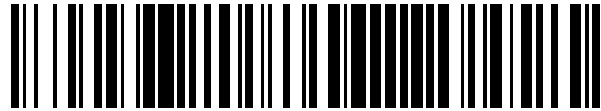


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 437**

51 Int. Cl.:

C07K 5/06 (2006.01)
C07D 231/54 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)
C07D 498/04 (2006.01)
C07D 498/06 (2006.01)
C07K 5/065 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2012 E 12716538 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2691412**

54 Título: **Compuesto macrocíclico y métodos para su producción**

30 Prioridad:

29.03.2011 GB 201105293
08.08.2011 GB 201113629
07.02.2012 GB 201202060

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.04.2015

73 Titular/es:

NEUROVIVE PHARMACEUTICAL AB (100.0%)
Medicon Village, Scheelevägen 2
223 81 Lund, SE

72 Inventor/es:

MOSS, STEVEN JAMES;
GREGORY, MATTHEW ALAN y
WILKINSON, BARRIE

ES 2 533 437 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuesto macrocíclico y métodos para su producción

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a un análogo de sangliferina, que es útil tanto como inhibidor de ciclofilina, por ejemplo en el tratamiento de una infección viral producida por virus tales como el virus de la hepatitis C (VHC), el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y/o como inmunosupresor por ejemplo para su uso en la profilaxis de rechazo de trasplantes, y como agente antiinflamatorio, por ejemplo para su uso en trastornos inflamatorios. La presente invención también proporciona el compuesto para su uso en métodos en medicina, en particular para el tratamiento de una infección por VHC o VIH y para su uso como agente inmunosupresor o antiinflamatorio, en enfermedades en las que es útil la inhibición del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) tal como distrofia muscular o como producto intermedio en la generación de otros compuestos útiles en medicina.

Antecedentes de la invención

Hepatitis C

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus ARN de cadena positiva, y su infección es la principal causa de hepatitis tras una transfusión. El VHC es la infección crónica portada por la sangre más común y es la principal causa de muerte por enfermedad hepática en los Estados Unidos. La Organización Mundial de la Salud estima que hay más de 170 millones de portadores crónicos de infección por VHC, lo que constituye aproximadamente el 3% de la población mundial. Entre los pacientes infectados por VHC no tratados, aproximadamente el 70%-85% desarrollan infección crónica por VHC, y por tanto están en alto riesgo de desarrollar cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. En los países desarrollados, el 50-76% de todos los casos de cáncer hepático y dos tercios de los trasplantes de hígado se deben a infección crónica por VHC (Manns *et al.*, 2007).

Además de las enfermedades hepáticas, los pacientes infectados de manera crónica también pueden desarrollar otras enfermedades crónicas relacionadas con el VHC, y sirven como fuente de transmisión a otros. La infección por VHC produce complicaciones no hepáticas tales como artralgias (dolor articular), exantema cutáneo y daño a órganos internos, principalmente al riñón. La infección por VHC representa una importante carga para la atención sanitaria global, y actualmente no hay ninguna vacuna disponible para la hepatitis C (Strader *et al.*, 2004; Jacobson *et al.* 2007; Manns *et al.*, 2007; Pawlotsky, 2005; Zeuzem & Hermann, 2002).

Tratamiento del VHC

El tratamiento de referencia (*standard of care*, SoC) actual son inyecciones subcutáneas de interferón- α pegilado (pIFN α) y dosificación oral del fármaco antiviral ribavirina durante un periodo de 24-48 semanas. El éxito en el tratamiento se define por una *respuesta virológica sostenida* (SVR), que se define por la ausencia de ARN de VHC en el suero al final del periodo de tratamiento y 6 meses después. Las tasas de respuesta global a SoC dependen principalmente del genotipo y los niveles de ARN de VHC antes del tratamiento. Es más probable que los pacientes con genotipo 2 y 3 respondan a SoC que los pacientes infectados con el genotipo 1 (Melnikova, 2008; Jacobson *et al.*, 2007).

Un número significativo de pacientes con VHC no responden adecuadamente al tratamiento SoC, o no pueden tolerar la terapia debido a efectos secundarios, lo que conduce a problemas frecuentes relacionados con la finalización del ciclo completo. La tasa de SVR clínica global de SoC es sólo de aproximadamente el 50% (Melnikova, 2008). El desarrollo de resistencia es otro factor subyacente para el fracaso del tratamiento (Jacobson *et al.* 2007). El SoC también está contraindicado en algunos pacientes que no se consideran candidatos para el tratamiento, tales como pacientes con episodios significativos pasados de depresión o enfermedad cardíaca. Los efectos secundarios del SoC, que conducen frecuentemente a interrupción del tratamiento, incluyen enfermedad seudogripal, fiebre, fatiga, enfermedad hematológicas, anemia, leucopenia, trombocitopenia, alopecia y depresión (Manns *et al.*, 2007).

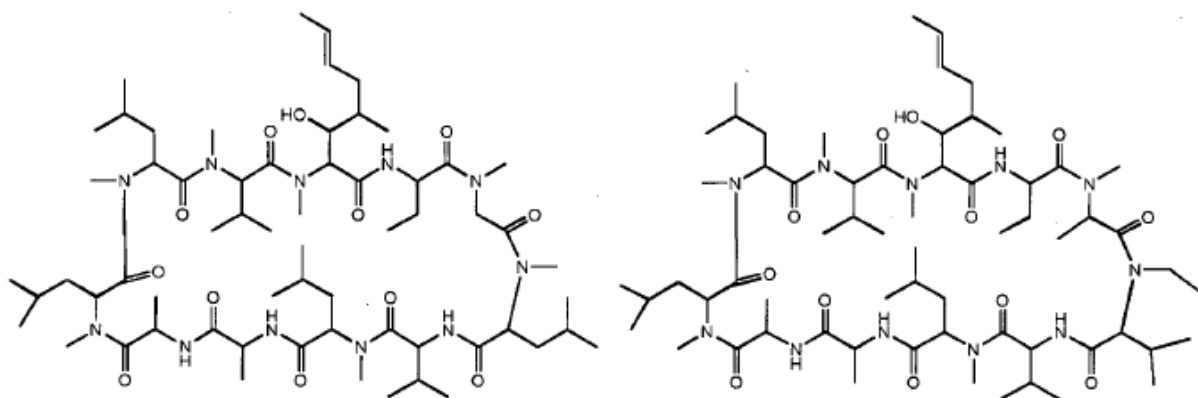
Considerando los efectos secundarios asociados con los prolongados tratamientos usando SoC, el desarrollo de resistencia y la tasa global de éxito por debajo del nivel óptimo, se necesitan urgentemente nuevos tratamientos más eficaces y más seguros para el tratamiento de la infección por VHC. Los objetivos de los nuevos tratamientos incluyen potencia mejorada, perfil de toxicidad mejorado, perfil de resistencia mejorado, calidad de vida mejorada y la mejora resultante en el cumplimiento de los pacientes. El VHC tiene un ciclo de vida corto y por tanto es común el desarrollo de resistencia a fármacos durante la terapia farmacológica.

Se está desarrollando una terapia antiviral dirigida específicamente para la hepatitis C (STAT-C) novedosa, también conocida como fármacos antivirales de acción directa (DAA) que selecciona como diana proteínas virales tales como la ARN polimerasa viral NS5B o la proteasa viral NS3 (Jacobson *et al.*, 2007; Parfieniuk *et al.*, 2007). Además,

también se están desarrollando compuestos novedosos que seleccionan como diana proteínas humanas (por ejemplo ciclofilinas) en lugar de dianas virales, lo que podría esperarse que conduciría a una reducción en la incidencia de resistencia durante la terapia farmacológica (Manns *et al.*, 2007; Pockros, 2008; Pawlotsky J-M, 2005).

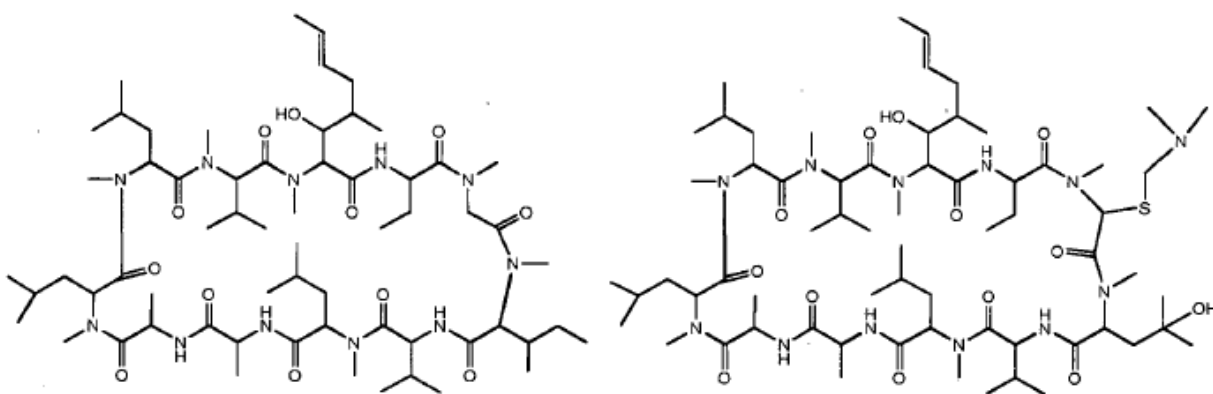
5 Inhibidores de ciclofilina

Las ciclofilinas (CyP) son una familia de proteínas celulares que desempeñan una actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa que facilita los cambios conformacionales y el plegamiento de la proteína. Las CyP están implicadas en procesos celulares tales como regulación de la transcripción, respuesta inmunitaria, secreción de proteínas y función mitocondrial. El virus VHC recluta CyP para su ciclo de vida durante la infección de seres humanos. Originalmente, se pensó que las CyP estimulan la actividad de unión al ARN de la proteína no estructural del VHC ARN polimerasa NS5B que promueve la replicación del ARN, aunque se han propuesto varias hipótesis alternativas incluyendo una necesidad de la actividad PPIasa de CyP. Se cree que diversas isoformas de CyP, incluyendo A y B, están implicadas en el ciclo de vida del VHC (Yang *et al.*, 2008; Appel *et al.*, 2006; Chatterji *et al.*, 2009; Gaither *et al.*, 2010). La capacidad para generar desactivaciones en células T de ratones (Colgan *et al.*, 2000) y seres humanos (Braaten y Luban, 2001) indica que CyPA es opcional para el crecimiento y la supervivencia celulares. Se han observado resultados similares con la alteración de homólogos de CyPA en bacterias (Herrler *et al.*, 1994), *Neurospora* (Tropschug *et al.*, 1989) y *Saccharomyces cerevisiae* (Dolinski *et al.* 1997). Por tanto, la inhibición de CyP representa un objetivo en el huésped novedoso y atractivo para tratar la infección por VHC, y una posible nueva adición a SoC o STAT-C/fármacos DAA, con el objetivo de aumentar la SVR, prevenir la aparición de resistencia y disminuir los efectos secundarios del tratamiento.



25 Ciclosporina A, 1

DEBIO-025, 2



NIM-811, 3

SCY-635, 4

Se sabe que la ciclosporina A (Inoue *et al.* 2003) ("CsA") y sus análogos clínicos no inmunosupresores estructuralmente relacionados de manera estrecha DEBIO-025 (Paeshuyse *et al.* 2006; Flisiak *et al.* 2008), NIM811 (Mathy *et al.* 2008) y SCY-635 (Hopkins *et al.*, 2009) se unen a las ciclofilinas, y como inhibidores de ciclofilina han mostrado eficacia *in vitro* y clínica en el tratamiento de la infección por VHC (Crabbe *et al.*, 2009; Flisiak *et al.* 2008; Mathy *et al.* 2008; Inoue *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2006; Paeshuyse *et al.*, 2006). Aunque estudios de resistencia anteriores en CsA mostraron mutaciones en la ARN polimerasa NS5B de VHC y sugirieron que sólo la ciclofilina B estaría implicada en el proceso de replicación del VHC (Robida *et al.*, 2007), estudios recientes han sugerido un papel esencial para la ciclofilina A en la replicación del VHC (Chatterji *et al.* 2009; Yang *et al.*, 2008). Considerando

que las mutaciones en la proteína viral NS5A también están asociadas con la resistencia a CsA y que NS5A interacciona tanto con CyPA como con CypB para su actividad peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa (PPIasa) específica, se sugiere adicionalmente un papel para ambas ciclofilinas en el ciclo de vida viral (Hanouille *et al.*, 2009).

5 El efecto anti-VHC de los análogos de ciclosporina es independiente de la propiedad inmunosupresora, que es dependiente de calcineurina. Esto indicó que la necesidad esencial para la actividad de VHC es la unión de CyP y que no es necesaria la unión de calcineurina. DEBIO-025, el inhibidor de ciclofilina clínicamente más avanzado para el tratamiento del VHC, ha mostrado potencia *in vitro* e *in vivo* contra los cuatro genotipos más prevalentes de VHC (genotipos 1, 2, 3 y 4). Estudios de resistencia mostraron que las mutaciones que conferirían resistencia a DEBIO-025
10 eran diferentes de las notificadas para inhibidores de polimerasa y proteasa, y que no había resistencia cruzada con replicones virales resistentes a STAT-C/DAA. Y lo que es más importante, DEBIO-025 también prevenía el desarrollo de mutaciones de escape que confieren resistencia a inhibidores tanto de proteasa como de polimerasa (Crabbe *et al.*, 2009).

15 Sin embargo, los inhibidores de ciclofilina basados en CsA en desarrollo clínico presentan varios problemas, que se cree que están relacionados con su clase estructural compartida, incluyendo: determinados acontecimientos adversos que pueden conducir a una retirada de la terapia y han limitado los niveles de dosis clínicos; farmacocinética variable que puede conducir a eficacia variable; y un aumento del riesgo de interacciones fármaco-fármaco que pueden conducir a problemas de dosificación.

20 Los acontecimientos adversos (AA) que se produjeron con más frecuencia en pacientes que recibieron DEBIO-025 incluyeron ictericia, dolor abdominal, vómitos, fatiga y pirexia. Los AA más importantes clínicamente fueron hiperbilirrubinemia y reducción en el recuento de plaquetas (trombocitopenia). Peg-IFN puede producir trombocitopenia profunda y la combinación con DEBIO-025 podría representar un problema clínico significativo.
25 También se ha descrito tanto un aumento en la bilirrubina como una disminución en las plaquetas en estudios clínicos anteriores con NIM-811 (Ke *et al.*, 2009). Aunque la hiperbilirrubinemia observada durante los estudios clínicos con DEBIO-025 se revirtió tras el cese del tratamiento, fue la causa de abandono del tratamiento en 4 de 16 pacientes, y una reducción en los niveles de dosis para ensayos futuros. Puesto que el efecto anti-viral de los inhibidores de ciclofilina en VHC está relacionado con la dosis, una reducción en la dosis ha conducido a una
30 reducción en el efecto anti-viral, y varios ensayos posteriores con inhibidores de ciclofilina basados en CsA han mostrado ausencia de reducciones o reducciones escasas en la carga viral de VHC cuando se administra como monoterapia (Lawitz *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2009). Se sabe que DEBIO-025 y ciclosporina A son inhibidores de transportadores biliares tales como bombas de exportación de sales biliares y otros transportadores hepáticos (especialmente OAT1B1/OAT1B3/MRP2/MRP3/cMOAT/ABCC2) (Crabbe *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la interacción con transportadores biliares, en particular MRP2, puede ser la causa de la hiperbilirrubinemia observada a altos niveles de dosis de DEBIO-025 (Nelson *et al.*, 2009; Wring *et al.*, 2010). Las interacciones fármaco-fármaco (DDI) relacionadas con la clase de CsA a través de la inhibición de otros transportadores de fármacos tales como glicoproteína P (Pgp/MDR1), BSEP, OAT1B1 y OAT1B3 (Konig *et al.*, 2010) también pueden constituir una preocupación, limitando potencialmente determinadas combinaciones y uso en
40 algunos pacientes que se someten a tratamiento para coinfecciones tales como VIH (Seden *et al.*, 2010).

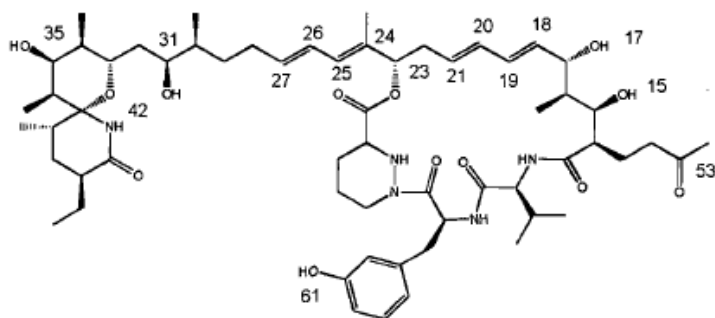
Además, DEBIO-025 y ciclosporina A son sustratos para el metabolismo mediado por el citocromo P450 (especialmente CYP3A4), y se sabe que son sustratos e inhibidores de la glicoproteína P humana (MDR1) (Crabbe *et al.*, 2009). También se ha mostrado que la ciclosporina A es un inhibidor de CYP3A4 *in vitro* (Niwa *et al.*, 2007).
45 Esto indica que podría haber un aumento del riesgo de interacciones fármaco-fármaco con otros fármacos que son sustratos, inductores o inhibidores de CYP3A4 tales como por ejemplo ketoconazol, cimetidina y rifampicina. Además, también se esperan interacciones con fármacos que se someten a transporte por la glicoproteína P (por ejemplo digoxina), lo que podría producir graves interacciones fármaco-fármaco en pacientes con VHC que reciben tratamientos médicos por otras enfermedades concomitantes (Crabbe *et al.* 2009). También se sabe que la CsA tiene farmacocinética altamente variable, mostrando las formulaciones iniciales biodisponibilidad oral del 1-89% (Kapurtzak *et al.*, 2004). Sin una cara monitorización de los niveles en sangre de los pacientes, esto puede conducir a una prevalencia aumentada de efectos secundarios debido a niveles en plasma aumentados, o a una respuesta clínica reducida debido a niveles en plasma disminuidos.
50

55 Considerando que la inhibición de ciclofilinas representa un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del VHC, existe la necesidad de descubrir y desarrollar inhibidores de CyP más potentes y más seguros para su uso en terapia de combinación contra infección por VHC.

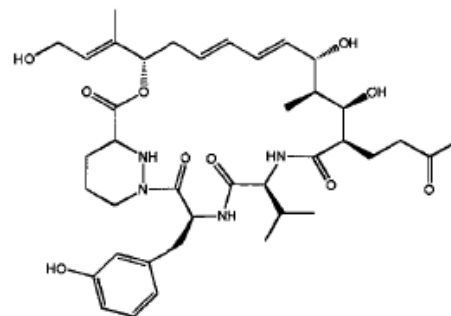
Sangliferinas

60 La sangliferina A (SfA) y sus congéneres naturales pertenecen a una clase de policétidos/péptidos no ribosómicos mixtos, producidos por *Streptomyces sp.* A92-308110 (también conocido como DSM 9954) (véase el documento WO 97/02285), que se descubrieron originalmente basándose en su alta afinidad por ciclofilina A (CyPA). SfA es el componente más abundante en caldos de fermentación y presenta una afinidad aproximadamente 20 veces superior para CyPA en comparación con CsA. Esto ha conducido a sugerir que las sangliferinas podrían ser útiles para el
65 tratamiento del VHC (documento WO2006/138507). También se ha mostrado que las sangliferinas presentan una

actividad inmunosupresora inferior que CsA cuando se someten a prueba *in vitro* (Sanglier *et al.*, 1999; Fehr *et al.*, 1999). SFA se une con alta afinidad al sitio de unión a CsA de CyPA (Kallen *et al.*, 2005).

