ctcatcgcca acggcgtcac cctgctgcgc cgcgagggcg 85260
 tcaaaccagg caacgcctc tcttcggcg caggcacgc catcctgtgc gtcgtaggcg 85320
 gcctgtcct ggtcctgctc tccgcctgc gcgaagctc cccgacccc tgggtgctgg 85380
 cagcagccgg ttcctggtc ctctggccg gctacctggg cttcgcttc accctcttc 85440
 tgcttactc cgtgctctac ggccgagtc gcaagcgac ccggcacacc gcgatcatcg 85500
 tcctgggcgc gggcgtcccc ggccggccgag tgaccccgct cctggcaggc cgcctggacc 85560
 gcgcctgaa
 gctctaccgc cgcgccgag ccaagggcgc tttcccctg gtagtcgcct 85620
 ctggcggcca aggcacgac gaaccagcct ccgaagcgga ggtcatggcc aactacctcc 85680
 gcgaacgcgg catcccgac gaggccctc tggaagagcg cgagtcacc tcgacctggg 85740
 agaacctcc cctctctcc gccctgctc ccgaacgcgg cgtgaccggc agactcctgg 85800
 tcgtaccag cagctaccac gtccccgag ccgcgatcct ctccgcgcg gcaggcctga 85860
 aggcagacgt ccgcggcggc cgaaccgct ggtacttcgt gccgaacgc ttcctccgcg 85920
 agttcgccgc cctcctggtc cagtaccgca cctcaacgc cctggcagcc tgcaccgcac 85980
 tctcgtctt cccgctcctg gcctacggcg tctgaaaagc acgaccggc cgaccggaca 86040
 ccgctcaca gatccagcg cgccgaccg aagccacgt tgaaccggtc gcaccacacc 86100
 acgacgctgc gcagccccga caggccacg tctccggaa tcaggtagtt ctggttgccg 86160
 tcggtggcct tcatgggacc gagcgcgagg tagcgccat cgtcgtactt gccccactcc 86220
 ccaccgcgg tcgcgtcgga gagccagatg tgaggtcgg gccgctccga ggtggagaac 86280
 ccatccagcc gcagcacgc cgccgccccg ctgcgcagca cgggtggcggt gccccgcgtc 86340
 tcgtgctcct gggtagcgaa cccaccgtt gccagcaccg tcggtggtc ggcggtcgcc
 86400
 gacgagctcc caccggcggt cgtggcaccg ctgcccgcg ccgcccgggt gctcgacgcc 86460
 ccagccccgg tgctacccc cgcaccggtc gagacgtga actcggggg cagcgctcgc 86520
 tccgctcgc tgcggtcca caaccgccc ggtggaaca cccacagccc gacgaccgca 86580
 gccaccacca caacccccga caccgcccac accgctctcc tgcgcaccga accggracc 86640
 acgtccctc ccgttctccg cagacgacct gccacatgc cacgggtcgc gccgatgac 86700
 cacgaccacc gcgcccaccc cgcccacgc agcgactagg ctgccaccg ggttcgaccg 86760
 ccgatcccga gcgggttag caggcagccc accgcagttc gcgctagtgg
 gatggaggga 86820
 gcgggcccgt gtccgagctg gatgcagccg cgttggtcac ggtgggttcc gacgtggtgc 86880
 gcggggtgcc cgtgctgcgc gtgcggggg agatcgacac caacgtcgcc gacgaggtcc 86940
 gccgggcgt gctgcctgg ctggacgggt tgcgcgggcc aggggtgctc gacctgaccg 87000
 gggtagggt catggcctcc accgggttgt cgtgctgat cgaggccgcc cggcgaggc 87060

cggcgaagct ggtgctggcc accgcccagc gcggcgtgct ccggccgctg cagctgaccg 87120
ggatgagcgc gctgctccc acgcacccca ccgtggacct ggccgtggac gcccagctcg 87180
gggcccgcct ggccgggatg cccagcacgg cctgaccacc
ctcgggtccac gggcggcctg 87240
cccgcggacc accgcacgg cgccctgggg ggacgagatc acagctggtg gaagacgcga 87300
tcctggtccg cgcgcgcga cgccggtggg cgcgggcgct cccgccacgg cggcggaccc 87360
gcccccggtc cccaccacgg ctccggcacc ggccccgaca ccgacaccga cccagcccc 87420
gccccgggc acgaccacac caccaacccc ggtcctgggc gcaggtgtcg ccaccgccac 87480
cgccctgacg ctggcactcg ccggggcgcc agccccagcc gacaacagcg cgggaaaggc 87540
ggccatcatg gacgaggtgg acgccccaac caccaccacc accccggccg cgtggacct 87600
cacgccccgc ccaccctgg ccgaggtgcg
ccgtggacc ggcgcgctgc tgatcgacgc 87660
cgacgaggaa gcagcggacg acgtgctgct cgtggtcaac gagctggtcg ccaacgccta 87720
cgaccacacc acctccccac tcgcccctcg cctcaccacc acccccgagc acgtgcgcgt 87780
ggaggtcgag gacggctccc ccgaccacc acgcccggac ctaccgcgg gcctgcgcca 87840
gatcggcacg cgcggacgcg gcctgctgct gatccgccag ctgaccgatc gctggggcag 87900
cacgccccac cccggcgcca agaccgtgtg ggcgagctg ccgaacgtcc cggcgacctg 87960
agcccgacgc cccaccaacg aggccacggc ggatctcacg ggaagagcg gcgggggcac 88020
tcggggcgcg ttggacgccg
gcgactccc cggtgagggg tcggcgcgcg gagtggatga 88080
gcgtggcgcg gcagaggcc ggtccggcg acgagacggc catcagcagc ccgccgaccg 88140
gggcccgcag gctcgggcg cggcgccga gcctgcccgg caccgggccc accacggagc 88200
tgaccccag gacggcggtg caggcgccga gcgcgcgcct gcgggcccgc ccctcgaagc 88260
gcacctggac ggcggtcagc gccccggaga ccatgagcgc cgcgcccgc ccctggacca 88320
cccgcgcgcg caccagcgcc gggccgggtg gggtgaggcc gcaggccggg gaggcggcgg 88380
tgaagtggc gggcccagc aggtgggccc agcgcgcgcc ccggtatctg ccgaggtggg 88440
ccccggtgat
cagcaggacg gcgagctcg gcaggacacc gacacgggca cgaccgcgtc 88500
gatgtgcgtc gggcgcgcg agggcgcgga gacggcgcg ggcgagcgt gagggcccgc 88560
ccggcgccac tccccgtca cactccccgc cgcagcacat cctcctccgt ctcccgcgc 88620
accagcacc gcgcaactc gtgcgcacg cccaccacag gcggcctgcc caccggttg 88680
tagttcgac ccagcgctg gtggtaggcg cccgtaccg gcaccgccag caggtcccc 88740
gcgcgcacgt ccgcgggcag cggcacgtcc tcggcgagca cgtaccccgc ctgcagtg 88800
ctgcccacca ccgtaccgg cgcgcgccgc ccgcccggc cgaccaggcg caccgcgtac 88860