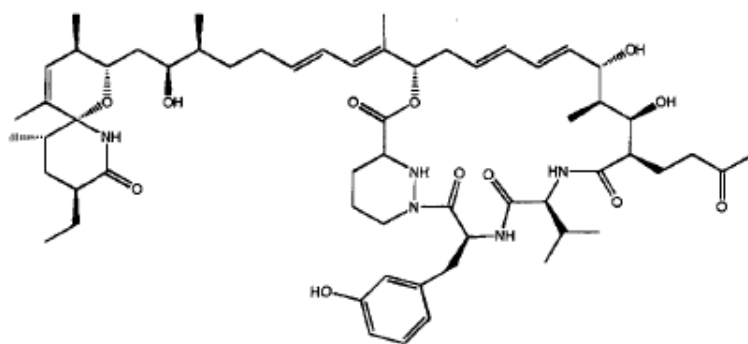


Sangliferina A, 5



Hidroximacrociclo, 6

5



Sangliferina B, 7

10

Biosíntesis de sangliferinas

Las sangliferinas se biosintetizan por una policétido sintasa (PKS)/péptido sintetasa no ribosómica (NRPS) mixta (véase el documento WO2010/034243). La estructura principal de macrólido de 22 miembros consiste en una cadena carbonada de policétido y una cadena tripeptídica. La cadena peptídica consiste en un aminoácido natural, valina, y dos aminoácidos no naturales: (S)-meta-tirosina y (S)-ácido piperázico, unidos mediante un enlace amida. Se cree que la hidroxilación de fenilalanina (o bien *in situ* en la NRPS o bien antes de la biosíntesis) para generar (S)-meta-tirosina se produce a través del producto génico de *sfaA*.

15

Acción inmunosupresora de las sangliferinas

El mecanismo de acción inmunosupresor de SFA es diferente del de otros fármacos inmunosupresores de unión a inmunofilina conocidos tales como CsA, FK506 y rapamicina. SFA no inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina, la diana de CsA (Zenke *et al.*, 2001), en cambio su actividad inmunosupresora se ha atribuido a la inhibición de la interleucina-6 (Hartel *et al.*, 2005), la interleucina-12 (Steinschulte *et al.*, 2003) y la inhibición de la proliferación de células T dependiente de interleucina-2 (Zhang & Liu, 2001). Sin embargo, hasta ahora se desconocen la diana molecular y el mecanismo a través del cual SFA ejerce su efecto inmunosupresor.

25

La estructura molecular de SFA es compleja y se cree que su interacción con CyPA está mediada en gran medida por la parte macrocíclica de la molécula. De hecho, un compuesto macrocíclico (hidroximacrociclo) derivado de la escisión oxidativa de SFA ha mostrado fuerte afinidad por CyPA (Sedrani *et al.*, 2003). Los datos de estructura cristalina por rayos X han mostrado que el hidroximacrociclo se une al mismo sitio activo de CyPA que CsA. También se ha mostrado previamente que análogos basados en el resto macrocíclico de SFA están desprovistos de propiedades inmunosupresoras (Sedrani *et al.*, 2003), proporcionando la oportunidad para diseñar inhibidores de CyP no inmunosupresores para su uso potencial en terapia contra VHC.

30

35

En oposición a esto, también existe la oportunidad de desarrollar agentes inmunosupresores con baja toxicidad para su uso en áreas tales como la profilaxis de rechazo de trasplantes, trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y respiratorios, incluyendo pero sin limitarse a, enfermedad de Crohn, síndrome de Behcet, uveítis, psoriasis, dermatitis atópica, artritis reumatoide, síndrome nefrítico, anemia aplásica, cirrosis biliar, asma, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad celiaca. Se ha mostrado que las sangliferinas

40

5 tienen un mecanismo novedoso de actividad inmunosupresora (Zenke *et al.*, 2001), actuando potencialmente a través de quimiocinas de células dendríticas (Immecke *et al.*, 2011), y por tanto existe la oportunidad de desarrollar agentes con un mecanismo de acción diferente a los agentes clínicos actuales, tales como ciclosporina A, rapamicina y FK506. Se ha mostrado que la sangliferina A es 10 veces menos potente que la ciclosporina A, por lo que el agente novedoso ideal tendría potencia y/o ventana terapéutica mejoradas.

Otros usos terapéuticos de inhibidores de ciclofilina

10 Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

15 Los inhibidores de ciclofilina, tales como CsA y DEBIO-025 también han mostrado utilidad potencial en la inhibición de la replicación del VIH. Se cree que los inhibidores de ciclofilina interfieren con la función de CyPA durante la progresión/finalización de la transcripción inversa del VIH (Ptak *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando se sometieron a prueba clínicamente, DEBIO-025 sólo redujo los niveles de ARN de VIH-1 $\geq 0,5$ y >1 log₁₀ copias/ml en nueve y dos pacientes respectivamente, mientras que 27 de los pacientes tratados no mostraron reducción en los niveles de ARN de VIH-1 (Steyn *et al.*, 2006). Tras esto, se sometió a ensayo DEBIO-025 en pacientes coinfectados por VHC/VIH y mostró mejor eficacia contra VHC, y se interrumpieron los ensayos clínicos de VIH (véase Watashi *et al.*, 2010).

20 Tratamiento del VIH

25 Más de 30 millones de personas están infectadas por VIH-1 en todo el mundo, con 3 millones de casos nuevos cada año. Las opciones de tratamiento han mejorado espectacularmente con la introducción de la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) (Schopman *et al.*, 2010). Hacia 2008, se habían autorizado casi 25 fármacos antirretrovirales para el tratamiento del VIH-1, incluyendo nueve inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI), cuatro inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI), nueve inhibidores de proteasa (PI), un inhibidor de fusión, un inhibidor de CCR5 y un inhibidor de integrasa (Shafer y Schapiro, 2008). Sin embargo, ninguno de estos regímenes actuales conduce a aclaramiento viral completo, pueden conducir a efectos secundarios graves y la resistencia antiviral es todavía una preocupación importante. Por tanto, sigue habiendo la necesidad de nuevas terapias antivirales, especialmente en clases de mecanismos de acción en las que no hay fármacos aprobados, tal como es el caso para inhibidores de ciclofilina.

30 Virus de la hepatitis B

35 La hepatitis B es un virus ADN de la familia *Hepadnaviridae*, y es el agente causante de la hepatitis B. A diferencia de los casos con VHC y VIH, ha habido muy pocos informes publicados de la actividad de inhibidores de ciclofilina contra el virus de la hepatitis B. Ptak *et al.* 2008 han descrito una débil actividad de Debio-025 contra VHB (CI₅₀ de 4,1 μ M), mientras que Xie *et al.*, 2007 describieron cierta actividad de CsA contra VHB (CI₅₀ $>1,3$ μ g/ml). Esto es en contraste con VIH y VHC, donde hay numerosos informes de actividad antiviral nanomolar de inhibidores de ciclofilina.

40 Tratamiento del VHB

45 El VHB infecta hasta 400 millones de personas en todo el mundo y es una causa principal de hepatitis viral crónica y carcinoma hepatocelular. En 2008, había seis fármacos autorizados para el tratamiento del VHB; interferón alfa e interferón alfa pegilado, tres análogos de nucleósido (lamivudina, entecavir y telbivudina) y un análogo de nucleótido (adefovir dipivoxil). Sin embargo, debido a las altas tasas de resistencia, a la escasa tolerancia y a los posibles efectos secundarios, se necesitan nuevas opciones terapéuticas (Ferir *et al.*, 2008).

50 Inhibición del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)

55 La apertura de los poros de transición de permeabilidad de alta conductancia en mitocondrias inicia el comienzo de la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT). Éste es el acontecimiento causante, que conduce a necrosis y apoptosis en hepatocitos tras estrés oxidativo, toxicidad de Ca²⁺ e isquemia/reperfusión. Se ha mostrado que la inhibición de la ciclofilina D (también conocida como ciclofilina F) por inhibidores de ciclofilina bloquea la apertura de los poros de transición de permeabilidad y protege de la muerte celular tras este estrés. Los inhibidores de ciclofilina D pueden ser útiles por tanto en indicaciones en las que está implicada la apertura de mPTP, tal como distrofia muscular, en particular distrofia muscular congénita de Ullrich y miopatía de Bethlem (Millay *et al.*, 2008, documento WO2008/084368, Palma *et al.*, 2009), esclerosis múltiple (Forte *et al.*, 2009), diabetes (Fujimoto *et al.*, 2010), esclerosis lateral amiotrófica (Martin 2009), trastorno bipolar (Kubota *et al.*, 2010), enfermedad de Alzheimer (Du y Yan, 2010), enfermedad de Huntington (Perry *et al.*, 2010), recuperación tras infarto de miocardio (Gomez *et al.*, 2007) y consumo de alcohol crónico (King *et al.*, 2010).

Otros usos terapéuticos

65 Los inhibidores de ciclofilina tienen actividad potencial contra, y por tanto en el tratamiento de, infecciones de otros virus, tales como el virus de la varicela-zóster (Ptak *et al.*, 2008), virus influenza A (Liu *et al.*, 2009), coronavirus del

síndrome respiratorio agudo grave y otros coronavirus humanos y felinos (Chen *et al.*, 2005, Ptak *et al.*, 2008), virus del dengue (Kaul *et al.*, 2009), virus de la fiebre amarilla (Qing *et al.*, 2009), virus del Nilo occidental (Qing *et al.*, 2009), virus de la encefalitis equina occidental (Qing *et al.*, 2009), citomegalovirus (Kawasaki *et al.*, 2007) y virus vaccinia (Castro *et al.*, 2003).

También hay informes de utilidad de inhibidores de ciclofilina e inhibición de ciclofilina en otras áreas terapéuticas, tal como en cáncer (Han *et al.*, 2009).

Comentarios generales sobre las sangliferinas

Uno de los problemas en el desarrollo de fármacos de compuestos tales como sangliferinas es el rápido metabolismo y la glucuronidación, que conducen a baja biodisponibilidad oral. Esto puede conducir a una posibilidad aumentada de efecto de los alimentos, liberación incompleta más frecuente de la forma farmacéutica y variabilidad entre pacientes superior.

Por tanto sigue habiendo la necesidad de identificar inhibidores de ciclofilina novedosos, que pueden tener utilidad, particularmente en el tratamiento de infección por VHC, pero también en el tratamiento de otras áreas de enfermedad en las que puede ser útil la inhibición de ciclofilinas, tal como infección por VIH, distrofia muscular o ayuda en la recuperación tras infarto de miocardio o cuando es útil el efecto de inmunosupresión o antiinflamatorio. Preferiblemente, tales inhibidores de ciclofilina tienen propiedades mejoradas con respecto a los inhibidores de ciclofilina disponibles actualmente, incluyendo una o más de las propiedades siguientes: semivida más larga o biodisponibilidad oral aumentada, posiblemente a través de glucuronidación reducida y/o metabolismo por P450 reducido, solubilidad en agua mejorada, potencia mejorada contra VHC, toxicidad (incluyendo hepatotoxicidad) reducida, perfil farmacológico mejorado, tal como alta exposición al órgano diana (por ejemplo, el hígado en el caso de VHC) y/o semivida larga (que permite la dosificación menos frecuente), interacciones fármaco-fármaco reducidas, tal como a través de niveles reducidos de metabolismo por CYP3A4 e inhibición e inhibición reducida (Pgp) (que permite combinaciones de múltiples fármacos más fáciles) y perfil de efectos secundarios mejorado, tal como baja unión a MRP2, que conduce a una posibilidad reducida de hiperbilirrubinemia, efecto inmunosupresor inferior, actividad mejorada contra especies de virus resistentes, en particular especies de virus resistentes a CsA y análogos de CsA (por ejemplo DEBIO-025) y un índice terapéutico (y/o selectividad) superior. La presente invención da a conocer un análogo de sangliferina novedoso que puede tener una o más de las propiedades anteriores. En particular, la presente invención da a conocer un análogo de sangliferina mutasintético novedoso, que se prevé que tiene metabolismo reducido a través de P450 o glucuronidación, por ejemplo tal como se muestra mediante semivida de microsoma aumentada y/o potencia mejorada reducida contra VHC, por ejemplo tal como se muestra por una CE₅₀ de replicón baja.

Además, también existe la necesidad de desarrollar un agente inmunosupresor novedoso, que puede tener utilidad en la profilaxis de rechazo de trasplantes, o en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y respiratorios. Preferiblemente, un inmunosupresor de este tipo tendrá propiedades mejoradas con respecto a las sangliferinas naturales conocidas, incluyendo una o más de las propiedades siguientes: semivida más larga o biodisponibilidad oral aumentada, posiblemente a través de glucuronidación reducida y/o metabolismo por P450 reducido, solubilidad en agua mejorada, potencia mejorada en actividad inmunosupresora, tal como podría observarse en ensayos de proliferación de células T, toxicidad (incluyendo hepatotoxicidad) reducida, perfil farmacológico mejorado, tal como alta exposición al órgano diana y/o semivida larga (que permite la dosificación menos frecuente), interacciones fármaco-fármaco reducidas, tal como a través de niveles reducidos de metabolismo por CYP3A4 e inhibición e inhibición reducida (Pgp) (que permite combinaciones de múltiples fármacos más fáciles) y perfil de efectos secundarios mejorado. La presente invención da a conocer un análogo de sangliferina novedoso que puede tener una o más de las propiedades anteriores. En particular, la presente invención da a conocer un derivado novedoso, que tiene metabolismo reducido a través de P450 o glucuronidación, por ejemplo tal como se muestra mediante semivida de microsoma aumentada y/o potencia inmunosupresora mejorada, por ejemplo tal como se muestra por una CI₅₀ de proliferación de células T baja.

Por tanto, tal como puede observarse a partir de los ejemplos, el compuesto de la invención tiene las siguientes propiedades terapéuticamente relevantes favorables:

- potencia antiviral mejorada contra VHC y VIH en comparación con los inhibidores de ciclofilina de la técnica anterior ciclosporina A, DEBIO-025 (alisporivir) y sangliferina A;

- aclaramiento reducido y exposición oral aumentada en comparación con el compuesto de la técnica anterior sangliferina A;

- inhibición más potente de la actividad PPIasa de CypA en comparación con los inhibidores de ciclofilina de la técnica anterior ciclosporina A, DEBIO-025 (alisporivir) y sangliferina A;

- perfil de efectos secundarios mejorado e interacciones fármaco-fármaco reducidas tal como se demuestra mediante la inhibición reducida de transportadores de bilirrubina (OATP-1B1, OATP-1B3, MRP2 y MRP3) e

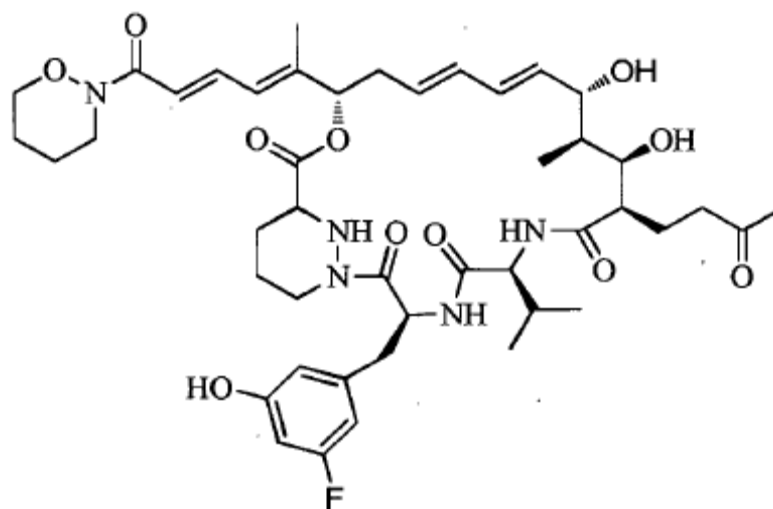
inhibición reducida de transportadores xenobióticos (Pgp y BSEP).

Sumario de la invención

5 La presente invención proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico novedoso, que se ha generado mediante la modificación semisintética de sangliferinas mutasintéticas. Este análogo puede generarse mediante la dihidroxilación de una sangliferina mutasintética, tal como se describe en la fórmula IIA y la fórmula IIB, seguido por escisión para generar el macrociclo aldehídico, seguido por química adicional, incluyendo reacciones de tipo Horner-Emmons y otras reacciones de acoplamiento que implican un aldehído. Como resultado, la presente invención
10 proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico, métodos para la preparación de este compuesto, y métodos para el uso de este compuesto en medicina o como producto intermedio en la producción de otros compuestos.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

15



Fórmula (I)

20 incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetal mediante la combinación del grupo ceto en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

La estructura anterior muestra un tautómero representativo y la invención abarca todos los tautómeros del compuesto de fórmula (I) por ejemplo un compuesto ceto en el que se ilustra un compuesto enol y viceversa.

25

Los tautómeros específicos que se incluyen dentro de la definición de la fórmula (I) son aquellos en los el que (i) el grupo ceto en C-53 forma un hemicetal con el hidroxilo en C-15, o (ii) el hidroxilo en C-15 y C-17 puede combinarse con el ceto en C-53 para formar un cetal. Todas las numeraciones usan el sistema para la estructura de sangliferina A original.

30

El compuesto de fórmula (I), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede estar presente opcionalmente en forma de un solvato farmacéuticamente aceptable, tal como un hidrato.

35 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) en forma cristalina sólida (forma I).

Definiciones

40 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo "un análogo" significa un análogo o más de un análogo.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "análogo(s)" se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a otro pero que difieren ligeramente en la composición (como en la sustitución de un átomo por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular).

Tal como se usa en el presente documento, el término "sangliferina(s)" se refiere a compuestos químicos que son

estructuralmente similares a sangliferina A pero que difieren ligeramente en la composición (como en la sustitución de un átomo por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular los generados por la fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110. Los ejemplos incluyen los compuestos similares a sangliferina comentados en los documentos WO97/02285 y WO98/07743, tal como sangliferina B.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sangliferina(s) mutasintética(s)” o “análogo(s) de sangliferina mutasintético(s)” se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a sangliferina A, B, C o D pero que difieren ligeramente en la composición (como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular, los generados por la fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110 o un mutante del mismo, cuando el cultivo se alimenta con un análogo de metatirosina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo(s) de meta-tirosina” se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a meta-tirosina pero que difieren ligeramente en la composición (como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular, los descritos en la fórmula (III).

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo macrocíclico”, “análogo de sangliferina macrocíclico” o “sangliferina macrocíclica”, se refiere a un compuesto mencionado antes como que representa la invención en su aspecto más amplio, por ejemplo un compuesto según la fórmula (I) anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Estos compuestos también se denominan “compuestos de la invención” o “derivados de sangliferina” o “análogos de sangliferina” y estos términos se usan de manera intercambiable en la presente solicitud.

Tal como se usa en el presente documento, el término “VHC” se refiere a virus de la hepatitis C, un virus con envuelta, ARN, monocatenario de la familia viral *Flaviviridae*.

Tal como se usa en el presente documento, el término “VIH” se refiere a virus de la inmunodeficiencia humana, el agente causante del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida humana.

Tal como se usa en el presente documento, el término “biodisponibilidad” se refiere al grado en el que o la tasa a la que el fármaco u otra sustancia se absorbe o se hace disponible en el sitio de la actividad biológica tras la administración. Esta propiedad depende de varios factores incluyendo la solubilidad del compuesto, la tasa de absorción en el intestino, el grado de unión a proteínas y el metabolismo, etc. En el presente documento se describen diversas pruebas para la biodisponibilidad que resultarán familiares para un experto en la técnica (véase también Egorin *et al.* 2002).

El término “solubilidad en agua” tal como se usa en esta solicitud se refiere a la solubilidad en medios acuosos, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, o en disolución de glucosa al 5%. Las pruebas para la solubilidad en agua se facilitan a continuación en los ejemplos como “ensayo de solubilidad en agua”.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención tal como el compuesto de fórmula (I) incluyen sales convencionales formadas a partir de sales de adición de bases o ácidos orgánicos o inorgánicos así como de ácido de amonio cuaternario farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales de ácidos adecuados incluyen clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, propiónico, succínico, glicólico, fórmico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Las sales de ácido clorhídrico son de particular interés. Otros ácidos tales como el oxálico, aunque no son farmacéuticamente aceptables por sí mismos, pueden ser útiles en la preparación de sales útiles como productos intermedios en la obtención de los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables. Ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína. Las referencias a continuación en el presente documento a un compuesto según la invención incluyen tanto un compuesto de fórmula (I) como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alquilo” representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado, que contiene normalmente 1-10 átomos de carbono, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₆. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen grupos alquilo C₁₋₄ tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo y n-butilo.