cggtcccgt acagcgcggg cctgggggtg tcgctcatgc cccgctccac ggccacgaac 88920
accgcctca cccgcgctt gacggcagcc acccggtaca gcgtcacacc agcgcccgcg 88980
acgaccgacc gccccggtc gatcagcagc ctcggcaccg gcacgcgcgc cagcgcgcac 89040
tcgtggtca gcgccaccg caccgggtgc gcgaaccgc caaggtcgaa ctccccctcc 89100
cccgcgaggt agggcacccg gaaccgcgcg ccgaggtcca gctgctcgat ccgcaccccg 89160
cacgaggcga tcagcccag catccgccgc gccgcctcct cgtacaccgc gacgtgtcg 89220
acctgcgacc cgacgtggca gtgcagcccc accagcctca gcgacggctg ctgaccacc
89280
cgcagcaccg cctccagcgc gtccccacc gccagggaga agccgaactt ctggtcctec 89340
accccggtcg ccaccgccc gtgggtgctc gggtcgacgc cgggggtgac ccggaccagc 89400
acgtcctgcg gccccctggc cagcgcgccc agctgctcga tctcgtcgaa cgagtccacc 89460
accacccgcc cgaccccgt cccgagggcg gccttgaggt cctcgggcgt cttgacgttg 89520
ccgtgcagca gaatccgctc cgccgggaac ccgaccgacc gcgcgatcgc cagctcccc 89580
gccgagcaca cgtccagcga cagcccctcg tccgccacc accggtacac ctgcggcac 89640
ggcagcgct tgcccgcaa caccacctca gcctccggca gcacctccg
gaaccgcgc 89700
gccccgcgcc ggaccgtgcc ctgctcagc acctggcagg gcgtgccga cggggcgcg 89760
agctcggtcg cgggcacccc ccgagcagc agtcccccc gctccagccg ggtccccagg 89820
ggccacagcc ccgctccag ggccggttcg ccggtcatgc cgacgtggg cagcaactcc 89880
gcgagtgta tccccgccg cacacgccc aaccggccgg ggcgacagc gcgcgaacgc 89940
gtccctgacg gcgtgccggg cgggatgac gccgcctga cccgaccgcc ccagcccgt 90000
ctcgaaccgg gcggaagcac cccgaaacg cgccggaac ccgcccgcgc attccccga 90060