El término “tratamiento” incluye tratamiento profiláctico así como terapéutico.

El término “fórmula II” se refiere a fórmula IIA y fórmula IIB colectivamente.

Leyendas de las figuras

Figura 1: ¹H-RMN del compuesto 24.

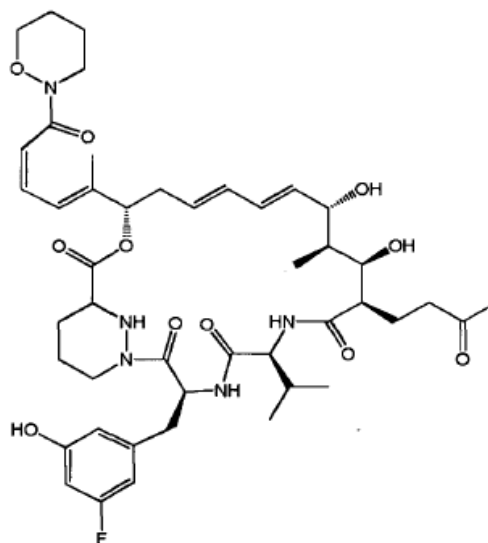
Figura 2: Patrón de difracción de rayos X de polvo del compuesto 24 en forma cristalina sólida (forma I).

Descripción de la invención

La presente invención proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico, tal como se expuso anteriormente, métodos para la preparación de este compuesto y métodos para el uso de este compuesto en medicina.

En una realización, el compuesto es un aducto de metanol del mismo en el que se forma un hemiacetal mediante la combinación de los grupos cetona en C-53 e hidroxilo en C-15 y metanol. En otra realización no lo es.

En una realización de la invención, el doble enlace en la posición C26, 27 está en la forma *cis*, tal como se representa por la siguiente fórmula:



Un compuesto de este tipo puede producirse durante síntesis química.

En una realización adicional, se proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) en forma cristalina sólida. En particular, se proporciona una forma cristalina sólida (forma I) de un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) que puede obtenerse (o se obtiene) mediante la cristalización del análogo de sangliferina macrocíclico amorfo según la fórmula (I) en metil isobutil cetona (MIBK). En una realización, dicha forma amorfa se suspende en MIBK y se realizan ciclos de temperatura entre una temperatura mínima y una máxima durante un periodo de tiempo total de, por ejemplo, 1 hora, 2 horas, 5 horas, 24 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días o 2 semanas. En una realización, se realizan ciclos de temperatura entre temperatura ambiente y 60°C, por ejemplo entre temperatura ambiente y 40°C. En una realización, se realizan ciclos de temperatura entre la temperatura mínima y la máxima (y viceversa) cada 2-8 horas, por ejemplo, cada 3-5 horas o cada 4 horas. En una realización preferida, se realizan ciclos de temperatura entre temperatura ambiente y 40°C cada 4 horas durante un total de 5 días.

En el ejemplo 8 se describe en detalle un método de cristalización de la forma amorfa del análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I).

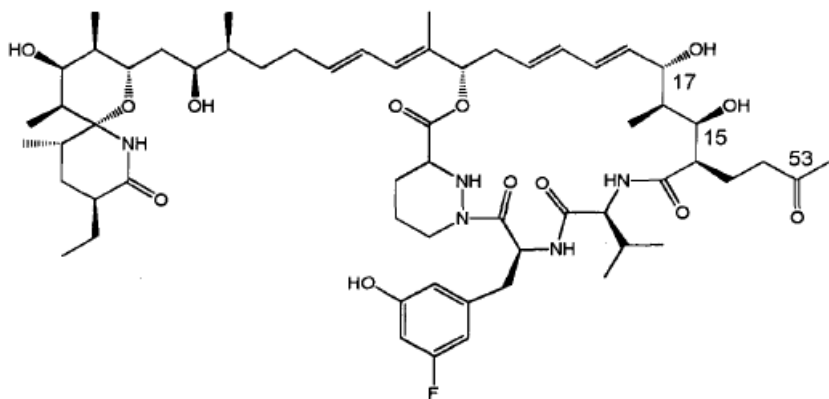
Un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) en forma del polimorfo cristalino de forma I tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo (XRPD) sustancialmente tal como se muestra en la figura 2. La tabla 2 (del ejemplo 8) muestra la lista de picos y las intensidades relativas. El método de obtención de los datos de XRPD se describe en los Métodos generales.

Por tanto, se proporciona un análogo de sangliferina macrocíclico según la fórmula (I) en forma cristalina (forma I) que tiene un patrón de XRPD con al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis o las diecisiete) señal a 8,3, 8,5, 11,1, 12,6, 13,9, 14,3, 15,0, 16,9, 17,7, 18,6, 19,0, 20,1, 20,5, 20,9, 21,2, 21,7 y 23,0 (\pm 0,2 grados, valores de 2-theta), señales que constituyen las señales principales en el patrón de XRPD del polimorfo de forma I. Las señales en 8,3, 8,5, 11,1, 13,9, 17,7, 18,6, 19,0, 20,5, 20,9 y 23,0 grados 2-theta tienen comparativamente alta intensidad relativa (más del 26% - véase la figura 2) y por tanto se prefiere observar al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o las diez) de éstas. Las señales a 13,9, 17,7, 19,0, 20,5 y 23,0 grados 2-theta tienen particularmente alta

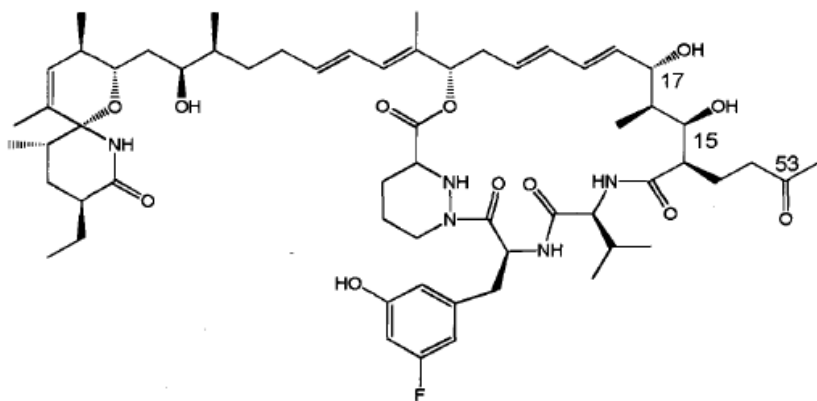
intensidad relativa (más del 50% - véase la figura 2) y por tanto se prefiere observar al menos una (por ejemplo, una, dos, tres, cuatro o las cinco) de éstas.

5 El término "intensidad relativa" se entenderá que significa la intensidad dada como porcentaje como la intensidad de la señal más alta en el espectro (que corresponde al pico a 13,9 grados 2-theta), tal como se ilustra mediante la figura 2.

10 En general, el compuesto de la invención se prepara mediante mutasíntesis para generar compuestos de fórmula (II), seguido por semisíntesis.



Fórmula (IIA)



Fórmula (IIB)

15 20 En general, un procedimiento para preparar precursores de un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos comprende:

25 • inocular un caldo de fermentación con un cultivo de un productor de sangliferina (tal como *Streptomyces* sp. A92-308110, también conocido como DSM 9954) o más preferiblemente, un productor de sangliferina con el gen *sfaA* o el homólogo del gen *sfaA* inactivado o deleciónado;

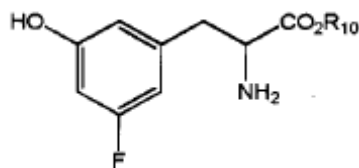
30 • alimentar el caldo de fermentación con un análogo de meta-tirosina (tal como se muestra en la fórmula (III), por ejemplo (S)-2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo, DL-5-fluoro-meta-tirosina (9) o 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10))

35 • permitir que continúe la fermentación hasta que se produzcan los compuestos de fórmula IIA y fórmula IIB

• extraer y aislar los compuestos de fórmula IIA y fórmula IIB

• derivatizar de manera semisintética los compuestos de fórmula IIA y fórmula IIB para generar el compuesto de fórmula I.

Los compuestos de fórmula (III) se definen tal como sigue:

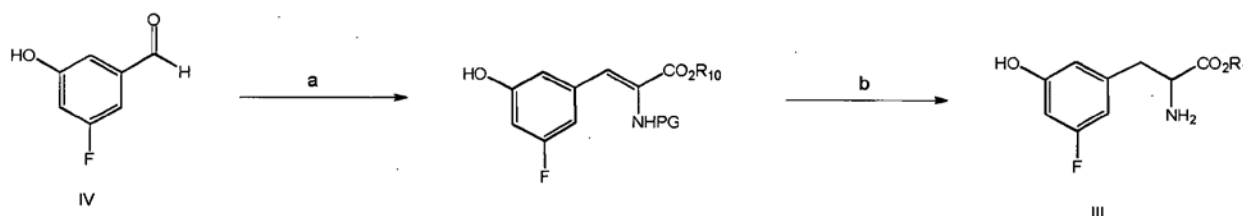


Fórmula (III)

- 5 en la que R_{10} representa H o un grupo de formación de éster tal como un grupo alquilo, por ejemplo alquilo C_{1-6} tal como Me.

La alimentación puede ser racémica o la forma L de un compuesto de fórmula (III).

- 10 Los compuestos de fórmula (III) o bien están comercialmente disponibles o bien se preparan mediante técnicas de química de síntesis orgánica convencionales. Una ruta genérica para los compuestos de fórmula (III) es tal como se muestra en el siguiente esquema 1a.



- 15 Esquema 1a: a) acoplamiento de aldehído de fórmula (IV) con un fragmento adecuado, por ejemplo $(R_{11}O)_2P(O)CH(NHPG)CO_2R_{10}$, y b) hidrogenación y desprotección según sea necesario. PG = grupo protector.

- 20 Los aldehídos de fórmula (IV) pueden estar comercialmente disponibles o sintetizarse fácilmente por un experto en la técnica. Puede ser necesario emplear química de protección y desprotección en la generación de compuestos de fórmula (III) a partir de compuestos de fórmula (IV). Un experto en la técnica conoce estas técnicas y los grupos protectores adecuados tal como se describe en *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis* (Wuts y Greene, 4ª Edición, 2007).

- 25 Tras la generación de los compuestos de fórmula (IIA) y fórmula (IIB), se preparan los compuestos de la invención mediante derivatización semisintética. Los métodos semisintéticos para generar el aldehído de sangliferina macrocíclico se describen en el documento US6.124.453, Metternich *et al.*, 1999, Banteli *et al.*, 2001 y Sedrani *et al.*, 2003.

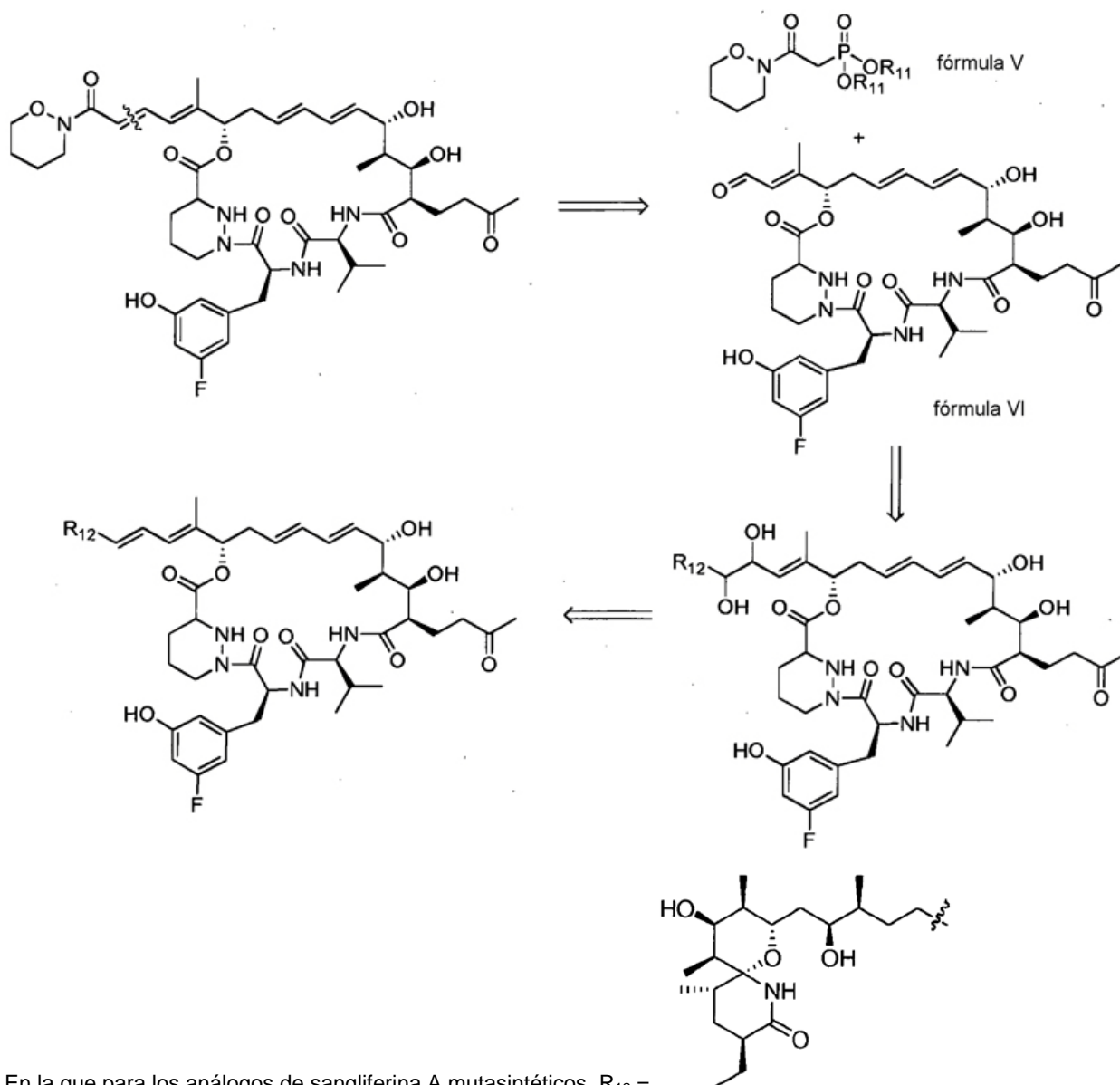
- 30 En general, el procedimiento semisintético para preparar determinados compuestos de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos a partir de un análogo de sangliferina mutasintético comprende:

(a) dihidroxilación del análogo de sangliferina;

- 35 (b) escisión oxidativa del 1,2-diol para producir un aldehído; y

(c) acoplamiento de dicho aldehído con un carbanión estabilizado (o forma canónica del mismo), tal como un carbanión de fosfonato, usando un compuesto de fórmula V.

- 40 Esto se muestra de manera retrosintética a continuación:



En la que para los análogos de sangliferina A mutasintéticos, R₁₂ =

- 5 Los grupos R₁₁, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente alquilo (por ejemplo alquilo C₁₋₄) o bencilo.

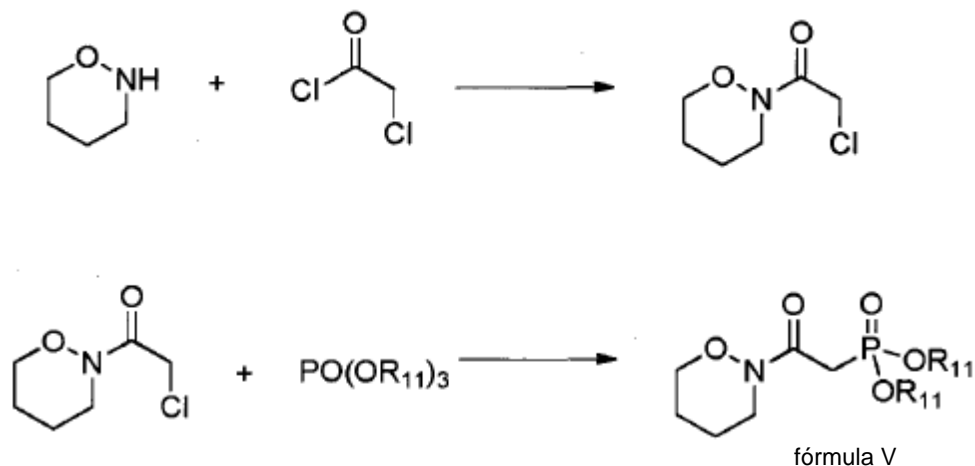
Por tanto, un procedimiento para preparar un compuesto de la invención comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (V) con un macrociclo aldehídico (compuesto de fórmula (VI)).

- 10 La preparación de compuestos de fórmula (VI) puede realizarse mediante un procedimiento análogo al descrito anteriormente para la conversión de sangliferina A en su macrociclo aldehídico correspondiente (Metternich *et al.* 1999). Brevemente, el compuesto de fórmula (II) se dihidroxila usando condiciones de Sharpless modificadas (tetraóxido de osmio catalítico). El uso de los ligandos quirales ayuda a promover la selectividad. Entonces puede escindirse oxidativamente el diol resultante, usando por ejemplo peryodato de sodio. Entonces puede usarse el compuesto de fórmula VI resultante como sustrato para derivatización a una amida, éster o cetona homologados.
- 15 Normalmente, se disuelve un compuesto de fórmula (V) en un disolvente aprótico, se enfría y luego se trata con una base, por ejemplo hidruro de sodio. Entonces se añade un compuesto de fórmula (VI) y aumenta la temperatura de la reacción. Tras un periodo de tiempo adecuado, se detiene la reacción y se purifica el compuesto de fórmula I mediante condiciones convencionales (por ejemplo HPLC preparativa, CCF preparativa, etc., cromatografía ultrarrápida en fase normal).

Los compuestos de fórmula (V) pueden conocerse o pueden prepararse usando métodos conocidos.

- 25 Tal como se muestra en el esquema 1 (a continuación) puede usarse la amina apropiada para tratar cloruro de

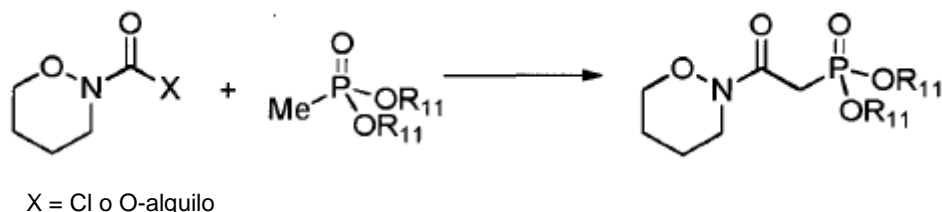
cloroacetilo o similar para formar una alfa-cloroamida. Entonces se trata la alfa-cloroamida en una reacción de Arbuzov para generar un compuesto de fórmula V. Otras rutas para los compuestos de fórmula V resultarán evidentes para un experto en la técnica.



Esquema 1

10 Otros compuestos de fórmula (V) pueden conocerse o pueden sintetizarse fácilmente a partir de derivados de ácido carboxílico disponibles (por ejemplo R_3COX) en los que R_3 es el anillo de 1,2-oxazinano mostrado en el esquema 2. Tal como se muestra en el esquema 2 (a continuación) el derivado de ácido carboxílico puede acoplarse en un fosfonato de metilo una vez que el fosfonato se ha tratado con una base. Esto produce un compuesto de fórmula (V), aunque otras rutas para obtener compuestos de fórmula V resultarán evidentes para un experto en la técnica.

15



20 Esquema 2

Si se desea o es necesario, pueden emplearse grupos protectores para proteger la funcionalidad en el macrociclo o macrociclo aldehídico, o en compuestos de fórmula V tal como se describe en T. W. Green, P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999.

25 Además de los métodos específicos y las referencias proporcionadas en el presente documento, un experto en la técnica también puede consultar referencias en libros de texto convencionales para métodos de síntesis, incluyendo, pero sin limitarse a Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (Furniss *et al.*, 1989) y March's Advanced Organic Chemistry (Smith y March, 2001).

30 Un análogo de sangliferina según la invención puede administrarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos. La coadministración de dos (o más) agentes puede permitir que se usen menores dosis de cada uno, reduciendo así los efectos secundarios, puede conducir a potencia mejorada y por tanto a SVR superior, y a una reducción en la resistencia.