acgcctacct cacggcgatt ttgatgcttt ttttacgccg
ggacgccg atattcactc 90120
ctccgagccg cgcggggacg ttgacttctc atccccgacg acgtgatcga ggagagaccc 90180
cgaatgtccg aaacaccggg tttcgccgtt ccaccaggg tggaagccc ggtacgccg 90240
gccgcgccg ccaaccgggt gggcgctgg ctgctggagc accgggtgca accggcgga 90300
cccgcgggca ccgaccga cagcacgcc caggcgtgg ggaaggtcat gtgcctgacc 90360
ggcgtcgact acttctcgac cctgtcctac ctgccgggca tcgcggcgct ggccggcggg 90420
gcggtctcgc cgtggcgac gctgtgatc gtgcgctga ccctgttcgg gatgtgccg 90480
atgtaccgcc ggtggcgca cgatcgccg
cacgggcagg gtcggtggc gatgtggag 90540
gacctgtgc cgttctggcg cggcaagctg ttcgtgtgg tgctgtggg tttcgtggc 90600
acctgtgga tcatcacgat caccctgtcg gcggccgacg cgtcggtgca cgcgtggag 90660
aaccgcacg cggcgctt cctgcacggg cagaggtgc tggtcaccgt ggtgtgtgt 90720
ctcgtgtgg gggggtgtt cctgtgggc ttaccaggc cgtcagcgt ggccatccc 90780
ctggtcgcg tttctgtc gctcaacgc gtggtgtgg tcgccggcg gctggaggtg 90840
atcggaacc cggacgtgt ggacggctgg ttcggcgcg tgacctcac cggcgcgcg 90900
gggtgtgtg gctgtgtcg
cccgccctg ctggcgttc cgtgtctgt gctcgccctg 90960
tccgggttc agaccgggt gagcatgat ccgctggctg aggcgaagg cgcgacgac 91020
gccgaacgc tggcgaacc cgtccgaac acccgcaag tgctaccac cggcgcgctg 91080
atcatgtcgg tttacctgt ggccaccagc ttcgtgacca ccctgtctgt gccgtcgag 91140
cagttccgc cggcgcgga ggccaacggg cggcgctgg cctacctggc gcacgagctg 91200
ctcgcgagt gggtcgac ggcctacgac atcagcagc tgctgacct gtggttcgc 91260
ggcgcgctc cgatggccg gctgatcaac atcgtgccg gctacctgcc cgcgtacgc 91320
atggccccg
actggacgc cgcgtccga ccggtcgtg tggcttacac ggtgatctg 91380
gtcgcatca cgtgatctt ccaggccgac gtggacccc aggcggcg cgtacgcacc 91440
ggcatcctg cgatgatgt gtccgctcg gtggcggtga ccctgtcgt gccgcgcgc 91500
ggcgcgcg ggcggcctc ggcgttcgc gtgctgacc tgatcctgt gtagcgtg 91560
gtggagaac tgatcgaga gccggacgc atcacgatc cgttcgtgt catcgtcgc 91620
atcatcgcc tctcgtgt ctcgcgatc tcgcgcacca ccgagctgc cgtggagcac 91680
atcaggttc acgagaccg gcgcaggctc atcaccgact cgatcgcca cgacgcgcg 91740
ctgacctga tcgcaaccg caggcaggc ggtgacgtg ccgagtacg ggacaaggag 91800
gccgagcag cgggggtgaa cccggtgccg gggcaggcgg acgtgctgt cctggagatc 91860
gacgtggtg acccgtcgga cttcagcgac gtgctggagg tgcgcggcg ggaggtggc 91920
ggccaccggg tctgcgcgc ggacagccc ggcggccga acgcgacgc cgcgatactg 91980
ctggcgtgc gcgactgac cggggtgccc ccgactgcc acttcgctg gacgagggc 92040
agcccgtg ggacactgt ccgctacct ctggtggggc gcggcgacac ggccgggtg 92100
gtcggggaga tcatccggc gcacaggtc gaccggagc gcaggccgg catccactg
92160
ggggcctgag cgggcacgac ggcggggtg tccaggcagg cagcgtgtc caggccagt 92220
gggtgtccc ggccagcaac gtgtcccgg ccggtgggg ctcaggggc ctgcggcg 92280
cgatcgcg cgcgtgtgc gcgaaccgt cgcagtgtc gctgagcagg gccgctcga 92340
cggcgcgct ctaacgccg cgcagcacg ccagcacgga cggggcact caccaaacgc 92400
gaagagccac accaactgg cttcgcgct ggaggcgcg tgcagcggt tgtggtctc 92460
cgtgccgc cggcgcggg gactgggtc cgagcagcac ctggccgccc tgccgcgcg 92520
cgccccgc caggtcgac accggcgcca ggtccggcac cggcgctc
cgccgtcgt 92580
ggaacacgtc gcgcatcgc ctctccctc gaggatcgga tcggaaggc ctgatccaa 92640
ccggcgcg accccggcga caagccctc ccgcccgaac ttgcgtttc cttccgccc 92700
gacccccgc cgtcacaac cccgtcacc ccgctcac ttttgtgat gacgatcagg 92760
aaacagtagt agccattcg tgacctgac tgacgcgag atacccac ccgtcaacga 92820
aacgtaaaac cgcctgtga cccgtcaaa gaccgtcag caccgcgtc acggcgttt 92880
ccccgtgca ccttttggc gtgcgggtc ccacgaacgg gggcgctcg gagtgggaa 92940
gggagcacg tcatggcga cctggcctac gctcgtgc
tcatcgtgt gttcgactg 93000

ctcgtcctcg gcattcgcgg actggggcgg ctctgatggg cggcacggga gtcgtggcca 93060
acgccgtcgg tggcgtgctg gccctgctgc tcatcgggta cctgttcgtc gcgctgatca 93120
ggccggagaa gtctgatgt cctcgaccac ggccggcctg ctccaggctg ccctgctcat 93180
cgccgcgtg gccgcgcct accggccgtt cggcgactac atggcccgcg tctacaccga 93240
cgccaagcac accaaggtcg agcgctgct ctaccgcga gcccgctcg accccgactc 93300
gcagcagcg tggggcacct acgcgcaggg cgtgctcggc ttctccctcg tcggcgtggc 93360
cctgctgtac ctgatgcagc gaggcagcc

ctggctgccg ttcgaccacg accggggcgc 93420
ggtctcgccc ggcatggcgt tcaacaccgc cgcctcgttc gtggccaaca cgaactggca 93480
gtcctacgtc ccggagaccg tctcggcca caccgtgcag atggccgggc tgaccgtgca 93540
gaacttcgtc tccggcgcgg tcggcatggc cgtcgccgtg gcgctggtg gcggcttcac 93600
ccgcgagggc tccgaccgcg tcggcaactt ctgggtcgac ctaccaggg gcacctgcg 93660
cgtctgctg ccctgtgctg tctgttcgtc catcgtgctg gtcgcgaccg gcgtcgtgat 93720
gagtcgtgaag gggggcgtgg acgtggacgg ccagcaggtc gccatcgccc cggccgcctc 93780
gcaggaggcc atcaaggagc