35 Por tanto en una realización, el análogo de sangliferina mutasintético se coadministra con uno o más agentes terapéuticos para el tratamiento de infección por VHC, tomado de los tratamientos de referencia. Éste podría ser un interferón (por ejemplo pIFN α y/o ribavirina).

40 En una realización alternativa, se coadministra macrociclo de sangliferina de la invención con uno o más agentes antivirales distintos, tales como un STAT-C (agente dirigido específicamente para el tratamiento de VHC) o DAA (antivirales de acción directa), que podría ser uno o más de los siguientes: inhibidores no nucleósidos de la polimerasa (por ejemplo ABT-333, ABT-072, BMS 791325, IDX375, VCH-222, BI 207127, ANA598, VCH-916, GS 9190, PF-00868554 (Filibuvir) o VX-759), inhibidores nucleósidos o nucleótidos de la polimerasa (por ejemplo 2'-C-

metilcitidina, 2'-C-metiladenosina, R1479, PSI-6130, R7128, R1626, PSI 7977 o IDX 184), inhibidores de proteasa (por ejemplo ABT-450, ACH-1625, BI 201355, BILN-2061, BMS-650032, CTS 1027, Danoprevir, GS 9256, GS 9451, MK 5172, IDX 320, VX-950 (Telaprevir), SCH503034 (Boceprevir), TMC435350, MK-7009 (Vaneprevir), R7227/ITMN-191, EA-058, EA-063 o VX 985), inhibidores de NS5A (por ejemplo A-831, BMS 790052, BMS 824393, CY-102 o PPI-461), silimarina, inhibidores de NS4b, inhibidores de serina C-palmitoiltransferasa, nitazoxanida o inhibidores de la entrada viral (por ejemplo PRO 206).

En una realización alternativa, se coadministra macrociclo de sangliferina de la invención con uno o más agentes antivirales distintos (tal como terapia antirretroviral altamente activa (HAART)) para el tratamiento de VIH, que podría ser uno o más de los siguientes: inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa (NRTI) (por ejemplo emtricitabina o tenofovir), inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa (NNRTI) (por ejemplo rilpivirina o efavirenz), inhibidores de proteasa (PI) (por ejemplo ritonavir o lopinavir), inhibidores de fusión (por ejemplo maraviroc o enfuvirtida), inhibidores de CCR5 (por ejemplo aplaviroc o vicriviroc), inhibidores de maduración (por ejemplo bevirimat), anticuerpos monoclonales anti-CD4 (por ejemplo Ibalizumab) e inhibidores de integrasa (por ejemplo eltiégravir).

En una realización alternativa, se coadministra un macrociclo de sangliferina de la invención con uno o más agentes antivirales distintos para el tratamiento de VHB, que podría ser uno o más de los siguientes: interferones (por ejemplo interferón alfa o interferón alfa pegilado), análogos de nucleósido o nucleótido (por ejemplo lamivudina, entecavir, adefovir dipivoxil o telbivudina), otros inmunomoduladores (por ejemplo timosina alfa, CYT107 o DV-601) o inhibidores de HMG CoA reductasa (por ejemplo simvastatina).

Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma farmacéutica unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo (compuesto de la invención) con el portador que constituye uno o más componentes adicionales. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, se conforma el producto.

Los compuestos de la invención normalmente se administrarán por vía oral en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de base o ácido orgánico o inorgánico no tóxico, en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que va a tratarse, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse en dosis variables.

Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden administrarse por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener agentes aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada.

Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa de sodio y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

También pueden emplearse composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos de la invención pueden combinarse con diversos agentes edulcorantes o aromatizantes, colorantes o materia colorante, con agentes de emulsión y/o suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Un comprimido puede obtenerse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Los comprimidos sometidos a compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en forma fluida tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante (por ejemplo povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo glicolato sódico de almidón, povidona reticulada, carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensoactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden obtenerse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse opcionalmente y pueden formularse para proporcionar la liberación lenta o controlada del principio activo usando en los mismos, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar un perfil de liberación deseado.

Las formulaciones según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades diferenciadas tales como cápsulas, sellos o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido

acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

5 Debe entenderse que además de los componentes mencionados particularmente antes, las formulaciones de esta invención pueden incluir otros agentes convencionales en la técnica teniendo en cuenta el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los adecuados para administración oral pueden incluir agentes aromatizantes.

10 Ventajosamente, pueden disolverse agentes tales como conservantes y agentes tamponantes en el vehículo. Para potenciar la estabilidad, puede congelarse la composición tras el llenado en el vial y puede retirarse el agua a vacío. El polvo liofilizado seco se sella entonces en el vial y puede suministrarse un vial adjunto de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso.

15 La dosificación que va a administrarse de un compuesto de la invención variará según el compuesto particular, la enfermedad implicada, el sujeto, y la naturaleza y la gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía de administración seleccionada. La dosificación apropiada puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

20 Las composiciones pueden contener desde el 0,1% en peso, preferiblemente desde el 5-60%, más preferiblemente desde el 10-30% en peso, de un compuesto de invención, dependiendo del método de administración.

25 Se reconocerá por un experto en la técnica que la cantidad y separación óptimas de las dosificaciones individuales de un compuesto de la invención se determinarán por la naturaleza y el grado del estado que esté tratándose, la forma, la vía y el sitio de administración, y la edad y estado del sujeto particular que esté tratándose, y que un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas que han de usarse. Esta dosificación puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, puede alterarse o reducirse la cantidad y/o frecuencia de la dosificación, según la práctica clínica normal.

Los aspectos adicionales de la invención incluyen:

30 - un compuesto según la invención para su uso como producto farmacéutico;

35 - un compuesto según la invención para su uso como producto farmacéutico para el tratamiento de infecciones virales (especialmente infecciones por virus ARN) tal como infección por VHC o VIH, para su uso como antiinflamatorio o para profilaxis de rechazo de trasplantes de órganos;

- una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable;

40 - una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable que comprende además un segundo principio activo o principio activo posterior, especialmente un principio activo indicado para el tratamiento de infecciones virales tales como infección por VHC o VIH, para su uso como antiinflamatorio o para profilaxis de rechazo de trasplantes de órganos;

También se describen:

45 - un método de tratamiento de infecciones virales (especialmente infecciones por virus ARN) tal como infección por VHC o VIH, para su uso como antiinflamatorio o para profilaxis de rechazo de trasplantes de órganos que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto según la invención;

50 - uso de un compuesto según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales tales como infección por VHC o VIH, para su uso como antiinflamatorio o para profilaxis de rechazo de trasplantes de órganos.

Métodos generales

55 Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

60 El productor de sangliferina *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM n.º 9954, adquirido de DSMZ, Braunschweig, Alemania) también denominado BIOT-4253 y BIOT-4370 o sus derivados, tales como BIOT-4585 se mantienen en medio de agar de harina de avena, MAM, ISP4 o ISP2 (véase a continuación) a 28°C.

65 Se hizo crecer BIOT-4585 (para la metodología de construcción, véase el ejemplo 1) en agar de harina de avena a 28°C durante 7-10 días. Se recogieron las esporas de la superficie de la placa de agar en glicerol estéril al 20% p/v en agua destilada y se almacenaron en alícuotas de 0,5 ml a -80°C. Se usó la reserva de esporas congeladas para

inocular medios de siembra SGS o SM25-3. Se incubó el medio de siembra inoculado con agitación entre 200 y 300 rpm con un desplazamiento vertical de 5,0 ó 2,5 cm a 27°C durante 24 horas. Se inoculó el medio de fermentación SGP-2 o BT6 con el 2,5%-10% del cultivo sembrado y se incubó con agitación entre 200 y 300 rpm con un desplazamiento vertical de 5 ó 2,5 cm a 24°C durante 4-5 días. Entonces se recogió el cultivo para su extracción.

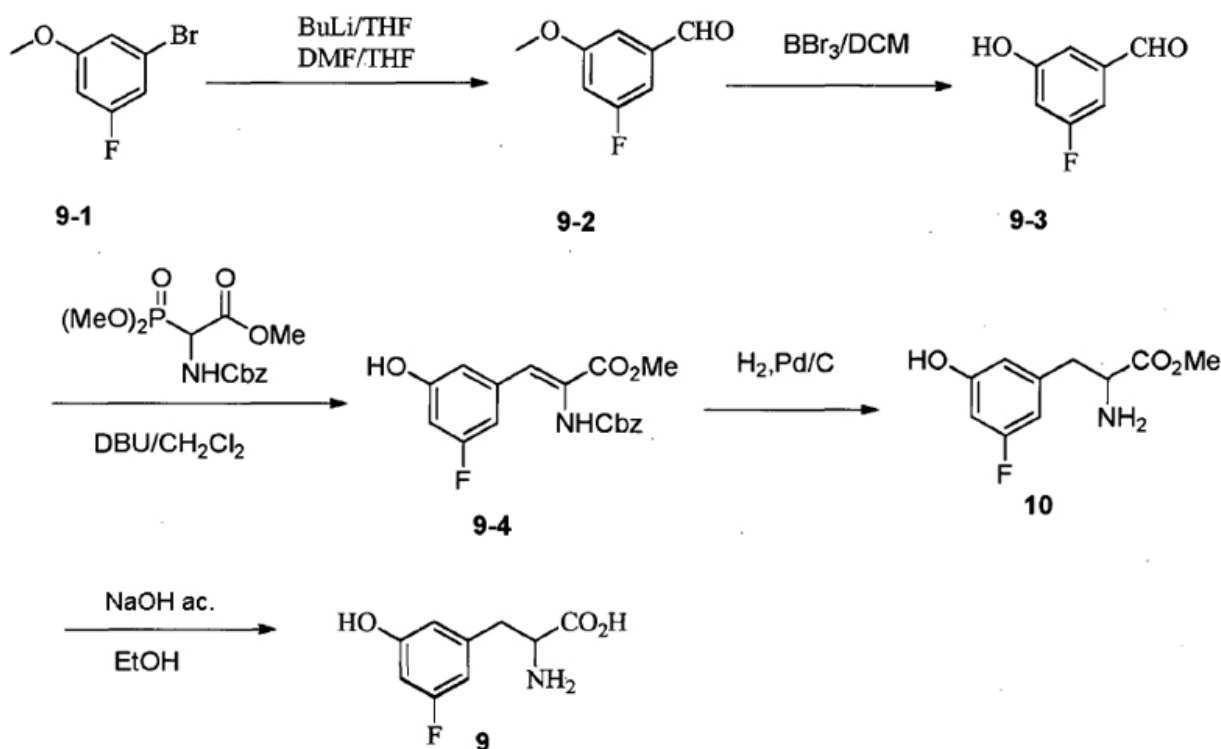
5

Análogo de meta-tirosina

Se adquirió (S)-2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo de NetChem (EE.UU.). Se adquirió 3-bromo-5-fluoroanisol (9-1) de Accela ChemBio Co., Ltd., (Shanghai, China) y también puede adquirirse de Amfinecom Inc (EE.UU.) o Apollo Scientific Ltd. (RU)). Se sintetizaron DL-5-fluoro-meta-tirosina (9) y 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10) tal como sigue.

10

DL-5-fluoro-meta-tirosina (9) y 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10)



15

A una disolución de 9-1 (20 g, 97,55 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) se le añadió gota a gota n-butil-litio (43 ml, 2,5 M, 107,3 mmol) a -78°C. Se agitó durante 30 minutos y se añadió N,N-dimetilformamida (15,1 ml, 195,1 mmol) a esta temperatura. Se agitó durante otros 30 minutos y se retiró el baño frío. Tras 1 hora, se extinguió la reacción con cloruro de amonio saturado acuoso. Se lavó la fase orgánica con agua y cloruro de sodio saturado acuoso, se secó (sulfato de sodio), se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía en sílice para dar 9-2.

20

A una disolución de 9-2 (6 g, 38,9 mmol) en DCM seco (200 ml) se le añadió gota a gota BBr_3 (4 M en DCM, 30 ml, 116,8 mmol) a -70°C. Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a -20°C durante 3 horas, se añadió agua helada cuidadosamente y se extrajo con DCM. Se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en sílice para dar el compuesto deseado 9-3.

25

A una disolución de 2-(benciloxicarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (4,64 g, 14 mmol) en DCM (150 ml) se le añadió DBU (4,26 g, 28 mmol) a temperatura ambiente. Tras 10 min, se añadió 9-3 (1,95 g, 14 mmol) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche. Se diluyó la disolución con EtOAc (150 ml), se separó y se lavó la fase orgánica con HCl 1 N, se secó sobre Na_2SO_4 , se filtró y se concentró. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en sílice para dar 9-4.

30

Se hidrogenó una disolución de 9-4 (1 g) en MeOH (20 ml) sobre 200 mg de Pd al 10%/C a presión normal durante la noche. Tras la eliminación del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para dar 10.

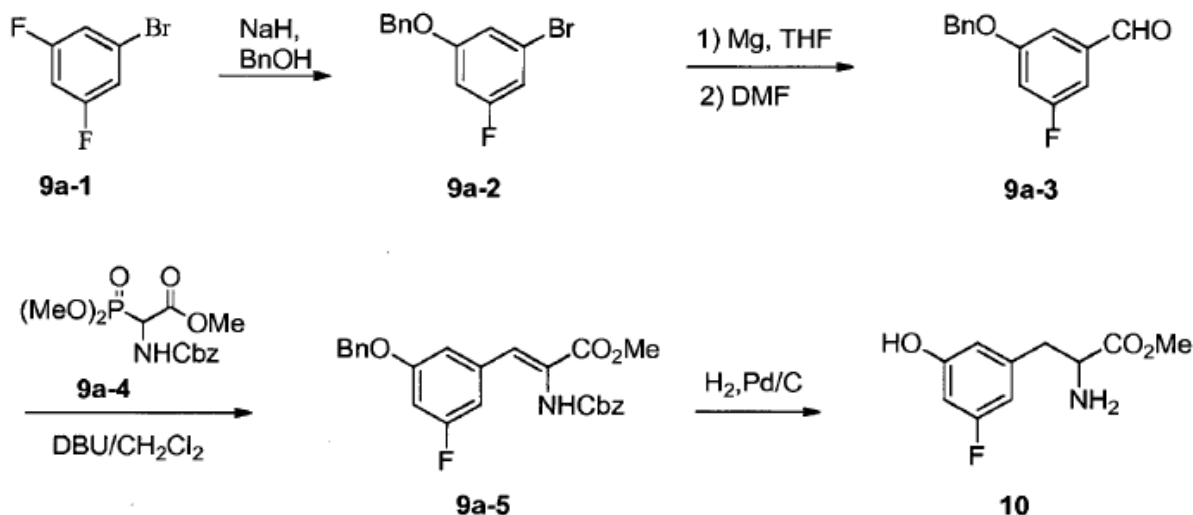
35

A una disolución de 10 (300 mg, 1,4 mmol) en EtOH (30 ml) se le añadió NaOH ac. (2 N, 4 ml), se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el disolvente y se neutralizó el residuo hasta pH=6 con HCl

2 N y se recogieron los cristales blancos que se formaron mediante filtración para dar el compuesto 9 objetivo.

Vía alternativa para 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10)

- 5 Se adquirió (3,5-difluorobromobenceno (9a-1) de Darui Fine Chemicals Co., Ltd., (Shanghai, China) y también puede adquirirse de Alfa Aesar o Sigma Aldrich.)



10 Preparación de 9a-2

A una disolución de BnOH (1,61 ml, 15,54 mmol) en DMF (30 ml) se le añadió NaH (622 mg, dispersión al 60% en aceite mineral, 15,54 mmol) a 0°C. Se continuó con la agitación a temperatura ambiente durante 0,5 h para dar una disolución transparente. Se añadió 9a-1 (1,79 ml, 15,54 mmol) a una tasa tal para mantener la temperatura por debajo de 40°C. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche para dar una disolución amarilla. Se extinguió la reacción mediante agua y se extrajo con éter de petróleo (35 ml X 34). Se concentraron las fases orgánicas combinadas. Y se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con éter de petróleo para proporcionar 9a-2 (2,544 g) como aceite incoloro.

20 Preparación de 9a-3

A un matraz seco de tres bocas se le añadieron Mg (170,1 mg, 7,10 mmol), THF anhidro (10 ml) y una pequeña cantidad de yodo bajo nitrógeno. Se añadió 1/3 de 9a-2 (1,664 g, 5,9192 mmol) en THF (2 ml). Se calentó la mezcla a reflujo. Durante este tiempo, la mezcla amarilla se convirtió gradualmente en amarillo brillante. Entonces, se añadieron los restantes 2/3 de 9a-2 gota a gota, y se sometió a reflujo la mezcla de reacción durante otras 0,5 h.

A la mezcla anterior se le añadió DMF (0,504 ml, 6,51 mmol) lentamente a 0°C. Se continuó con la agitación durante 0,5 h a temperatura ambiente. Se añadió HCl (2 M, 10 ml) y se evaporó el THF. Se extrajo el residuo con acetato de etilo (25 ml X 3). Y se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con de éter de petróleo a éter de petróleo/acetato de etilo = 20/1 para dar 9a-3 (694 mg) como aceite incoloro.

Preparación de 9a-5

A una disolución de 2-(benzyloxycarbonylamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo, 9a-4 (993 mg, 3,00 mmol) en DCM (30 ml) se le añadió DBU (832 ul, 5,57 mmol) a temperatura ambiente. Tras 10 min, se añadió 9a-3 (694 mg, 3,01 mmol) y se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 h. Se lavó la disolución con HCl (1 M, 10 ml), y se secaron las fases orgánicas combinadas y se concentraron a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en sílice (eluyendo con diclorometano/acetato de etilo = 10/1) para dar 9a-5 (1,11 g).

Preparación de 10

Se hidrogenó una disolución de 9a-5 (100 mg) en MeOH (50 ml) sobre 20 mg de Pd al 10%/C a presión normal durante 2 h. Tras la eliminación del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para dar 10 (33 mg).

Fórmulas de los medios

ES 2 533 437 T3

Se preparó el agua usada para preparar los medios usando el sistema de purificación de agua de calidad analítica Elix de Millipore

Medio de siembra SGS

5

Componente (y proveedor)	Fórmula	
Glucosa (Sigma, G7021)	7,50	g
Glicerol (Fisher scientific, G/0650/25)	7,50	g
extracto de levadura (Becton Dickinson, 212770)	1,35	g
extracto de malta (Becton Dickinson, 218630)	3,75	g
almidón de patata (soluble) (Sigma, S2004)	7,50	g
NZ-amina A (Sigma, C0626)	2,50	g
harina de soja tostada, Nutrisoy (ADM, 063-160)	2,50	g
L-asparagina (Sigma, A0884)	1,00	g
CaCO ₃ (Calcitec, V/40S)	0,05	g
NaCl (Fisher scientific, S/3160/65)	0,05	g
KH ₂ PO ₄ (Sigma, P3786)	0,25	g
K ₂ HPO ₄ (Sigma, P5379)	0,50	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, M7774)	0,10	g
disolución de oligoelementos B	1,00	ml
Agar	1,00	g
Antiespumante SAG471 (GE Silicones, SAG471)	* 0,20	ml
H ₂ O OI hasta un vol. final de	** 1,00	l

se ajusta el pH antes de la esterilización a pH 7,0 con NaOH 10 M/H₂SO₄ 10 M
se esteriliza calentando a 121°C, 20-30 min (en autoclave)

Notas

* el antiespumante se usa sólo en fermentadores de siembra, NO en matraces de siembra

** volumen final ajustado en consecuencia para tener en cuenta el volumen de siembra

Disolución de oligoelementos B

Componente	Fórmula	
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, F8633)	5,00	g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, Z0251)	4,00	g
MnCl ₂ ·4H ₂ O (Sigma, M8530)	2,00	g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (Aldrich, 20,919-8)	0,20	g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ (Fisher scientific, A/5720/48)	0,20	g
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Sigma, C2644)	0,10	g
H ₃ BO ₃ (Sigma, B6768)	0,10	g
KI (Alfa Aesar, A12704)	0,05	g
H ₂ SO ₄ (95%) (Fluka, 84720)	1,00	ml
H ₂ O OI hasta un vol. final de	1,00	l

10 Medio de producción SGP2

Componente	Fórmula	
harina de soja tostada (Nutrisoy) (ADM, 063-160)	20,00	g
Glicerol (Fisher scientific, G/0650/25)	40,00	g
tampón MES (Acros, 172595000)	19,52	g
Antiespumante SAG471 (GE Silicones, SAG471)	*0,20	ml
H ₂ O OI hasta un vol. final de	**1,00	l

se ajusta el pH antes de la esterilización a pH 6,8 con NaOH 10 M
se esteriliza calentando a 121°C, 20-30 min (en autoclave)

Notas

* volumen final ajustado en consecuencia para tener en cuenta el volumen de siembra

** el antiespumante se usó sólo en fermentadores, no en matraces

Medio SM25-3 (también denominado SM25)

Componente	
Glicerol (Fisher scientific, G/0650/25)	40 g
Peptona de soja A3 SC (Organotechnie)	10 g
Extracto de malta (Difco)	21 g
hasta un vol. final de	1 l

No se ajusta el pH antes de la esterilización (es decir, pH 7,0)

Medio ISP4

Componente	
Almidón soluble (Difco)	10 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Disolución de sales de oligoelementos ISP	1 ml
Agar	20 g
hasta un volumen final de	1 l
Hacer una pasta con el almidón en un pequeño volumen de agua fría y llevar hasta un volumen de 500 ml	
Añadir otros componentes a la disolución II en 500 ml de agua. El pH debe estar entre pH 7,0 y pH 7,4 (pH 7,3). Mezclar dos disoluciones juntas y añadir agar	

5 Sales de oligoelementos ISP

Componente	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
hasta un volumen final de	1 l
Almacenar a 4 grados C	

Agar de harina de avena (ISP3)

Componente	Fórmula	
Harina de avena	20,00	g
Disolución de oligoelementos ISP	1,00	ml
Agar Bacto (Becton Dickinson)	18,00	g
H ₂ O IO hasta un volumen final de	1,00	l
Se cuecen 20 g de harina de avena en 1 l de agua sobre una placa caliente (o microondas) durante 20 minutos. Se filtra la mezcla cocida a través de gasa rectilínea/muselina y se lleva a pH 7,2 y se vuelve a llevar a 1 l. Se añade 1 ml de disolución de oligoelementos ISP. Entonces se añaden 18 g por l de agar antes de esterilizar.		