tcggcaccaa cggcggcggc atcttcaacg ccaactccgc 93840
ccaccgttc gagaaccca acggctggtc gaacctggtc gagatcttc tgatcctgct 93900
gatcccgtc tcgtcaccg gcaccttcgg caccctggtc ggcaaccgca agcagggtta 93960
cgtgctgctc agcgtcatgg gcgtgctgtg gaccgcgatg ctgcggtca tctgggcggc 94020
cgaggcgca cggctgcgc cctggaggg caaggagctg cggctcggcg tccccggcag 94080
cgccctgttc gccaacacca ccaccgccac ctccaccggc gcggtcaac ccatgcacga 94140
cagcctcacc ggcctgggcg gcggcgcgac gctgctgaac atgctgttcg gcgagatgac 94200
gccgggcggc

gtcggcaccg gcctgtacag catcctggtg atggcgatca tcgcgatgtt 94260
cctggccggt ctgatggtc ggccgacccc ggagtagctg ggcaagaagc tggccgccc 94320
cgaggtgacc tgcgcgcgcg tgcctacct ggcatgccc gcgctggtg tggtcggcgc 94380
cgggatctcg gcggtgctg cgtcgaccgg cgggtacctg aacaaccccg gcgagcacgg 94440
cctgtccgag atcctctacg cctacgcgtc ggctcgaac aacaacggca gcgcgttcgc 94500
gggcatcacc gtgaccagc actggttcca gtctcgtc ggctcgtgca tgttgcctcg 94560
ccggttcgtc ccgatcatg ccgtgctgtg cctggccggt tcgctcgccc ggcagaagcg 94620

cgcccccggg acccgggcca cgtgcccac ggacagcccg ctgttcgcct cgtgctggt 94680
cggcgcgacg gtgctcgtc ccgcccctac ctctgcccc gccctcgccc tcggcccat 94740
cgccggaggca ctgctgtgac caccaccgac acccgccagc ccgccccga ggacacgggc 94800
gcgcggcccc cggccaagcc cgtcccgtcg ggctgttcg ccccgccca gctgctcacg 94860
tccctgccgg acgcgtgcg caagctccac ccccgccacc agtgcgcaa cccgtgatg 94920
ttcgtggtgt gggcgggctc ggtcctggtc acggtcttcg ccgtcaccga cccgaacccg 94980
ttcacgatc cgttcgcgt gtggctgtgg ttaccgccc tgttcgcaa cctcgccgag

95040
gcccgtcgccg aggggcgcgg caaggcgcag gccgagtcg tgcgcaggac taagaccgac 95100
gcgctggccc gcctgaccga cggcgcgacc gtgcccggca ccgagctgaa ggtcggcgac 95160
ctggtcgtgg tcgaggcggc tgaggtgatc cccggcgacg gcgacgtggt cgagggcac 95220
gccaccgtcg acgagtcggc gatcaccggc gagtccgcgc ccgtggtgctg cgagtcggc 95280
ggcgaccggt gcgcggtcac cggcggcacc accgtgctgt cggaccggat cgtcgtgcgc 95340
gtcaccagca agccgggcca gacgttcgtg gaccggatga tcgcgtggt cgagggcgcg 95400
cagcggcaga agacgccgaa cgagatcgcg ctgacgatcc tgctgtccac

gctcacgatc 95460
atcttctgc tcggtgctc cgcgtccag ccgttcgccc tgtactccg cggcgagcag 95520
tcggtgatcg tgctgaccg gctgctggtg tgctgatcc ccaccacgat cggcgcgctg 95580
ctgtccgca tcggcatcg gggcatggac cgcctggtg agcgcaacgt gctggccacc 95640
tcgggcccgc ccgtcgaggc ggccggtgac gtggacacgc tgctgctgga caagaccggc 95700
accatcacct ggggcaaccg ccgcgccacc gagctgatcc ccgcgccgg cgtcacgctg 95760
gacgagctgg ttgacgccgc ccggttgtcg tcgtggccc acggcacccc cgagggcgcg 95820
agcgtggtcg agctgtgcgc gaccgggcac ggccgctccc

ccgagccac cgacgcggag 95880
aagaccggcg agttcgtgc gttaccgcc cagaccgga tgagcggcat cgacctggac 95940
ggccgcagcg tccgaaggg gcgcgcgacc gcgttacc caccgactc ggtcaagtc 96000

acgggtggacg agatcagcgg cgacggcggc accccgctgg tggtcgccga cggcgagcgg 96060
gtgctcggcg tgatccggct gtccgacgtg gtcaagcccg gcatgaagga gcggttcgcc 96120
gagctcgcgc ccatgggcat ccgcacggtc atgggtaccg gcgacaaccc gctgaccgcc 96180
agggcgatcg cggccgaggg gggggtcgac gactacctcg ccgaggccaa gcccaggagc 96240
aagatggccc tgatccgcaa ggagcaggag
ggcggcaagc tggtcgcgat gaccggcgac 96300
ggcaccaacg acgcccggc gctggcccag tccgacgtgg gcgtggccat gaacaccggc 96360
acctcggcgg ccaaggaggc cgggaacatg gtggacctgg actccgaccc caccaagctc 96420
atcgagatcg tggagatcgg caagcagctg ctgatcacgc gggcgcgctg gacgacgttc 96480
tcggtcgcca acgacctggc gaagtacttc gcgatcctgc ccgccatgtt cggcgcgac 96540
caccgcagc tggacaagct caacgtcatg ggctggcca cggccgagtc ggcgatcctg 96600
tcggcggtea tcttcaacgc gctgatcatc gtggtgctga tcccgtggc gctgcgcggc 96660
gtgcgctaca agccctccag
cgcgagctcg ctgctcggc gcaacctgct ggtgtacggc 96720
gtcggcgcca tcatcacgcc gtctcgtcggc atctggctca tcgacctgct cgtccgctc 96780
atccccgaa tcgggtgaac tccgtgaacg cgttcgtgaa gcaggccctg gccggtctgc 96840
gcgtcctgct ggtgctgacc gtcatcaccg gcgtgctcta ccccgccgc gcttggtcgc 96900
tctcgcgggt gcccgccctg cagccaacg ccgaggccac cggcaccgag ctggtcgtgg 96960
cgccgcgcga gggcgacggc tggttccagc cgcgccgtc gatggcgacg ctgcccgct 97020
cgggcgggtc caacaagggc gagcgcaacg ccgactacga cgcggtgatc gccgagcgcc 97080
gcaccgagat
cgcccgcgcg gagggcgttg cggaggacgc cgtgccgcag gacgcggtga 97140
ccgctcggc ctccgggctg gaccgctga tcagcgccga gtacggcg atccaggtgc 97200
cgcgcgtggc ggggagcgcg ggggtgtcgg aggacgccgt gcggcgctg gtcggcgagg 97260
cgtcggtggg ccgctcgctc ggggtcgtgg gcgagccggg cgtcaacgtc accgacctca 97320
accgggccgt cgacggcgcg gagtgcgacc gaccgggggc cgtcctcgcg gcggccccg 97380
gtcttcccca ttctctgat ctggggagcg ggcgggaccg tggacaagcg caagcgcggc 97440
gaactgcga tctacctggg cgcggcgccg ggctcggca agaccttcgc gatgctcggc 97500
gagggcgacc gccggcgggg gcgcggcgcg gacgtcgtcg tcgccctggt cgagacgcac 97560
ggccgcgagc gcaccgccac catggtcgac ggctggagg tgctccccg caaggaggtc 97620
cagcaccggg ggaccacgat caccgagatg gacgtggacg cggctgctggc ccgcgcgcc 97680
gagatcgccg tgggtggaca gctggcgcac accaacgcc ccggtcccc caacccaag 97740
cgctggcagg acgtcgagga gctgctggac gccggcatcg acgtgctgtc cacgtcaac 97800
atccagcacc tggagtgcct caacgacgtg gtgcgccga tcaccgcgt cgagcagcg 97860
gagaccatcc ccgacgaggt ggtgcgccgc gccgagcagg tggagctggt cgacctgacc
97920
ccgaggcgcg tcgcccgcg cctggcgcac ggcaacgtct acgcccgcga caagatcgac 97980
gccgcgctgg gcaactactt ccgggtcggg aacctgaccg cgtgcgcga gctggcgctg 98040
ctgtgggtgg ccgaccaggt ggacgtggcg ctccagcggt accgcaccga gcagcgcatc 98100
accgacacct gggaggcccg cgagcgggtc gtggtcgcgg tgaccggcg cgcgagagc 98160
gagacctga tcgcagggc ccgcgcgcat cgcgcgcgc cgggggcgga gctgctggtg 98220
gtgcacacca tcgcggcgca cggcctcgcg ggttcgcgc cgagatcgat ccggaccgc 98280
gtcgggctca ggtgctcgac ggtgctctt aacgtggtct cctcgtaacg
ggacgtcggg 98340
aacaccccgc agcggccagg gtccggcggc tgacgggatt cgctgagtc taggcgaggc 98400
cgccccggc cggggtggca ccccgcgacc ggggtggtca cgtgcgggtg cgcgcgccg 98460
gcgcggcgcg cgcggtgcga gagggtgggc gtccggcggc gcgcggttt ccgacatggc 98520
gcgcgcacga aatagttttc ggcggtcgg gcgccgtcga atcgactcgg ggtcgggttt 98580
tccgcgccac cccggaagcg gacgaaccgg gcgggcgaac cggcgggcg gtcgcggac 98640
aacgggcgcg accgcccggg tgcgcgggtt tgggcagcct ttaccgcct ccaggtcacc 98700
cattcgccg ttgcggggaa catccgcga ccagtggccc
ccggcgga cgcggcccag 98760
caccgcctag gccgttcga ggacgtcgt gtgcaccggg agcgtgaaac cgaacgtaac 98820
cggacagcgg cgggctcaag tgggtaaca ctggcgccgc agcgactct taccacagc 98880
gacgaacgcg gcggaacgt accctttaca ggtgaagtga ggccattcgg agcaccggtg 98940
cgcagaaaac ttacacgcc ggagatgact ccactcgccg tagtccatta gtgtgggatt 99000