10

Agar MAM

Componente	Fórmula	
Almidón de trigo (Sigma)	10,00	g
Polvo de maceración de maíz (Roquette)	2,50	g
Extracto de levadura (Becton Dickinson)	3,00	g
CaCO ₃ (Calcitec)	3,00	g
FeSO ₄ (Sigma)	0,300	g
Agar Bacto (Becton Dickinson)	20,00	g
H ₂ O IO hasta un volumen final de	1,00	l
pH 5,8 antes de someter al autoclave		

Medios de producción BT6

15

Componente	Fórmula	
Glucosa (Sigma)	50,00	g
Nutrisoy (ADM)	30,00	g
NaCl (Fisher)	5,00	g
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Sigma)	3,00	g
CaCO ₃ (Calcitec)	6,00	g
H ₂ O IO hasta un volumen final de	1,00	l
Ajustar el pH a 7,0, entonces añadir CaCO ₃		

Agar ISP2

Componente	Fórmula	
------------	---------	--

Extracto de levadura (Becton Dickinson)	4,00	g
Extracto de malta (Becton Dickinson)	10,00	g
Dextrosa (Sigma)	4,00	g
Agar Bacto (Becton Dickinson)	20,0	g
H ₂ O IO hasta un volumen final de	1,00	l
Ajustar el pH a 7,3 antes de añadir agar y esterilizar		

Método de fermentación general

- 5 Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 (para la metodología de construcción, véase el ejemplo 1) a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 4,0 ml de reserva de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (desplazamiento vertical de 5,0 cm). A partir del cultivo de siembra, se transfirieron 25 ml a 250 ml de medio de producción SGP2 + HP20 al 5% en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Tras 24 horas de cultivo a 24°C y 250 rpm (desplazamiento vertical de 2,5 cm), se añadieron 10 2 ml de una disolución racémica 250 mM o enantioméricamente pura 125 mM del precursor deseado (por ejemplo (S)-2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo, DL-5-fluoro-meta-tirosina (9) o 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10)), en ácido clorhídrico 1 M y 2 ml de una disolución metalónica 250 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración final 1 mM de los enantiómeros individuales de los precursores. Puede usarse opcionalmente DMSO en lugar de ácido clorhídrico 1 M. Puede omitirse opcionalmente el ácido DL-piperázico. Se continuó con el cultivo durante cuatro días a 24°C y 250 rpm (desplazamiento vertical de 2,5 cm).

Análisis de caldos de cultivo mediante CL-UV y CL-UV-EM

- 20 Se añaden caldo de cultivo (1 ml) y acetato de etilo (1 ml) y se mezclan durante 15-30 min seguido por centrifugación durante 10 min. Se recogen 0,4 ml de la fase orgánica, se evaporan hasta la sequedad y entonces se vuelven a disolver en 0,20 ml de acetonitrilo.

Condiciones de HPLC:

- 25 Columna C18 Hyperclone BDS C18, 3 u, 4,6 mm x 150 mm
- Dotada de un cartucho de seguridad C18 analítico de Phenomenex (KJ0-4282)
- 30 Temperatura de la columna a 50°C
- Velocidad de flujo 1 ml/min
- Monitorizar UV a 240 nm
- 35 Inyectar alícuota de 20 ul
- Gradiente de disolventes:
- 40 0 min: 55% de B
- 1,0 min: 55% de B
- 6,5 min: 100% de B
- 45 10,0 min: 100% de B
- 10,05 min: 55% de B
- 50 13,0 min: 55% de B
- El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%
- El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
- 55 En estas condiciones SfA eluye a los 5,5 min
- En estas condiciones SfB eluye a los 6,5 min
- 60 Se realiza CL-EM en un sistema de HPLC HP1100 de Agilent integrado en combinación con un espectrómetro de

masas por electropulverización Esquire 3000+ de Bruker Daltonics que funciona en modo de ión positivo usando la cromatografía y los disolventes descritos anteriormente.

- 5 Método de CL-EM QC
- Condiciones de HPLC:
- Columna C18 Hyperclone BDS C18, 3 u, 4,6 mm x 150 mm
- 10 Dotada de un cartucho de seguridad C18 analítico de Phenomenex (KJ0-4282)
- Temperatura de la columna a 50°C
- Velocidad de flujo 1 ml/min
- 15 Monitorizar UV a 210, 240 y 254 nm
- Gradiente de disolventes:
- 20 0 min: 10% de B
- 2,0 min: 10% de B
- 15 min: 100% de B
- 25 17 min: 100% de B
- 17,05 min: 10% de B
- 30 20 min: 10% de B
- El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%
- El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
- 35 Condiciones de EM:
- La EM funciona en modo de intercalación (intercalando entre positivo y negativo), explorando desde 150 hasta 1500 uma.
- 40 Método de difracción de rayos X de polvo (XRPD)
- Se comprimieron de manera suave aproximadamente 2 mg de muestra en el soporte de muestras de sílice cortado en oblicuo individual con ruido de fondo cero de XRPD. Entonces se cargó la muestra en un difractómetro X-Pert MPD de Philips y se analizó usando las siguientes condiciones experimentales:
- 45
- Ánodo del tubo: Cu
- Tensión del generador: 40 kV
- 50 Corriente del tubo. 40 mA
- Longitud de onda alfa1: 1,5406 Å
- 55 Longitud de onda alfa2: 1,5444 Å
- Ángulo de inicio [2 theta]: 5
- Ángulo de finalización [2 theta]: 50
- 60 Exploración continua
- Ensayo de replicón *in vitro* para la evaluación de la actividad antiviral contra VHC
- 65 Puede someterse a prueba la eficacia antiviral contra el genotipo 1 de VHC tal como sigue: Un día antes de la adición del artículo de prueba, se recogieron células Huh5.2 que contenían el genotipo 1b, replicón 1389luc-ubi-

neo/NS3-3'/5.1 de VHC (Vrolijk *et al.*, 2003) y subcultivadas en medio de crecimiento de células [DMEM (n.º de catálogo 41965039) complementado con FCS al 10%, aminoácidos no esenciales al 1% (11140035), penicilina/estreptomina al 1% (15140148) y geneticina al 2% (10131027); Invitrogen] a una razón de 1,3-1,4 y crecidas durante 3-4 días en matraces de cultivo tisular de 75 cm² (Techno Plastic Products), y se sembraron en medio de ensayo (DMEM, FCS al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomina al 1%) a una densidad de 6500 células/pocillo (100 µl/pocillo) en placas de microtitulación de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson para la evaluación del efecto antimetabólico y CulturPlate, Perkin Elmer para la evaluación del efecto antiviral). Se incuban las placas de microtitulación durante la noche (37°C, 5% de CO₂, humedad relativa del 95-99%), produciendo una monocapa de células no confluyente.

Se preparan series de dilución; cada serie de dilución se realiza al menos por duplicado. Tras configurar el ensayo, se incuban las placas de microtitulación durante 72 horas (37°C, 5% de CO₂, humedad relativa del 95-99%).

Para la evaluación de los efectos antimetabólicos, se aspira el medio de ensayo, se sustituye por 75 µl de una disolución al 5% de MTS (Promega) en medio libre de rojo fenol y se incuba durante 1,5 horas (37°C, 5% de CO₂, humedad relativa del 95-99%). Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 498 nm (Safire², Tecan) y las densidades ópticas (valores de DO) se convierten en porcentajes de los controles no tratados.

Para la evaluación de los efectos antivirales, se aspira el medio de ensayo y se lavan las monocapas de células con PBS. Se aspira el tampón de lavado, se añaden 25 µl de tampón de lisis Glo (n.º de catálogo E2661, Promega) tras lo cual se permite que continúe la lisis durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 50 µl de sistema de ensayo de luciferasa (n.º de catálogo E1501, Promega) y se cuantifica inmediatamente la señal de luminiscencia de luciferasa (tiempo de integración de 1000 ms/pocillo, Safire², Tecan). Se convierten las unidades de luminiscencia relativa en porcentajes de los controles no tratados.

Las CE50 y CE90 (valores obtenidos a partir de la curva de dosis-respuesta) representan las concentraciones a las que se observaría inhibición de replicación viral del 50% y el 90%, respectivamente. La CC50 (valor obtenido a partir de la curva de dosis-respuesta) representa la concentración a la que la actividad metabólica de las células se reduciría al 50% de la actividad metabólica de las células no tratadas. El índice de selectividad (IS), indicativo de la ventana terapéutica del compuesto, se calcula como CC₅₀/CE₅₀.

Se considera que una concentración de compuesto provoca un efecto antiviral genuino en el sistema de replicación de VHC cuando, a esa concentración particular, el efecto anti-replicación está por encima del 70% del umbral y no se observa una reducción de más del 30% en la actividad metabólica.

Ensayo de replicación *in vitro* para la evaluación de la actividad antiviral contra VHC en los genotipos 1a y 2a

Se hacen crecer células con replicación (replicones subgenómicos de genotipo 1a (H77) y 2a (JFH-1)) en medios esenciales modificados por Dulbecco (DMEM), suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina-estreptomina (pen-estrep) al 1%, glutamina al 1%, aminoácidos no esenciales al 1%, G418 250 µg/ml en un incubador con el 5% de CO₂ a 37°C. Todos los reactivos del cultivo celular pueden adquirirse de Mediatech (Herndon, VA).

Se someten las células con replicación a tripsinización y se siembran a 5 x 10³ células por pocillo en placas de 96 pocillos con los medios anteriores sin G418. Al día siguiente, se sustituye el medio de cultivo con DMEM que contienen compuestos diluidos en serie en presencia de FBS al 5%. El ensayo antiviral de replicación de VHC examina los efectos de los compuestos en una serie de diluciones de compuestos. Brevemente, se siembran las células que contienen replicación de VHC en placas de 96 pocillos. Se diluye en serie el artículo de prueba con DMEM más FBS al 5%. Se aplica el compuesto diluido a los pocillos apropiados e la placa. Tras 72 h de incubación a 37°C, se procesan las células. Se extrae el ARN intracelular de cada pocillo con un kit RNeasy 96 (Qiagen). Se determina el nivel de ARN de VHC mediante un ensayo de PCR en tiempo real con transcriptasa inversa usando los reactivos de mezcla maestra de RT-PCR de una etapa TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) tal como se describió anteriormente (Vrolijk *et al.*, 2003). Se miden los efectos citotóxicos con los reactivos de control de ARN ribosómico TaqMan® (Applied Biosystems) como una indicación del número de células. Entonces se usa la cantidad de ARN de VHC y ARN ribosómico para obtener los valores de CI₅₀ aplicables (concentración que inhibe la replicación del replicón en el 50%).

Evaluación del metabolismo de microsomas (ensayo de estabilidad de microsomas)

Puede someterse a prueba la tasa de metabolismo en microsomas tal como sigue:

Se diluyeron microsomas de hígado de ratón o ser humano con tampón C (tampón fosfato de potasio 0,1 M, EDTA 1,0 mM, pH 7,4) hasta una concentración de 2,5 mg/ml. Entonces se prepararon muestras para determinar la estabilidad microsómica añadiendo 50 µl de disolución con adiciones conocidas de compuesto 5 µM (0,5 µl de disolución madre de DMSO 10 mM en 9,5 µl de ACN, añadidos a 990 µl de tampón C) a 50 µl de disolución microsómica (2,5 mg/ml), 110 µl de tampón C y se mezclaron bien. Se preincubaron todas la muestras durante

aproximadamente 15 minutos a 37°C. Tras esto, se inició la reacción añadiendo 40 µl de la disolución de NADPH (12,5 mM) con mezclado suave. Se retiraron alícuotas (40 µl) a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos y se extinguió con patrón interno que contenía ACN (120 µl). Se retiraron las proteínas mediante centrifugación (4000 rpm, 15 min) y se analizó la placa de muestra para determinar la concentración del compuesto mediante CL-EM/EM. Entonces se calcularon las semividas mediante métodos convencionales, comparando la concentración del analito con la cantidad originalmente presente.

Evaluación de la estabilidad de hepatocitos

Se colocan hepatocitos crioconservados, previamente almacenados en nitrógeno líquido en un baño de agua con agitación a 37 ± 1°C durante 2 min ± 15 s. Entonces se añaden los hepatocitos a volúmenes 10X de tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit (KHB) precalentado (glucosa 2000 mg/l, sin carbonato de calcio ni bicarbonato de sodio, Sigma), se mezclan suavemente y se centrifugan a 500 rpm durante 3 minutos. Tras la centrifugación, se retira cuidadosamente el sobrenadante y se añade un volumen 10X de tapón KHB precalentado para resuspender el sedimento de células. Esto se mezcla suavemente y se centrifuga a 500 rpm durante 3 minutos. Entonces se retira el sobrenadante y se desecha. Entonces se determinan la viabilidad y el rendimiento celulares mediante recuentos de células, y estos valores se usan para generar suspensiones de hepatocitos humanos a la densidad de siembra apropiada (densidad de células viables = 2 x 10⁶ células/ml). Se prepara una disolución de dosificación 2X en KHB precalentado (DMSO al 1%) (disolución con adiciones conocidas 200 µM: 20 µl de disolución madre de sustrato (10 mM) en 980 µl de DMSO, disolución de dosificación 2X: 10 µl de disolución con adiciones conocidas 200 µM en 990 µl de KHB (2 µM tras la dilución).

Se añaden 50 µl de disolución de dosificación 2X precalentada a los pocillos y se añaden 50 µl de disolución de hepatocitos precalentada (2 X 10⁶ células/ml) y se comienza la medición del tiempo. Entonces se incuba la placa a 37°C. Se añaden 100 µl de patrón interno que contiene acetonitrilo a cada uno de los pocillos tras la finalización del tiempo de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 minutos), se mezcla suavemente y se añaden 50 µl de disolución de hepatocitos precalentada (2 X 10⁶ células/ml). Al final de la incubación, se determina la viabilidad celular. Se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se diluyen dos veces los sobrenadantes con agua ultrapura y se analizan los niveles de compuesto mediante CL-EM/EM.

Evaluación de la solubilidad en agua

Puede someterse a prueba la solubilidad en agua tal como sigue: Se prepara una disolución madre 10 mM del análogo de sangliferina en DMSO al 100% a temperatura ambiente. Se llevan alícuotas de 0,01 ml por triplicado a 0,5 ml con o bien disolución de PBS 0,1 M, pH 7,3 o bien DMSO al 100% en viales de color ámbar. Se agitan las disoluciones 0,2 mM resultantes, a temperatura ambiente en un agitador IKA® vibrax VXR durante 6 h, seguido por la transferencia de las disoluciones o suspensiones resultantes a tubos Eppendorf de 2 ml y centrifugación durante 30 min a 13200 rpm. Entonces se analizan alícuotas del fluido sobrenadante mediante el método de CL-EM tal como se describió anteriormente.

Alternativamente, puede someterse a prueba la solubilidad en PBS a pH 7,4 tal como sigue: Se genera una curva de calibración diluyendo los compuestos de prueba y los compuestos control hasta 40 µM, 16 µM, 4 µM, 1,6 µM, 0,4 µM, 0,16 µM, 0,04 µM y 0,002 µM, con MeOH al 50% en H₂O. Entonces se diluyen adicionalmente los puntos patrón 1:20 en MeOH:PBS 1:1. Las concentraciones finales tras la dilución 1:20 son 2000 nM, 800 nM, 200 nM, 80 nM, 20 nM, 8 nM, 2 nM y 1 nM. Entonces se mezclan los patrones con el mismo volumen (1:1) de patrón interno que contiene ACN (hidroximacrociclo, 6). Se centrifugan las muestras (5 min, 12000 rpm), luego se analizan mediante CL/EM.

	Disolución (µl)	MeOH/H ₂ O (1:1) (µl)		Disolución de trabajo (µM)	Disolución (µl)	MeOH/Tampón (1:1) (µl)		Disolución final (nM)
10 mM	10	240	→	400				
400 µM	50	450	→	40	20	380	→	2000
	20	480	→	16	20	380	→	800
40 µM	50	450	→	4	20	380	→	200
16 µM	50	450	→	1,6	20	380	→	80
4 µM	50	450	→	0,4	20	380	→	20
1,6 µM	50	450	→	0,16	20	380	→	8
0,4 µM	50	450	→	0,04	20	380	→	2
0,04 µM	50	950	→	0,002	20	380	→	1

Se preparan los compuestos de prueba como disoluciones madre en DMSO a una concentración de 10 mM. Se diluyen las disoluciones madre por duplicado en PBS, pH 7,4 en tubos Eppendorf de 1,5 ml a una concentración objetivo de 100 µM con una concentración de DMSO final del 1% (por ejemplo 4 µL de disolución madre de DMSO

10 mM en 396 μ l de tampón fosfato 100 mM). Entonces se agitan suavemente los tubos de muestra durante 4 horas a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras (10 min, 15000 rpm) para precipitar las partículas no disueltas. Se transfieren los sobrenadantes a tubos nuevos y se diluyen (el factor de dilución para el artículo de prueba individual se confirma mediante el nivel de señal del compuesto en el instrumento analítico aplicado) con PBS. Entonces se mezclan las muestras diluidas con el mismo volumen (1:1) de MeOH. Se mezclan finalmente las muestras con el mismo volumen (1:1) de patrón interno que contiene ACN (hidroximacrociclo, **6**) para análisis de CL-EM/EM.

Evaluación de la permeabilidad celular

Puede someterse a prueba la permeabilidad celular tal como sigue: Se disuelve el compuesto de prueba hasta 10 mM en DMSO y entonces se diluye adicionalmente en tampón para producir una concentración de dosificación final de 10 μ M. También se incluye el marcador de fluorescencia amarillo Lucifer para monitorizar la integridad de la membrana. Entonces se aplica el compuesto de prueba a la superficie apical de monocapas de células Caco-2 y se mide la permeación del compuesto al interior del compartimento basolateral. Esto se realiza en el sentido inverso (de basolateral a apical) para investigar el transporte activo. Se usa CL-EM/EM para cuantificar los niveles tanto de compuestos de prueba como control patrón (tal como propanolol y acebutolol).

Evaluación *in vivo* de la farmacocinética

También pueden usarse ensayos *in vivo* para medir la biodisponibilidad de un compuesto. Generalmente, un compuesto se administra a un animal de prueba (por ejemplo ratón o rata) tanto por vía intravenosa (i.v.) como por vía oral (v.o.) y se extraen muestras de sangre a intervalos regulares para examinar cómo varía la concentración plasmática del fármaco a lo largo del tiempo. Puede usarse la evolución en el tiempo de la concentración plasmática a lo largo del tiempo para calcular la biodisponibilidad absoluta del compuesto como porcentaje usando modelos convencionales. A continuación se describe un ejemplo de un protocolo típico.

Se administró a ratones 1, 10 ó 100 mg/kg del compuesto de la invención o el compuesto original por vía i.v. o por v.o. Se extraen muestras de sangre a 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 420 y 2880 minutos y se determina la concentración del compuesto de la invención o el compuesto original en la muestra mediante HPLC. Entonces pueden usarse la evolución en el tiempo de las concentraciones plasmáticas para obtener parámetros clave tales como el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC – que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco sin cambiar que alcanza la circulación sistémica), la concentración plasmática del fármaco máxima (pico), el tiempo en que se produce la concentración plasmática del fármaco máxima (tiempo de pico); los factores adicionales que se usan en la determinación precisa de la biodisponibilidad incluyen: la semivida terminal del compuesto, el aclaramiento corporal total, el volumen de distribución en estado estacionario y % de F. Entonces se analizan estos parámetros mediante métodos compartimentales y no compartimentales para dar una biodisponibilidad en porcentaje calculada, para un ejemplo de este tipo de método véase Egorin *et al.* 2002, y referencias en el mismo.

Evaluación *in vivo* de farmacocinética oral e intravenosa (método específico)

Para determinar análogos de sangliferina, se analiza sangre completa. Los compuestos se formulan en el 5% de etanol / el 5% de Cremophor EL / el 90% de solución salina para administración tanto por v.o. como por vía i.v. Se administra a grupos de 3 ratones CD1 macho o bien 1 mg/kg por vía i.v. o bien 5 ó 10 mg/kg por v.o. Se extraen muestras de sangre (40 μ l) a través de la vena safena, antes de la administración y a las 0,25, 0,5, 2, 8 y 24 horas, y se diluyen con una cantidad igual de dH₂O y se colocan en hielo seco inmediatamente. Se almacenan las muestras a -70°C hasta el análisis. Se determina la concentración del compuesto de la invención o compuesto original en la muestra mediante CL-EM tal como sigue: se añaden 20 μ l de sangre:H₂O (1:1, v/v)/muestra PK con 20 μ l de patrón interno (hidroximacrociclo, **6**) a 20 μ l de disolución de trabajo 100 ng/ml/MeOH y 150 μ l de ACN, se agita con vórtex durante 1 minuto a 1500 rpm, y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. Entonces se inyecta el sobrenadante en CL-EM/EM. Se representa gráficamente la evolución en el tiempo de las concentraciones en sangre y se usa para obtener el área bajo la curva de concentración en sangre completa-tiempo (AUC – que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco sin cambiar que alcanza la circulación sistémica). Estos valores se usan para generar parámetros PK cuando sea posible.

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad

Se hacen crecer células Huh-7 y HepG2 obtenidas de la ATCC en medios esenciales modificados por Dulbecco (DMEM) que contienen suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina-estreptomicina (pen-estrep) al 1% y glutamina al 1%; mientras que se hacen crecer células CEM (células de leucemia de células T humanas obtenidas de la ATCC) en medio RPMI 1640 con FBS al 10%, pen-estrep al 1% y glutamina al 1%. Se aíslan CMSP humanas recientes de sangre completa obtenida al menos de dos donantes examinados normales. Brevemente, las células de sangre periférica se sedimentan/lavan 2-3 veces mediante centrifugación a baja velocidad y resuspensión en PBS para eliminar las plaquetas contaminantes. Las células sanguíneas lavadas se diluyen entonces 1:1 con solución salina

tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) y se estratifican sobre 14 ml de medio de separación de linfocitos (LSM; crecimiento celular realizado por Mediatech, Inc.; densidad 1,078± 0,002 g/ml; N.º de catálogo 85-072-CL) en un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugan durante 30 minutos a 600 X g. Se aspiran suavemente las CMSP dispuestas en bandas de la superficie de contacto resultante y posteriormente se lavan 2X con PBS mediante centrifugación a baja velocidad. Tras el lavado final, se cuentan las células mediante exclusión con azul de tripano y se resuspenden a 1×10^7 células/ml en RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal (FBS) al 15%, L-glutamina 2 mM, PHA-P 4 µg/ml. Se permite incubar las células durante 48-72 horas a 37°C. Tras la incubación, se centrifugan las CMSP y se resuspenden en RPMI 1640 con FBS al 15%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomomicina 100 µg/ml, gentamicina 10 µg/ml e IL-2 humana recombinante 20 U/ml.

Se evalúa la citotoxicidad del compuesto sometiendo a prueba concentraciones semilogarítmicas de cada compuesto por triplicado contra las células descritas anteriormente. El medio que contenía células solo sirve como control celular (CC). Se siembran células Huh-7 y HepG2 en placas de 96 pocillos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo. Al día siguiente, se aspiran los medios y se añaden 100 µl de medios correspondientes que contienen FBS al 5%. Se preparan diluciones del fármaco de prueba a una concentración 2X en tubos de microtitulación y se colocan 100 µl de cada concentración en los pocillos apropiados en un formato convencional. Tras 72 horas, se procesan las células para la evaluación de la citotoxicidad.

Se diluyen CMSP en medio reciente y se siembran en los pocillos interiores de una microplaca de 96 pocillos de fondo redondo a 5×10^4 células/pocillo en un volumen de 100 l. De manera similar, se siembran en placa células CEM a 1×10^4 células/pocillo. Entonces, se añaden 100 µl de preparaciones 2X de los fármacos de prueba en los pocillos apropiados en un formato convencional. Se mantienen los cultivos durante de seis a siete días y entonces se procesan para la determinación de la citotoxicidad.

La citotoxicidad se determina usando el kit de ensayo de integridad de membrana homogéneo CytoTox-ONE™ (Promega). El ensayo mide la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) de células con membranas dañadas en un formato fluorométrico homogéneo. La LDH liberada al medio de cultivo se mide con un ensayo enzimático acoplado que da como resultado la conversión de resazurina en un producto de resorufina fluorescente. La cantidad de fluorescencia producida es proporcional al número de células lisadas. Se aplican seis concentraciones diluidas en serie de cada compuesto a las células para obtener cuando sea aplicable los valores de CT50 (concentración tóxica del fármaco que disminuye la viabilidad celular en un 50%) y CT90 (concentración tóxica del fármaco que disminuye la viabilidad celular en un 90%).

Evaluación *in vitro* de la inhibición de transportadores MDR1 y MRP2

Para evaluar la inhibición y la activación de los transportadores MDR1 (glicoproteína P 1) y MRP2, puede usarse un ensayo de ATPasa *in vitro* de Solvo Biotechnology Inc. (Glavinas *et al.*, 2003). Se incuban los compuestos (a 0,1, 1, 10 y 100 µM) con vesículas de membrana MDR1 o MRP2 tanto en ausencia como en presencia de vanadato para estudiar la posible activación de ATPasa. Además, se realizan incubaciones similares en presencia de verapamilo/sulfasalazina con el fin de detectar la posible inhibición de la actividad ATPasa del transportador. La actividad ATPasa se mide cuantificando el fosfato inorgánico espectrofotométricamente. La activación se calcula a partir del aumento sensible a vanadato en la actividad ATPasa. La inhibición se determina mediante la disminución en la actividad ATPasa mediada por verapamilo/sulfasalazina.

Evaluación *in vitro* de la inhibición de transportadores Pgp usando células MDCK

Para evaluar la inhibición del transportador glicoproteína P (Pgp/MDR1), se usó un ensayo de ATPasa *in vitro* de Cyprotex. Se usaron células MDR1-MDCK obtenidas del NIH (Rockville, MD, EE.UU.). Tras el cultivo, se prepararon las monocapas aclarando las superficies tanto basolateral como apical dos veces con tampón a pH 7,4 y 37°C. Entonces se incubaron las células con tampón a pH 7,4 en los compartimentos tanto apical como basolateral durante 40 min a 37°C y el 5% de CO₂ con una humedad relativa del 95% para estabilizar los parámetros fisiológicos. Para el estudio de apical a basolateral (A-B), se retiró el tampón a pH 7,4 del compartimento apical y se substituyó por disoluciones de dosificación de loperamida antes de colocarse en las placas "complementarias". Se prepararon las disoluciones diluyendo loperamida en DMSO con tampón para dar una concentración final de loperamida de 5 µM (la concentración final de DMSO se ajusta al 1%). También se incluyó el marcador de integridad fluorescente amarillo Lucifer en la disolución de dosificación. Se realizó el experimento en presencia y ausencia del compuesto de prueba (aplicado a los compartimentos tanto apical como basolateral). Para el estudio de basolateral a apical (B-A), se colocó el sustrato de la glicoproteína P, loperamida (concentración final = 5 µM) en el compartimento basolateral. Se realizó el experimento en presencia y ausencia del compuesto de prueba (aplicado a los compartimentos apical y basolateral). Se llevaron a cabo incubaciones en una atmósfera del 5% de CO₂ con una humedad relativa del 95% a 37°C durante 60 min. Tras el periodo de incubación, se retiró la placa complementaria y se diluyeron las muestras apical y basolateral para su análisis mediante CL-EM/EM. Se realizó una única determinación de cada concentración de compuesto de prueba. En cada placa, también se examinó un inhibidor de control positivo. Se evaluó el compuesto de prueba a 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 y 50 µM. Se comprobó la integridad de las monocapas a lo largo de todo el experimento monitorizando la permeación de amarillo Lucifer usando análisis

fluorimétrico. Tras el análisis, se calculó una CI_{50} (es decir, concentración de inhibidor (fármaco de prueba) que logra la mitad del efecto de inhibición máxima).

Evaluación *in vitro* de inhibición de transportadores de captación

5 Para evaluar la inhibición de los transportadores de captación OAT1B1 y OAT1B3, se usó un ensayo de transportador de captación *in vitro* de Solvo Biotechnology Inc. Se realizaron experimentos de captación con artículo de prueba (AP) a 0,068, 0,2, 0,62, 1,8, 5,5, 16,7 y 50 μ M, en células CHO que expresan de manera estable los transportadores SLC humanos OATP1B1 y OATP1B3. Se usó la línea celular parental CHO-K como control negativo. Se sembraron en placa células (1×10^5 en 200 μ l de mezcla 1:1 de medio de Eagle modificado por Dulbecco y DMEM-F12 de Ham (F-12, Lonza, Nueva Jersey, EE.UU.) complementado con butirato de sodio 5 mM) en placas de cultivo tisular de 96 pocillos convencionales y se incubaron 24 horas antes del experimento a 37°C en una atmósfera del 5% de CO_2 y el 95% de aire. Antes de los experimentos, se aspiró el medio mediante succión a vacío, se lavaron las células con $2 \times 100 \mu$ l de tampón de Krebs-Henseleit, pH 7,3 (preparado a partir de Sigma chemicals, Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Se llevaron a cabo los experimentos de captación a 37°C en 50 μ l de tampón de Krebs-Henseleit (pH 7,3) que contenía el sustrato de sonda y el AP o disolvente, respectivamente. La concentración del disolvente orgánico fue igual en cada pocillo y no superó el 1% v/v. El sustrato de sonda para el ensayo de OATP1B1 fue E3S (0,1 μ M) y para el ensayo de OATP1B3 fue Fluo-3 (10 μ M). Se determinó la cantidad translocada de sustrato de sonda para cada pocillo en cpm. Se calcularon las actividades relativas a partir de la ecuación:

$$\% \text{ de actividad} = (A-B)/(C-D) \times 100$$

25 En la que A= cantidad translocada de sustrato en presencia de AP en células transfectadas, B= cantidad translocada de sustrato en presencia de AP en células parentales, C= cantidad translocada de sustrato en presencia de disolvente en células transfectadas y D= cantidad translocada de sustrato en presencia de disolvente en células parentales. La CI_{50} se definió como la concentración de AP necesaria para inhibir el transporte del sustrato de sonda en un 50%. La CI_{50} se obtuvo de la ecuación logística de tres parámetros; una curva ajustada en la representación gráfica de la actividad relativa frente a la concentración de AP mediante regresión no lineal.

30 Evaluación *in vitro* de inhibición de transportadores de flujo de salida

Para evaluar la inhibición de los transportadores de flujo de salida MRP2, MRP3 y BSEP, se usó un ensayo de transportador vesicular *in vitro* de Solvo Biotechnology Inc. Se incubaron los artículos de prueba (AP) (a 0,068, 0,2, 0,62, 1,8, 5,5, 16,7 y 50 μ M) con vesículas de membrana de transportador de flujo de salida (Solvo Biotechnology Inc.) tanto en ausencia como en presencia de ATP 4 mM para distinguir entre captación mediada por transportador y difusión pasiva de AP al interior de las vesículas. En el caso de los transportadores MRP2 y MRP3, se llevaron a cabo las reacciones en presencia de glutatión 2 mM. Se preincubaron las mezclas de reacción durante diez minutos a 37°C. Se iniciaron las reacciones mediante la adición de 25 μ l de MgATP 12 mM (concentración final de 4 mM en el ensayo) o tampón de ensayo para los controles de fondo. Se detuvieron las reacciones añadiendo 200 μ l de tampón de lavado helado y seguido inmediatamente por filtración en filtros de fibra de vidrio en un formato de 96 pocillos (placa de filtro). Se añadió tampón de centelleo a la placa de filtro lavada y secada y posteriormente se realizó el recuento de centelleo. Se sometieron los sustratos de sonda a taurocolato (2 μ M) para las vesículas de BSEP y a $E_2^{17}\beta$ G (1 μ M) para las vesículas de MRP2 y MRP3. Para todos los pocillos, se determinó la cantidad translocada del sustrato de sonda en unidades de cpm. Se calcularon las actividades relativas con la siguiente ecuación:

50 $\% \text{ de actividad} = (A-B)/(C-D) \times 100$, en la que A= cantidad translocada de sustrato en presencia de AP y ATP, B= cantidad translocada de sustrato en presencia de AP, C= cantidad translocada de sustrato en presencia de disolvente y ATP y D= cantidad translocada de sustrato en presencia de disolvente. La CI_{50} se definió como la concentración de AP necesaria para inhibir el transporte del sustrato de sonda en un 50%. La CI_{50} se obtuvo de la ecuación logística de tres parámetros; una curva ajustada en la representación gráfica de la actividad relativa frente a la concentración de AP mediante regresión no lineal.

55 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antiviral contra VIH

Puede someterse a prueba la eficacia antiviral contra VIH tal como sigue: Se aíslan macrófagos y linfocitos T CD4+ derivados de sangre tal como se describió anteriormente (Bobardt *et al.*, 2008). Brevemente, se purificaron CMSP humanas de sangre reciente obteniendo bandas en Ficoll-Hypaque (30 min, 800 g, 25°C). Se purificaron células T CD4+ humanas a partir de las CMSP mediante selección positiva con perlas Dynabead anti-CD4 y posterior liberación usando Detachabead. Se cultivaron las células en medio RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con FCS al 10%, MEM-aminoácidos, L-glutamina, MEM-vitaminas, piruvato de sodio y penicilina más estreptomycinina y se activaron posteriormente con el superantígeno bacteriano enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB; 100 ng/ml) y células CMSP destruidas con mitomicina C de otro donante (razón de células CMSP:CD4 10:1). Tres días tras la estimulación, se repartieron las células 1:2 en medio que contenía IL-2 (concentración final 200 unidades/ml).

- Entonces se repartieron los cultivos 1:2 cada 2 días en medio de IL-2 y se infectaron con VIH a los 7 días tras la estimulación. Para generar macrófagos humanos primarios, se purificaron monocitos a partir de CMSP humanas mediante selección negativa y se activaron y se cultivaron a una concentración celular de 10^6 /ml en DMEM, complementado con FCS al 10%, MEM-aminoácidos, L-glutamina, MEM-vitaminas, piruvato de sodio y penicilina (100 unidades/ml), estreptomina (100 mg/ml) y factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) humano recombinante 50 ng/ml y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada complementada con el 5% de CO₂. Para obtener macrófagos derivados de monocitos, se permitió que las células se adhirieran al plástico y se cultivaron durante 6 días para permitir la diferenciación.
- 5
- 10 Se incubaron células HeLa CD4+, células de Jurkat, linfocitos T de sangre periférica CD4+ activados y macrófagos (500.000 células/100 μ l) con pNL4.3GFP (virus X4) o pNL4.3-BaL-GFP (virus R5) (100 ng de p24) en presencia de concentraciones crecientes del artículo de prueba. Cuarenta y ocho horas después, se puntuó la infección analizando el porcentaje de células positivas para GFP mediante FACS y se calculó la CE₅₀.
- 15 Ensayo *in vitro* para evaluar la actividad antiviral contra VHB
- Puede someterse a prueba la eficacia antiviral contra VHB tal como sigue: Se siembran en placa células HepG2 2.2.15 en placas de microtitulación de 96 pocillos. Tras 16-24 horas, se lava la monocapa confluyente de células HepG2 2.2.15 y se sustituye el medio por medio completo que contiene diversas concentraciones de un compuesto de prueba por triplicado (por ejemplo, seis concentraciones semilogarítmicas). Tres días después, se sustituye el medio de cultivo por medio reciente que contiene los compuestos de prueba diluidos de manera apropiada. Seis días tras la administración inicial del compuesto de prueba, se recoge el sobrenadante del cultivo celular, se trata con pronasa y luego se usa en un ensayo de qPCR TaqMan cuantitativo en tiempo real. Se detecta el ADN de VHB amplificado por PCR en tiempo real monitorizando los aumentos en las señales de fluorescencia que resultan de la degradación exonucleotídica de una molécula de sonda fluorescente extinguida que se hibrida con el ADN de VHB amplificado. Para cada amplificación por PCR se genera simultáneamente una curva patrón usando diluciones de ADN de VHB purificado. Se calcula la actividad antiviral a partir de la reducción en los niveles de ADN de VHB (CI₅₀). Entonces se emplea un ensayo de captación de colorante para medir la viabilidad celular, que se usa para calcular la toxicidad (CT₅₀). Se calcula el índice terapéutico (IT) como CT₅₀/CI₅₀.
- 20
- 25
- 30 Ensayo de reacción linfocitaria mixta (MLR) *in vitro* para la evaluación de la actividad inmunosupresora
- Se sometió a prueba la actividad inmunosupresora tal como sigue: Se purificaron poblaciones de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de la sangre de dos donantes voluntarios no relacionados normales (A y B), usando centrifugación en Histopaque. Se contaron las células y se sembraron en placa a 1×10^5 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medios RPMI, con complementos y suero de AB humano al 2%.
- 35
- Las condiciones de cultivo incluyeron: poblaciones de células A y B solas y población de células A y B mixta en ausencia o presencia de compuestos de prueba, cada uno a 6 concentraciones diferentes. Se sometieron a prueba los compuestos a dosis que oscilaban entre 10 μ M y 0,0001 μ M en incrementos de 1 log. Los pocillos control contenían una concentración comparable de vehículo (DMSO al 0,5%) a la presente en los pocillos con compuesto de prueba. Se establecieron los cultivos por triplicado en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C en el 5% de CO₂ en una atmósfera humidificada. Se añadió 3H-timidina en el día 6 tras establecer el ensayo y se recogieron 24 h después. Entonces se compararon los niveles de proliferación entre las diferentes condiciones de cultivo.
- 40
- 45 Se calculó la capacidad de cada dilución de compuesto de prueba para inhibir la proliferación en la MLR como inhibición en porcentaje. Esto permitió una estimación de la CI₅₀ (concentración de compuesto de prueba que dio como resultado una reducción del 50% de los recuentos por minuto). Con el fin de calcular la CI₅₀, se transformó el eje X en una escala logarítmica. Se usó regresión no lineal para ajustar a los puntos de datos medios. Se seleccionó una pendiente variable sigmoidea.
- 50
- Análisis de ELISA de la interacción Cyp-NS5A.
- Se usó este ensayo para medir la alteración de complejos Cyp-NS5A, lo que puede usarse para mostrar la potencia de interacción con ciclofilina D. Brevemente, se llevó a cabo la producción y purificación de las proteínas recombinantes GST, GST-CypD y Con1 NS5A-His tal como se describió anteriormente (Chatterji *et al.*, 2010). Se recubrieron placas en tiras de 8 pocillos Nunc MaxiSorb con GST o GST-CypD durante 16 h a 4°C y se bloquearon. Se añadió NS5A-His recombinante (1 ng/ml) a los pocillos en 50 μ l de tampón de unión (Tris 20 mM, pH 7,9, NaCl 0,5 M, glicerol al 10%, DTT 10 mM y NP-40 al 1%) durante 16 h a 4°C. Se detectó posteriormente NS5A-His capturada usando anticuerpos de ratón anti-His (1 μ g/ml) (anti-6xHis, Clontech) y anticuerpos de conejo anti-fosfatasa-peroxidasa del rábano (HRP) de ratón (dilución 1:1000). Todos los experimentos se realizaron dos veces usando dos lotes diferentes de proteínas recombinantes CypD y NS5A.
- 55
- 60
- Análisis anti-PPIasa de la inhibición de ciclofilina
- 65 Se describe una metodología alternativa para analizar la interacción con ciclofilinas tal como sigue: Se determinó la

actividad PPlasa de CypA o D recombinante, producida por la escisión por trombina de GST-CypA o D, siguiendo la tasa de hidrólisis de N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida mediante quimiotripsina. La quimiotripsina sólo hidroliza la forma trans del péptido, y la hidrólisis de la forma cis, cuya concentración se maximiza usando una disolución madre disuelta en trifluoroetanol que contiene LiCl 470 mM, está limitada por la tasa de isomerización cis-trans. Se equilibró CypA o D durante 1 h a 5°C con el artículo de prueba seleccionado usando una concentración de fármaco que oscila entre 0,1 y 20 nM. La reacción comenzó mediante la adición del péptido, y se monitorizó espectrofotométricamente el cambio en la absorbancia a 10 puntos de datos por segundo. Se restaron las tasas de hidrólisis del blanco (en ausencia de CypA o D) de las tasas en presencia de CypA o D. Se analizaron las tasas iniciales de la reacción enzimática mediante análisis de regresión de primer orden de la evolución en el tiempo del cambio en la absorbancia.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Construcción de un mutante de delección de sfaA de Streptomyces sp. A92-308110 (DSM9954)

1.1 Construcción del constructo de delección de sfaA

Se escindió el fragmento de *EcoRV-Stul* de ~7 kb del cósmido TL3006 (SEQ ID NO. 3) que engloba *sfaA* (posición de nucleótido 14396-21362, número de registro de secuencia de NCBI, FJ809786) mediante digestión con *EcoRV* y *Stul* y se ligó el fragmento aislado resultante directamente en pKC1139 que se había digerido previamente con *EcoRV* y se trató con fosfatasa alcalina de gamba (Roche). Este plásmido se denominó pSGK268.