ccggtaccgt tgcgcgcgag gccgcaagaa ggccggccagg aaagacgatt aactcatccg 99060
 ggccgccccgc cgtcgtgcac gtgaacgcga cgggcgaccg ggaacggaac gagcgagaca 99120
 tgtcatcgcg ctctttacca cctaccagaa
 aaggtgccga tgaccccgat gaagaccatt 99180
 ccgccgattc ccccgaaacac gcgggcgtcc gcccgtcgc cgtcgggca accgcacgac 99240
 gggtttgcgc gccaccgcga accccagggc ccggccgcga ggcatgttg acccgacccc 99300
 cggccaccag cggggacagg ccgaccaccg ccacgcgcgg aaccacggc gaaccgcctc 99360
 tcgccgtgat ccaccacgga ccgttgggga gttccatgga gaccctcaa ctctggcgt 99420
 tcaccacagt ggtgcagacc ggcagcttca cgaaggccgc cggcacgtg aactgctctc 99480
 agcccacgat caccaccagg atcaaggcgc tggaggagac cctcggcgtc gccctgttcc 99540
 gcaggttgc gcgcggcatc
 cagatgacct ccgccggggt cgagctgtg ccgttcgcgc 99600
 gcaacatcat cacgtcacc gacaaggccc gcaaggcgat caccatgaac ggggagccgc 99660
 acgggcacct cgtgataggc agcgcaccaga gcctaccga ctaccggtc ttaccctga 99720
 tcgagtacat gtctggcgc taccgagcg tccagatctc gctgactcg cgaacaacc 99780
 ggtcgaaact ggccgcgtg cgcgagggca ggttggactg cgcgttctc atcgcccg 99840
 tcgagcagcg ggacggtctg gagacgacgg tctgtgccc cgaaccgtg gtgatggtcg 99900
 cgggccccgg ccacgcgtg gcgcggtcgg gcgcggtcac cgaggcgac ctgcggggca 99960
 gcacgctggt
 cagggccgag aacggggcga gctaccacga gcagttcgag cgggcgctcg 100020
 ggctgcacga ggccgagtcg cgatcgccgg tgcctggcct ggactcggtc gacgcggcca 100080
 agcgggcggt cgctcgccgg ctgggcatct cgtgtgtcc ggaggtcacg gtcgcccg 100140
 agctggcgga cggcaggctc agccgcatcg gctggacccc gccgttccgg gtgttcacc 100200
 agttcgctg gcgccaggac aactcggcga acccgctcgt gaccgcgtg gtctcgccg 100260
 cggcgaggt ggtgagcgag caggtggccg cgacaccgc gtagggcgtc gacgtgcagg 100320
 gtcgtgatg cggagcgcc ccctcgtgct gcgcagaggg ggccgagacc gtcggggcga 100380

 caggatttga acctgcgacc ccccgctccc aaagcgggtg cgctaccaa ctgcgccacg 100440
 ccccggtcac caggagctta gcgcgacgcg ctaagctgtt ttcagcacc acccggtggg 100500
 cgctgcgcgg gtgtagctca atggtagagc cccagccttc caagctggtc atcggggttc 100560
 gattcccgtc acccgctcca ccagatcc 100588

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

<220>
 <223> Primer

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> s i s g o r c

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)..(10)
 <223> n i s g, a, t o r 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
 ccscggggcgn ycngsttcga cngygag

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 gcgcggtgtc cgcggacttc gtcaacg 47

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

<220>
<223> Primer

<400> 15
atatactagg ctggtggcgg acctgcgcgc gcggttgggg tg 42

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

<400> 16
atatactagt cacgtcaccg gcgcggtgtc cgcggacttc gtcaacgacc acgcgttccg 60
ggccgcctgg cgcggcgacg gggcgccggt ggacccggtg gtcggcgacg tggaggacac 120
cgccaggggg ttctctgtca cccggtcggg gatctcgatc ggggtgcgcg cggcctgggc 180
ctcgcaccag gccttgaca ccacggtcgt gcgcgtggag ggacgcggcg gcacggcgga 240
gctgcgtgc accttcggt tccgcccga cgcgagggc ccgtcgcgcg tcctgtctac 300
caccgacggc cgcaccacc cggtcgagct gcccgccgag ccggtgggcg ccgagtacga 360
cgcccagctc gcgagcctgc ccacccgcct ggccgacccc gccacgcgcg
gcgagggcggc 420
gtccggggcg cgttggatcg cgggcgcgat cgaacgggtc taccgcgcg ccgacaccgt 480
gcggtgcgcc gaacgacgac acgcgccggt cgacctcgtc ccgacgggag ccccgatg 540
accacggac agaccaacc ccgagtctg cgggcccgag ccggggacga gcgggcccgcg 600
accgcggttc cggcgccgcg ggccccgcgc cccctcgccc cgcgcacccc cgcgccccac 660
cggcacgtcc ccggcgcgac ctacgaccgg gccgtgctgt tcgacctga cggggtgctg 720

gtcaacagct tcgccgtcat gcggcaggcg ttcgagatcg cctacgccga ggctcgtcggc 780
gacggggcccg cgccgttcga ggagtacaac cggcacctgg
ggcgggtactt cccggacatc 840
atgcggatca tggacctgcc gctggagatg gagggtccgt tcgtccgcga gagctaccgg 900
ctggcgggtg aggtggaggt gttcgagggc gcgccggagc tgctggcgga cctgcggcag 960
cacggcttcg gcaccgccgt ggtcaccggc aagagcgggc cgcgcgcccg gtctgtgtgtg 1020
accaccctcg gcatggcggg gctgttcgac catatcatcg gctccgacga ggtcgcgaac 1080
cccaagcccg cgccggacat gtcctgtgtg gccaccggcc tgctcgacgt cccggccgac 1140
cgggtgtgtga tgggtggcga cgccctgacg gacctggcca gcgccgcgc gcggggctac 1200
ccggcgtgg ccgcgtgtg gggcgagacg
gacgaggcgg agctgtgtgc gggaacccg 1260
gacgcggtgg tccgaagcc ctgcaggtg ctgactggt gcctggcca cctcgccgac 1320
gaccggacgt gacgcgcgag caggccccgg cgcggcacgt gccggggcct gcggggcgctc 1380
acccaaccg cgcgcgagg tccgccacca gcctaggata t 1421