Se realizó una delección en marco del gen *sfaA* contenido dentro de este clon usando el kit de recombinación Red/ET suministrado por Gene Bridges (número de catálogo K006).

(SEQ ID NO. 1) SfaA17161f 5'-

CGCTCTGTGGCGCCTGGTTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATTA
ACCCTCACTAAAGGGCG-3'

(SEQ ID NO. 2) SfaA17825r 5'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCAGAAATTCACCTGCGACGTCCTCCAGATGCATTAATAC
GACTCACTATAGGGCTC-3'

Se usaron dos oligonucleótidos, SfaA17161f y SfaA17825r para amplificar el marcador de neomicina del ADN de molde FRTPGK-gb2-neo-FRT suministrado en el kit usando la ADN polimerasa de KOD. Se aisló el producto amplificado resultante de ~1,7 kb mediante electroforesis en gel y se purificó del gel con resina QiaEX.

Se transformó el plásmido pSGK268 en *E. coli* DH10B usando técnicas convencionales y se seleccionó en placas que contenían apramicina (50 µg/ml). La introducción del constructo de delección se realizó esencialmente siguiendo el protocolo del kit de Gene Bridges. Se hizo crecer una única colonia durante la noche en 2TY-apramicina (50 µg/ml) y se transformó con el plásmido pRedET (tet) y se seleccionó en apramicina (50 µg/ml) y tetraciclina (3 µg/ml) a 30°C. Se usó una única colonia para preparar un cultivo durante la noche de esta cepa en 3 ml de 2TY-apramicina (50 µg/ml) y tetraciclina (3 µg/ml) a 30°C. Se usaron 0,5 ml de este cultivo para inocular 10 ml de 2TY-apramicina (50 µg/ml) y tetraciclina (3 µg/ml) a 30°C y se hicieron crecer hasta una $DO_{600nm} \sim 0,5$. Se transfirieron 1,4 ml de este cultivo a cada uno de 2 tubos Eppendorf y se añadieron 50 µl de arabinosa al 10% a un tubo para inducir la expresión de las proteínas de recombinación Red/ET. Se agitaron los tubos durante ~1 hora a 37°C. Se sedimentaron las células inducidas y no inducidas en una centrifuga de sobremesa y se lavaron dos veces con agua estéril fría, resuspendiendo y centrifugando para sedimentar las células cada vez. Se suspendieron los sedimentos resultantes en aproximadamente 30-40 µl de agua y se mantuvieron en hielo. Se añadió el fragmento de alteración de 1,7 kb aislado previamente a los tubos inducidos y no inducidos y se transfirió a electrocubetas de 1 mm de Biorad en hielo. Se sometieron las muestras a electroporación (micropulsador de Biorad a 1,8 kV, constante de tiempo resultante ~4 ms) y se añadió 1 ml de 2TY (sin antibióticos) y se mezcló para retirar las células de la cubeta. Se incubaron las células durante ~3 horas a 37°C con agitación (1100 rpm, termomezclador compacto Eppendorf) antes de sembrar en placas con 2TY que contenía apramicina 50 µg/ml y kanamicina 25 µg/ml y se incubaron durante la noche a 37°C. Se dispusieron las colonias de las placas de muestra inducidas en franjas sobre placas con 2TY que contenía kanamicina a 50 µg/ml para purificar y confirmar la introducción del casete de resistencia a kanamicina. Se usó PCR en colonias de bacterias individuales para confirmar la introducción del casete. Se prepararon plásmidos a partir de estos cultivos y se digirieron para confirmar el plásmido esperado pSGK270. Entonces se digirieron los plásmidos con *NsiI* para eliminar el fragmento marcador, y se volvió a ligar el resto para producir el constructo de delección en marco de *sfaA* pSGK271.

1.2 Conjugación de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) e introducción de una delección de *sfaA*

Se transformó el plásmido pSGK271 en *E. coli* ET12567 pUZ8002 usando técnicas convencionales y se seleccionó en placas con 2TY que contenía apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (10 µg/ml). Se inoculó la cepa resultante en 3 ml de 2TY líquido que contenía apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (10 µg/ml) y se incubó durante la noche a 37°C, 250 rpm. Se usaron 0,8 ml de este cultivo para inocular 10 ml de 2TY líquido que contenía apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (10 µg/ml) en un tubo Falcon de 50 ml y se incubó a 37°C, 250 rpm, hasta que se alcanzó una $DO_{600nm} \sim 0,5$. Se centrifugó el cultivo resultante a 3500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se lavó dos veces con 10 ml de medios 2TY usando centrifugación para sedimentar las células tras cada lavado. Se resuspendió el sedimento resultante en 0,5 ml de 2TY y se mantuvo en hielo antes de su uso. Se cronometró este procedimiento para que coincidiera con la preparación completa de esporas de *Streptomyces* descrita a continuación.

Se recogieron esporas de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) (Biot-4370) de una placa confluyente de 1-2 semanas resuspendiendo en ~3 ml de glicerol al 20%. Se centrifugaron las esporas (5000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente) y se lavaron dos veces con tampón TES 50 mM antes de resuspender en 1 ml de tampón TES 50 mM y repartir entre 2 tubos Eppendorf. Se sometieron a choque térmico estos tubos a 50°C durante 10 minutos en un baño de agua antes de añadir 0,5 ml de 2TY e incubar en un termomezclador compacto Eppendorf a 37°C durante 4-5 horas.

Se mezclaron las *E. coli* ET12567 pUZ8002 pSGK271 y Biot-4370 preparadas a razones de 1:1 (250 µl de cada cepa) y 1:3 (100 µl de *E. coli*) y se extendieron inmediatamente sobre placas R6 y se transfirieron a un incubador a 37°C. Tras aproximadamente 2 horas de incubación se recubrieron estas placas con 2 ml de agua estéril que contenía ácido nalidíxico para dar una concentración final en placa de 25 µg/l. Se devolvieron las placas al incubador a 37°C durante la noche antes de recubrir con 2 ml de agua estéril que contenía apramicina para dar una concentración final en placa de 20-25 µg/l. Se dispusieron en parches las colonias exconjugantes que aparecieron tras ~4-7 días en medios ISP4 que contenían apramicina (25 µg/L) y ácido nalidíxico (25 µg/L) y se incubaron a 37°C. Una vez que se observó crecimiento micelial adecuado, se volvieron a disponer en parches las colonias en medios ISP4 que contenían apramicina (25 µg/L) a 37°C y se permitió que esporularan. Entonces se subcultivaron las cepas tres veces (para promover la eliminación del plásmido sensible a temperatura) disponiendo en parches en ISP4 (sin antibiótico) e incubando a 37°C durante 3-4 días. Finalmente se dispusieron en parches las cepas en ISP4 y se incubaron a 28°C para permitir la esporulación completa (5-7 días). Se recogieron las esporas y se realizaron diluciones en serie en placas con ISP4 a 28°C para permitir la selección de colonias individuales. Se dispusieron en parches doblemente las colonias individuales esporuladas en placas con ISP4 con o sin apramicina (25 µg/l) para confirmar la pérdida del plásmido y se permitió que crecieran ~7 días antes de someter a prueba la producción de sangliferinas.

1.3 Examen de cepas para la producción de sangliferinas en tubos Falcon

Se usó un único tapón de agar de ~7 mm de una cepa bien esporulada para inocular 7 ml de medios SM25-3 estériles y se incubó a 27°C, 200 rpm, en un agitador con un desplazamiento vertical de 2". Tras 48 horas de crecimiento, se transfirieron 0,7 ml de este cultivo a un tubo Falcon esterilizado que contenía 7 ml de medios SGP2 con resina HP20 al 5%. Se hicieron crecer los cultivos a 24°C, 300 rpm, en un incubador con agitación con desplazamiento vertical de 1 pulgada durante 5 días antes de la recogida. Se retiraron 0,8 ml de cultivo bacteriano y se añadieron alícuotas a un tubo Eppendorf de 2 ml, asegurándose de la dispersión adecuada de la resina por todo el cultivo antes de añadir las alícuotas. Se añadieron 0,8 ml de acetonitrilo y 15 µl de ácido fórmico y se mezcló el tubo durante aproximadamente 30 minutos. Se aclaró la mezcla mediante centrifugación y se retiraron 170 µl del extracto en un vial de HPLC y se analizaron mediante HPLC.

1.4 Análisis de las cepas para determinar la reversión al tipo natural o fenotipo de *sfaA*.

Se analizaron extractos de cepas mediante HPLC. Las cepas que producían sangliferina A y B no se analizaron adicionalmente, ya que habían revertido al tipo natural. Las cepas que carecían de producción de sangliferina A y B mostraron pequeños niveles (~1-2 mg/l) de un pico con un tiempo de retención de 6,5 minutos que presentó la sangliferina como un cromóforo. El análisis mediante CL-EM indicó que este pico tenía una m/z 1073, -16 unidades de la m/z esperada de sangliferina. Se postuló que este pico se debía a la incorporación de fenilalanina en ausencia de meta-hidroxitirosina.

Posteriormente se hicieron crecer de nuevo ocho cepas que mostraron pérdida de producción de sangliferina para evaluar si la posible mutación de *sfaA* podía complementarse químicamente permitiendo un procedimiento mutasintético para obtener sangliferinas novedosas. Se hicieron crecer las cepas en medios de siembra SM25-3 durante 48 horas antes de transferir a los medios de producción SGP2 con resina al 5%. Tras un crecimiento adicional de 24 horas se alimentaron las cepas por triplicado con DL-meta-hidroxitirosina 2 mM (adición de 100 µl de una disolución 0,16 M en HCl 1 M) o L-fenilalanina 2 mM con una cepa no alimentada usada como control. También

se alimentó a las cepas con ácido pipécólico (2 mM) en metanol) para potenciar los rendimientos de producto. Se recogieron las cepas tras un crecimiento adicional de 4 días y se extrajeron y analizaron mediante HPLC. Se mostró que la meta-hidroxitirosina complementaba completamente la mutación de *sfaA* y la adición de L-fenilalanina aumentaba los niveles del compuesto -16 uma. Se eligió la cepa Biot-4585 para estudiar adicionalmente como mutante de delección de *sfaA*.

Ejemplo 2 – Otros métodos para la construcción del constructo de delección de *sfaA*

Pueden usarse otros métodos para generar mutantes de delección de *sfaA*. Los ejemplos incluyen mutantes de inactivación por inserción de *sfaA* (tal como ejemplo 12 del documento WO2010/034243). Esta cepa se generó tal como se describe en el documento WO2010/034243, y se le dio la designación de cepa BIOT-4452.

En un procedimiento alternativo para generar la delección de *sfaA*, se usan dos oligonucleótidos

15209F 5'-CAGAGAATTCGCGGTACGGGGCGGACGACAAGGTGTC-3' (SEQ ID NO. 4) y

17219R 5'-GCGCATGCATGTGCCGGTGCCGGTCCGCGAGCCGCTTGG-3' (SEQ ID NO. 5)

para amplificar una región de homología en el sentido de 5' usando el cósmido TL3006 (SEQ ID NO. 3) como molde y la ADN polimerasa de KOD. Se trata el producto amplificado con la polinucleótido cinasa de T4 (NEB) y se clona en pUC18 que se ha desfosforilado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (Roche). Se comprueba el constructo resultante mediante digestión de restricción y se secuencia completamente para garantizar que se genera la secuencia deseada y que no se han introducido errores durante la amplificación con polimerasa. Se digiere este constructo con *EcoRI* y *NsiI* y se analizan los productos mediante electroforesis en gel. Se escinde la banda que contiene la secuencia deseada (es decir homología en el sentido de 5' de ~2 kb) del gel y se purifica usando procedimientos convencionales (resina QiaEX). Se usa una segunda serie de oligonucleótidos:

17766F 5'-CCTCATGCATCTGGAGGACGTCGCAGGTGAATTCTGGGCG-3' (SEQ ID NO. 6) y

19763R 5'-GGGCAAGCTTCTCTGGCTGAGCTTGAACATCG-3' (SEQ ID NO. 7)

para amplificar una región de homología en el sentido de 3' usando el cósmido TL3006 (SEQ ID NO. 3) como molde y la ADN polimerasa de KOD. Se trata el producto amplificado con la polinucleótido cinasa de T4 (NEB) y se clona en pUC18 que se ha desfosforilado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de gamba (Roche). Se analiza el constructo resultante mediante digestión de restricción y se secuencia completamente para garantizar que se genera la secuencia deseada y que no se han introducido errores durante la amplificación con polimerasa. Se digiere este constructo con *HindIII* y *NsiI* y se analizan los productos mediante electroforesis en gel. Se escinde la banda que contiene la secuencia deseada (es decir homología en el sentido de 3' de ~2 kb) del gel y se purifica usando procedimientos convencionales (resina QiaEX). Se digiere el vector pKC1139 con *EcoRI* y *HindIII* y se aísla el fragmento de vector grande mediante electroforesis en gel y se purifica mediante métodos convencionales (resina QiaEX). Entonces se clonan los fragmentos de homología en el sentido de 5' y de 3' aislados en este fragmento de pKC1139 en una ligación de tres vías para generar el constructo de delección de *sfaA* deseado.

En un procedimiento alternativo adicional para la generación de un constructo de delección de *sfaA* se usa síntesis génica comercial de constructo de delección (es decir Genscript u otro proveedor) para generar un constructo que contiene la secuencia deseada (SEQ ID NO. 8). Se digiere este constructo adquirido usando *BamHI* y *XbaI* para escindir la secuencia de interés y se analizan los productos mediante electroforesis en gel. Se escinde la banda que contiene la secuencia deseada (~4 kb) del gel y se purifica usando procedimientos convencionales. Se digiere el vector pKC1139 con *BamHI* y *XbaI* y se aísla el fragmento grande mediante electroforesis en gel y se purifica mediante métodos convencionales. Entonces se ligan entre sí los dos fragmentos aislados para generar el constructo de delección de *sfaA* deseado.

Estos constructos de delección de *sfaA* alternativos se introducen en *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) mediante conjugación y selección para el cruzamiento secundario usando los métodos descritos en el ejemplo 1.2. El crecimiento y el análisis de las cepas construidas de esta forma también siguen los métodos descritos en el ejemplo 1.2.

Ejemplo 3 – Alimentación en serie de mutante de delección de *sfaA*

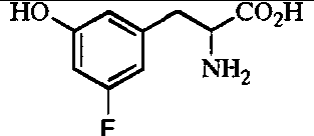
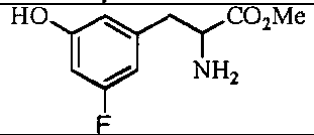
Se prepararon reservas de esporas de un mutante con alteración en *sfaA* (BIOT-4452 o BIOT-4585) tras el crecimiento en medio MAM, ISP4, ISP3 o ISP2, y se conservaron en glicerol al 20% p/v en agua destilada y se almacenaron a -80°C. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) inoculando la reserva de esporas (1% v/v) en 7 ml de medio de siembra (medio SM25) en tubos de centrifuga de 50 ml con tapones de espuma. Se incubaron los tubos de cultivo a 27°C, 250 rpm (desplazamiento vertical de 5 cm) durante 48 h. A partir del cultivo de siembra se transfirió un 10% (v/v) a 7 ml de medio de producción SGP-2 en tubos de centrifuga de 50 ml con tapones de espuma. Se llevó a cabo el cultivo a 24°C y 300 rpm (desplazamiento vertical de 2,5 cm). Para la

producción de análogos mutasintéticos de sangliferina, se añadieron 0,05 ml de una disolución 0,32 M (en HCl 1 N) del compuesto alimentado (mutasintón) a cada tubo a las 24 horas tras la inoculación para dar una concentración final de 2 mM. Adicionalmente, se añadieron 0,05 ml de una disolución 0,32 M de ácido piperázico (en metanol) a cada tubo a las 24 horas para dar una concentración final de 2 mM. Se continuó con el cultivo durante cuatro días adicionales tras la alimentación.

Se extrajeron muestras transfiriendo 0,8 ml del caldo completo a un tubo Eppendorf tapado de 2 ml. Se añadieron 0,8 ml de acetonitrilo, junto con 0,015 ml de ácido fórmico. Entonces se agitó la mezcla durante 30 minutos en un dispositivo Vibrax. Entonces se centrifugó el tubo a 13000 rpm durante 10 minutos y se retiraron 0,15 ml del sobrenadante para su análisis. Se analizaron los extractos tal como se describe en los Métodos generales.

La tabla 1 muestra los mutasintones que se alimentaron de esta forma, junto con los aductos de H⁺ y Na⁺ mediante CL-EM, la masa molecular prevista y el tiempo de retención de los productos mutasintéticos de sangliferina observados. Se muestran los picos principales, relacionados con los análogos de sangliferina A. En todos los casos, también se observaron los picos de CL-EM para los análogos de sangliferina B (Masa - 18).