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

<220>
<223> Primer

<400> 17
atatcctagg caccacgtcg tgctcgacct cgcccgcac 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 cgcccgcac gcgtcaccc cccgatcatg 60
atcgactcgg tgacgcgggc gaactcgtcc ttcttcacga gcacccgcgt cgtctccacc 120

ccgtccagca cggatgaagta gggcgggcgc atcagcacgt gctgcccgtt ctccgccgcc 180
cgaccccgga acgtggtgcc cggcagcacc gaggcccgcg cgtagtcgtc cagcccgtec 240
aacgcacccg cctcccagcc gtcccgggtcc gcccgcgccg gccggaaccg gtacaccgcc 300
tgccacgccc cgtccctggg cctgcgctcc accacgtgcg cgtcccgcg ctccacgacc 360
cggtagggcg agccgtactg ctctgtctcg accgccgaca gctccagcgg
ctccaggtag 420
gacgggcccga cgaacccac gtccaccagc cagggtccgcc cgtccaggcg caccaggttg 480
aacgagtgtc cctcgtccgg cccgaaccgg tcgtcgccca gccggatcgc gccgcgacc 540
atcagcacct cgtagccagc gcgggtgagc agggcggtga agagccggtt gagtcgtag 600
cagaccccg cgttcggccc ggtcaccacg tgcgcgaaca cacggggcag cgggatctcc 660
gcgagcccc gggtcgccgg caaccggtcg gccgcgccgc cgttgtcgta gggcacggac 720
atcaggtgcc gcttgtgcag cggccgcaac gactccagcg tcgggctcgg cagccgcccc 780
tccacgccga tgcgcccgag gtactcgcc acgtcgatca
tgctggtgct cacctctcgt 840
cggtcgggtc ggtggaactgc cctgcgcctg atcgccctgc gctcgactgc cctgcgcctg 900
aatgcctgc gcccggtgc cctgcgcctg attgcctga gcccgattgc tcggcgccca 960
gtcgtcgcgc cagcgctcg gccggcgatc cgggcgtcgg ctggtcgaac agcagcgcg 1020
cgggcaggcg cagcccggtg gcggtgttca gccggttccg cagctgcacg gccgtcatgg 1080
agtcaagcc gatctcgaag aacgcgtcgt ccgggccac cgcgcccttc tcgccgtgcc 1140
cgagcacggc ggcggccagg tcgcggacca gctcgggtgag cagggcctcc tgctcgtcgc 1200
ccgacagccc ggccaggcg gccccaacc
cggccggggg cgcggcctgc ccggtggcgg 1260
gggagagcga gcgccgcgc gcggggacga gcgcgcgcag cagcgccggc accgcctcgt 1320
cgcgccggga ggcgcgcgc gccgccaggt ccagcggcag cggcacgacc agcgccgggc 1380
cgcccggtgt gaccgcgcc gcgtcgaaca gcgtctagaa tat 1423

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

<400> 20
ctgcgcgac accggacgtg acgcgcgagc agggcccggc gcggcacgtg ccggggcctg 60
cggggcgctc cccaaccgc gcgcgcaggt ccgccaccag cctaggcacc acgtcgtgct 120
cgacctgcc cgccacgcgc tcccccccg atcatgatcg a 161

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

<400> 21
tcgatcatga tcggggggtg agcgctggc gggcgaggtc gagcacgacg tggtcctag 60
gctgtggcg gacctgcgc gcgggttggg gtgaccccc gcaggccccg gcacgtgccg 120
cgccggggcc tgctcgcgc tcacgtccgg tcgtcgccga g 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
 ggtcactggc cgaagcgac ggtgtcatgg 30

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

<220>
 <223> primer

<400> 24
 cctagcgac taccccgac tactacaccg agcagg 36

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

<400> 25
 cctagcgac taccccgac tactacaccg agcaggccta cgcctacggg aactcctgga 60

catcaccgac cacaccgtcc aacgcaactt ccgcgaactg gccgatctgg taggcgacgc 120

gaagggcctg ctgttcacc cacgcgacct ggtgggcgtc ccagaattcg gctgcttcct 180

agcagtagcc gaacaccgtt aaccacgcgg tggcgtcccc cacggacgcc accgcctcgc 240

gggctgcggg gcgagcgag cgagcccgcg cagccccact cccgcgtccc tcttctccgt 300

gtggcctggc gcatgtcaaa ttccactga ctccaacag atcatgtgcc gtttgagcag 360

gtcagcgact tgtcgcgtt cggcgcctta aggccgagct gggatggggg cactgtttcc 420

ggactgagcg gggcagcttg gaagtgagg ttcggtgagc agaggcagca cgtcccgctc 480

cacgtagagg tggttgtaca cgcggtggcg ggacctgcgc agtaggccgc tatccgaag 540

ctgtccaag atcaggagtg cggcgcggtg cgtatagccg agttcggcgg tcagcatggt 600

gtgttgagc agtggggcga cgagcagcg ggccgggaagc gctttgacct tcctccgcc 660

ggtgcgcatc gccagggtgg gcgatcgcc gagcctcacg gatcgcggtc acctcatgca 720

ggctggcgct caacctggaa cgcgcgactg ttctgtccag acgtgccagg gcggtgtagg 780

cgtgcaacaa ggctttgtg gtttcggagc gcagtctgag ccgggaccag gacgacaact 840

ccgcgatcct cgcggacggg ggccgcctcg tgtcttcacc ggtggtagtt gacctgcgcg 900

ggcgaggagt gccctattgc tgccgggacg aggtcatccc ccggagcagt ttctcagcac 960

gccgtgaatc gagatccggg gcgctgagcg cggatgaacgc ctcgtccagc gattcgcacg 1020

cgcacgtcgt cctgacatcg ggccgcgcat ggcccagggt ggtcagcgtt gagcgggaag 1080

gcgcggcagg gtgtgtgca gacactccgg gactccgtgc agaaggtcga tcaggcgaag 1140

gggttgaact gcgaatcga aagcggcccc gccgcaaagg ggtcgggccg cctgcgacga 1200

ttggtcacgc tgcgtggcg cggccccgcc ggaactgctt gccgagcagg tcgatccgcc 1260

ccttgtgata ttctgccagc gcctccagaa ccgagagcag tcgtcgggcg tgcagtgcac 1320

ggccaatacc atcgtcgcgt accccagagg gtgtcgtctc cgttcagggg cgaccatttc 1380

ccacgcccgc ttggcctcct tggcggcccg gccaaagatcg ccgagcatca ggtaggtgcc 1440

cgacaaccgc acaaccctgc ctgccaacgc ggcttcgggc accccgcgcg cctcgtcggc 1500

ttccaacgcc cgaacaccgt gccacagcac ggcccgcgcg ttgcctcgc tcgtctccag 1560

ccatcccatg acaccgtgcg ctteggccag tgacc 1595

<210> 26
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 26
 cctaggaacg gtaggcggg caggtcggtg 30

<210> 27
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>
 <223> primer

<400> 27
 gtgtgcgggc cagctcgccc agcacccca c 31

<210> 28
 <211> 1541
 <212> DNA
 <213> Actinosynnema pretiosum

<400> 28

gtgtgcgggc cagctcgccc agcacccca cgagggtctc cagcgctcc gcgccgtgc	60
gcgcgccccg gacgacctcg accgtgggga tcaggtacgg cgggttcacg aagtgcgtgc	120
cgatcagccg cgccgggtcg gggacgtgcc cgccagctc gtcgatcggg atcgaggagg	180
tggtggacac cagcggcacg cgccggccgg tgagcgcggc gggcccgcc agcacctcg	240
ccttgaccgg cagctcctcg gtgaccgct ccaccaccag cgagacgtcc gcgacgtcg	300
cgagcgaggt gggtgtgagc agctcgcccc gtcgcgggtc ctcgggcagc gcccgcacca	360
gcctggccat gcgcagctgg gcggccaccg cctccgcgc cgcccgacc ttggcccggt	420
cggctctgac cagcaccacc ggcacgccgt gcccgcggc caggaggtg atccccaggc	480
ccatcgtgcc cgcccgaga acggcgagca ccgtcctgcc gtcctgtct cccatcggc	540
tccccgcgc cgccaccgc ggcgcgctc cggtcgcgc gccgtccgg cagcgctatt	600
ccacctga tcgtgtgccc ggaaggcgc gcccgcacc ctagctgcc cccctgaacc	660
ccctcaacg gaaccgaaa tcgaatgtcc cgaacgcgc gtcaaatcgt cgattgacag	720
ccgcagaact gttcatagac tgtggcgga gtaccgatc ccgaattcca cggaagagtc	780
ctcccccacg gtcagcaga tcagcgccac ctcggaatc ctcgactac tccgcgcgac	840
ctcgttgcc gacgacgagc tgctcgccgg tctcgggag cggaccgcg ttctccggc	900
cgcgtccgc ctcaggtgg ccccgagga gggcgagctg ctcggcctgc tggcgcct	960
ggtcggcgcg cgtcgggtc tggaggtcgg cacctacac gggtacagca cgctgtgcat	1020
ggcccgccg ctcggcccg gcggacgtg cgtgacctgc gacgtcgtc cgaagtggc	1080
ggacatgggc agccgttct gggagcggg gggcgtcgc gaccgcatc acgtccgct	1140

cggcgacgcc cgcccaccc tggccggcct gcacgcgag cagccgtgt tcgacctggt	1200
gttcatcgac gcgaacaagt cggattacgt ccactactac gagcgcgcg tgacctgct	1260
gcgcaccggc ggcttggtcg tcgtggacaa cacgtcttt ttggggggg tcgccgatcc	1320
gtccgcgacc gatccggaca ccaccgccgt gcgcgagctg aacgcgtgc tgcacgccga	1380
cgagcgggtc gacatgtgcc tgctgccgat cgcggacgga atcacgtcg ccgtgaagcg	1440
gtgaaccgc ccgaatcgcg ccgaattccc ccggagagaa agcccgccg agtggtcacc	1500
gaggacgtgg ccaccgacct gcccgctac ccgttcctag g	1541