Tabla 1

mutasintón alimentado	nombre del mutasintón	[M-H] ⁻ observada (m/z)	[M+Na] ⁺ observada (m/z)	masa molecular (uma)	tiempo de retención (minutos)
	ácido 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoico	1106,4	1130,4	1107,4	5,7
	2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propionato de metilo	1106,4	1130,4	1107,4	5,7

20 *Ejemplo 4 – Aislamiento de 63-fluoro-sangliferina A, compuesto intermedio 14*

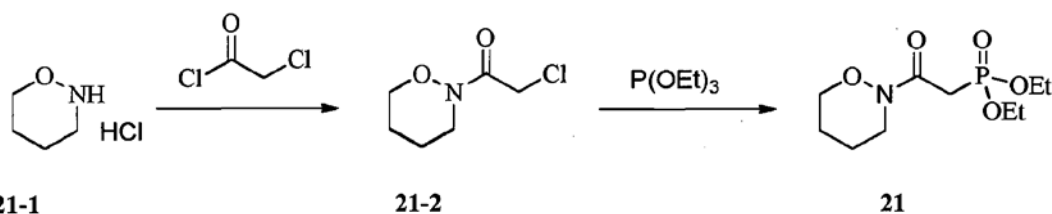
Se llevó a cabo la fermentación tal como se describió en los Métodos generales utilizando 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo y ácido DL-piperázico como precursores, añadiéndose ambos a las 26 horas.

25 Tras la recogida, se reunieron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien permitiendo que se sedimentara por gravedad.

30 Entonces se realizó una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Esto se extrajo dos veces con acetato de etilo y los extractos orgánicos combinados se llevaron hasta la sequedad a presión reducida para dar el producto en bruto final (1,3 g).

35 Se disolvió extracto en bruto (1,3 g) en acetato de etilo (2 ml) y se cargó en una columna de gel de sílice (10 x 2 cm) acondicionada con acetato de etilo (500 ml). Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con incrementos graduales en acetona (10%, 20%, 30%, etc., en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta la sequedad. Se disolvió este material (278 mg) en metanol (1,8 ml) y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Xterra MSC18 de Waters (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A fue agua y el disolvente B fue acetonitrilo. Se ejecutó la columna isocráticamente al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se identificaron las fracciones puras mediante HPCL-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta la sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (20 mg).

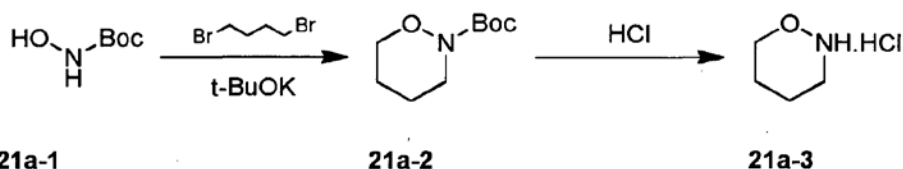
45 *Ejemplo 5 – Síntesis de (2-(1,2-oxazinan-2-il)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo*



5 A una disolución de 21-1 (ChemCollect, Alemania) (100 mg, 0,81 mmol), Et₃N (246 mg, 2,43 mmol) en DCM seco (5 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloracetilo (138 mg, 1,22 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se vertió en agua helada y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, se concentró a vacío. Se usó el residuo (21-2) para la siguiente etapa sin purificación adicional. (123 mg, rendimiento del 90%).

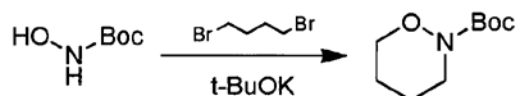
10 Se agitó una mezcla de 21-2 (123 mg, 0,75 mmol) y fosfito de trietilo (250 mg, 1,50 mmol) a 140°C durante 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para producir 21.

Síntesis alternativa de (2-(1,2-oxazinan-2-il)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo, 21



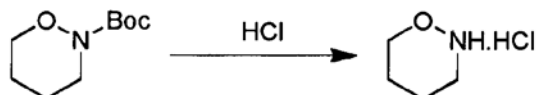
15

Procedimiento general para la preparación de 21a-2



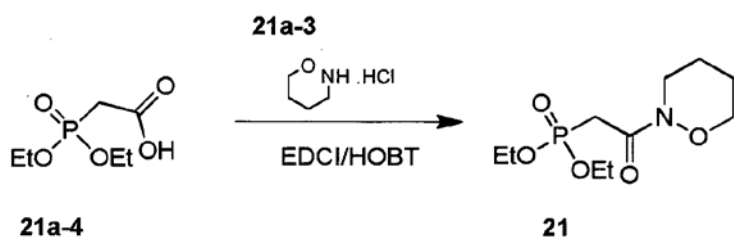
20 A una disolución de t-BuOK (84,0 g, 0,75 mol) en tetrahidrofurano (2,0 l) se le añadió 21a-1 (50,0 g, 0,38 mol) en porciones a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Se añadió 1,4-dibromobutano (81,2 g, 0,38 mol) gota a gota a temperatura ambiente. Entonces se agitó la mezcla a 80°C durante 16 h. Tras enfriar, se añadió agua (2000 ml), se extrajo la mezcla con acetato de etilo (2 x 1000 ml). Se secó la fase orgánica combinada sobre Na₂SO₄ anhidro durante 16 h, tras filtración y concentración, se purificó el residuo mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluyente: éter de petróleo:acetato de etilo = de 100:1 a 10:1) para dar 21a-2 (57 g) como un aceite incoloro.

30 *Procedimiento general para la preparación de 21a-3*



35 A una disolución de 21a-2 (55 g, 0,29 mol) en terc-butil metil éter, TBME (80 ml) se le añadió una disolución de HCl 4 N (600 ml, en TBME) a temperatura ambiente, se agitó la mezcla durante 3 h a temperatura ambiente. Se filtró el sólido precipitado y se lavó con TBME (50 ml) para dar 21a-3 (30 g) como un sólido blanco.

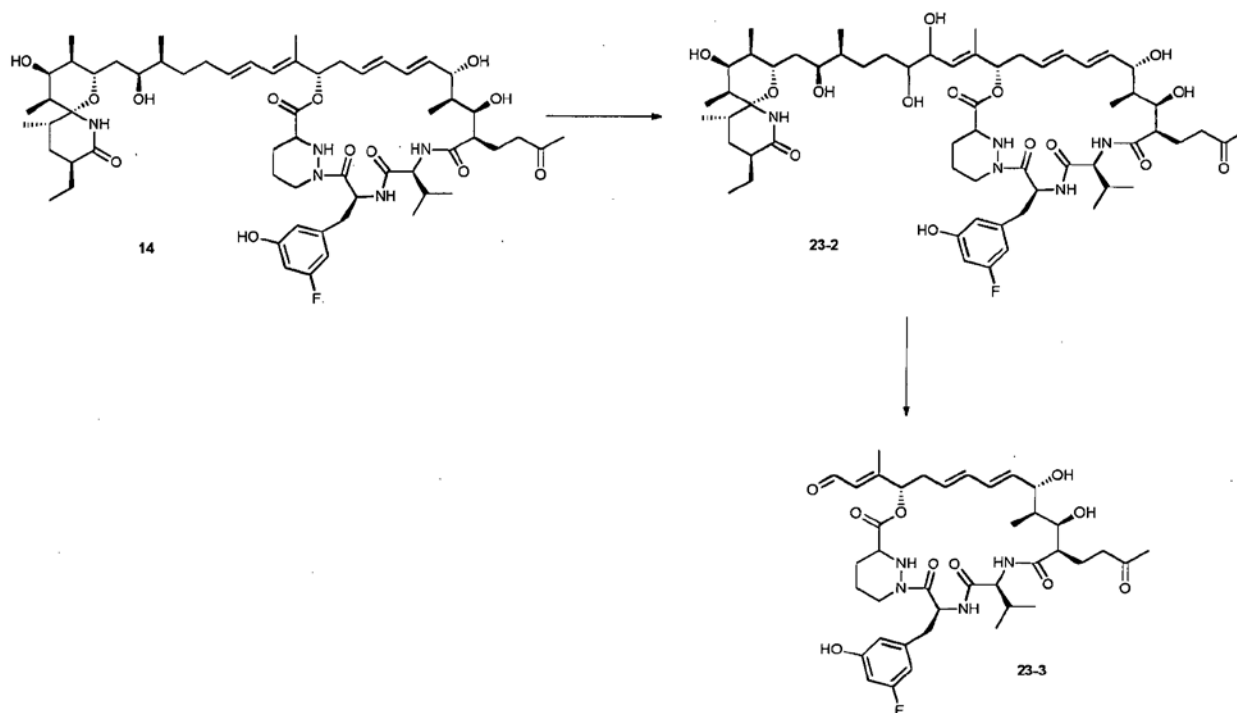
Procedimiento general para la preparación de 21



5 A una disolución agitada de 21a-4 (35 g, 0,18 mol), hidroxibenzotriazol (HOBT) (29 g, 0,21 mol) y Et₃N (71 ml, 0,51 mol) en diclorometano anhidro (550 ml) se le añadió 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI) (41 g, 0,21 mol) en porciones a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a 0°C durante 0,5 h, entonces se añadió 21a-3 (24 g, 0,20 mol) a 0°C y se agitó durante 16 h. Entonces la CCF (éter de petróleo/acetato de etilo: 3/1) mostró que la reacción estaba completa. En ese momento, se vertió lentamente la mezcla de reacción en agua (500 ml) con agitación vigorosa.

10 Se extrajo la mezcla con diclorometano (2x200 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera (2x100 ml), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró para proporcionar el producto en bruto. La cromatografía (éter de petróleo/acetato de etilo, de 100:1 a 10:1) dio 21 (38 g) como un aceite amarillo.

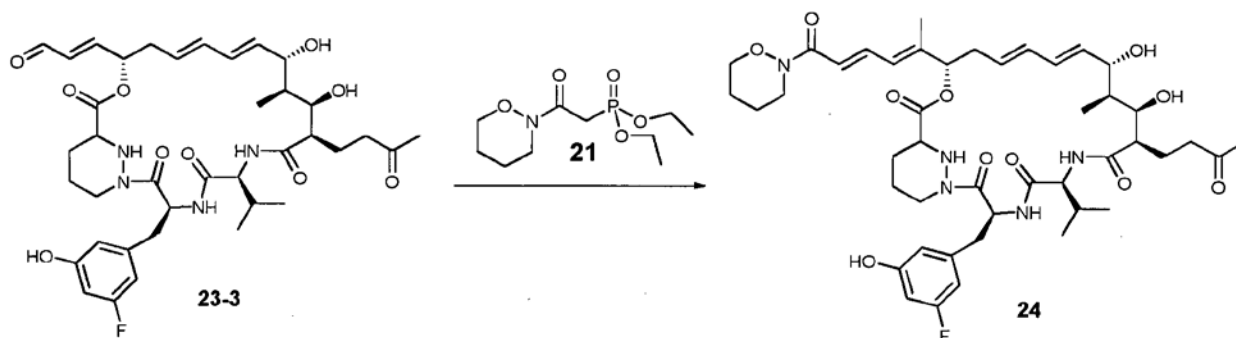
15 *Ejemplo 6 - preparación del compuesto intermedio 23-3*



20 A una disolución agitada de 14 (430 mg, 0,38 mmol), (DHQ)₂PHAL (18,6 mg, 0,024 mmol), tetraóxido de osmio (0,156 ml, 0,012 mmol) en alcohol terc-butílico (2,5% en peso, 0,079 mmol/ml) y metanosulfonamida (74 mg, 0,77 mmol) en 20 ml de alcohol terc-butílico se le añadió a temperatura ambiente una disolución de ferricianuro de potasio (382 mg, 1,16 mmol) y carbonato de potasio (160 mg, 1,16 mmol) en 20 ml de agua, dando como resultado una emulsión marrón. Tras 2 h, se añadió una disolución de sulfito de sodio, y se continuó con la agitación durante 20 min. Se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para producir 23-2 como un sólido blanco.

30 A una disolución agitada de 23-2 (240 mg, 0,21 mmol) en 24 ml de una mezcla 2:1 de THF y agua se le añadió peryodato de sodio (91 mg, 0,42 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h, y entonces se añadió bicarbonato de sodio saturado acuoso. Se extrajo esta mezcla con tres porciones de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con una porción de agua y dos porciones de salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para producir 23-3.

Ejemplo 7 - preparación del compuesto 24



5 A una disolución de 21 (42 mg, 0,168 mmol) en THF (2,0 ml) se le añadió NaH (1,2 mg, 0,05 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 23-3 (30 mg, 0,042 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 24 como un sólido blanco amorfo.

10

Ejemplo 8 - preparación del compuesto 24 en forma cristalina sólida (forma I)

15 Se suspendieron 10 mg de compuesto 24 amorfo en metil isobutil cetona (MIBK) (500 μ l, 50 volúmenes) y luego se realizaron ciclos de temperatura entre temperatura ambiente y 40°C cada 4 horas durante un total de 5 días. Se aisló el sólido resultante eliminando por decantación el disolvente en exceso seguido por secado a vacío para producir el compuesto 24 en forma cristalina sólida (forma I). El patrón de XRPD de la forma I del compuesto 24 se ilustra en la figura 2 y los picos y sus intensidades relativas se enumeran en la tabla 2 a continuación. El método de obtención de los datos de XRPD se describe en los Métodos generales.

20 Tabla 2

N.º de pico	Posición [°2 Theta]	Intensidad relativa [%]
1	6,2097	6,86
2	6,5031	7,76
3	8,2581	27,43
4	8,4838	33,64
5	9,5994	23,88
6	10,0981	8,54
7	11,0546	29,76
8	12,5883	14,81
9	13,1703	7,1
10	13,9184	100
11	14,2891	13,04
12	14,9759	10,37
13	15,3159	5,81
14	16,8844	18,15
15	17,1816	9,72
16	17,7384	53,03
17	18,1703	9,02
18	18,5613	32,19
19	19,0241	52,81
20	19,4201	5,08
21	20,0954	13,7
22	20,449	63,25
23	20,8962	43,44
24	21,1871	15,02
25	21,6388	16,08
26	23,0029	50,8
27	23,2869	17,19
28	23,6883	17,16
29	24,1071	13,7
30	24,2587	19,55

31	24,9948	13,34
32	25,209	26,16
33	25,9577	10,06
34	26,4298	9,38
35	27,3687	11,1
36	29,0171	7,95
37	29,5603	5,14
38	30,0609	7,35
39	30,5824	6,5
40	32,1814	4,39
41	32,6521	6,74
42	33,5957	6,6
43	34,7946	9,04

Ejemplo 9 – Datos biológicos – replicón de VHC y análisis

- 5 Se analizaron los compuestos en el ensayo de replicón de genotipo 1b usando células Huh5.2 tal como se describe en los Métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, DEBIO-025, 2, sangliferina A, 5, y el hidroximacrociclo, 6 como comparación.

Compuesto	CE50 (μM)	CC50 (μM)	Índice de selectividad (CC50/CE50)
Ciclosporina A, 1	0,62	28	52
DEBIO-025, 2	0,096	11,2	111
Sangliferina A, 5	0,318	9,1	28,7
Hidroximacrociclo, 6	8,4	83,6	9,9
24	0,033	>100	>3030

- 10 Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 24 es significativamente más potente en el ensayo de replicón Huh5.2 (tal como se muestra por la baja CE₅₀), con una selectividad significativamente mejor frente a la línea celular (tal como se muestra mediante un alto índice de selectividad) en comparación con CsA, Debio-025, SfA y el hidroximacrociclo.

Ejemplo 10 – Datos biológicos - actividad contra VIH

- 15 Se analizaron los compuestos en un ensayo antiviral contra VIH usando células HeLa tal como se describe en los Métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, DEBIO-025, 2 y los antivirales contra VIH emtricitabina y tenofovir como comparación.

Compuesto	Células HeLa CE ₅₀ (μM)
Ciclosporina A, 1	5,3
DEBIO-025, 2	1,5
Emtricitabina	0,4
Tenofovir	1,05
24	0,13

- 20 Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 24, es significativamente más potente que CsA, DEBIO-025, emtricitabina y tenofovir en la inhibición de la infección por VIH en este ensayo.

Ejemplo 11 – Datos biológicos – PK oral e i.v. in vivo en ratón

- 25 Para evaluar la farmacocinética de los compuestos en un entorno *in vivo*, se administraron los compuestos por v.o. a 10 ó 5 mg/kg y por vía i.v. a 1 mg/kg a grupos de ratones CD1. Se llevaron a cabo análisis farmacocinéticos tal como se describe en los Métodos generales. Los parámetros PK se muestran a continuación.

Compuesto	Nivel de dosis (mg/kg)	Aclaramiento (l/h/kg)	AUC _{final} por v.o. (ng*h/ml)
Sangliferina A, 5	10	0,054	2332
24	5	0,017	8223

- 30 Tal como puede observarse, los compuestos 24 tienen aclaramiento reducido y exposición oral aumentada (tal como se muestra mediante una alta AUC_{final} por v.o.), en comparación con sangliferina A.

Ejemplo 12 – Datos biológicos - inhibición de actividad PPIasa de CypA

Para evaluar la inhibición directa de la peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPIasa) de CypA, se usó un método tal como se describe en los Métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, DEBIO-025, 2 y sangliferina A, 5 como

5

Compuesto	PPIasa de CypA CI ₅₀ (nM)
Ciclosporina A, 1	9,7
DEBIO-025, 2	0,8
Sangliferina A, 5	2,4
24	0,31

Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 24, inhibe la actividad PPIasa de CypA de manera más potente que sangliferina A, DEBIO-025 y ciclosporina A.

10

Ejemplo 13 – Datos biológicos - inhibición de transportadores de bilirrubina

Para evaluar el potencial de inhibición inespecífica de los transportadores de bilirrubina, que se piensa que es el motivo de la hiperbilirrubinemia limitante de la dosis observada con DEBIO-025, se llevó a cabo un análisis *in vitro* de inhibición de transportador tal como se describe en los Métodos generales.

15

Compuesto	OATP1B1 CI ₅₀ (μM)	OATP1B3 CI ₅₀ (μM)	MRP2 CI ₅₀ (μM)	MRP3 CI ₅₀ (μM)
Ciclosporina A, 1	0,85	0,13	4,1	3,1
DEBIO-025, 2	0,45	0,19	16,0	>50
24	4,3	1,8	>50	>50

Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 24, muestra mucho menos inhibición de transportadores de bilirrubina conjugados y no conjugados en comparación con DEBIO-025 y ciclosporina A.

20

Ejemplo 14 – Datos biológicos - inhibición de transportadores xenobióticos

Para evaluar el potencial de las interacciones fármaco-fármaco (DDI) a través de la inhibición de transportadores xenobióticos, se llevó a cabo un análisis *in vitro* de la inhibición de glicoproteína P (Pgp/MDR1) y bomba de exportación de sales biliares (BSEP) tal como se describe en los Métodos generales.

25

Compuesto	Pgp CI ₅₀ (μM)	BSEP CI ₅₀ (μM)
Ciclosporina A, 1	0,73	0,46
DEBIO-025, 2	0,72	0,18
24	>50	12,3

Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 24, muestra mucho menos inhibición de transportadores xenobióticos, implicados potencialmente en las interacciones fármaco-fármaco, en comparación con DEBIO-025 y ciclosporina A.

30

Bibliografía

Appel, N., T. Schaller, *et al.* (2006). "From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication." *J Biol Chem* 281(15): 9833-6.

35

Banteli, R., J. Wagner, *et al.* (2001). "Synthesis of derivatives of the novel cyclophilin-binding immunosuppressant sangliferin A with reduced numbers of polar functions." *Bioorg Med Chem Lett* 11(12): 1609-12.

40

Chatterji, U., M. Bobardt, *et al.* (2009). "The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication." *J Biol Chem*.

Colgan, J., M. Asmal, *et al.* (2000). "Isolation, characterization and targeted disruption of mouse ppia: cyclophilin A is not essential for mammalian cell viability." *Genomics* 68(2): 167-78.

45

Crabbe, R., G. Vuagniaux, *et al.* (2009). "An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C." *Expert Opin Investig Drugs* 18(2): 211-20.

- Dolinski, K., S. Muir, *et al.* (1997). "All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13093-8.
- 5 E. Lawitz, R. R., T. Nguyen, M. Huang, J. Ke, J. Praestgaard, D. Serra, M. Koziel, T. Evans (2009). "Safety And Antiviral Efficacy Of 14 Days Of The Cyclophilin Inhibitor Nim811 In Combination With Pegylated Interferon .2a In Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S379.
- 10 Egorin, M. J., T. F. Lagattuta, *et al.* (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): 7-19.
- 15 Fehr, T., J. Kallen, *et al.* (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties." *J Antibiot (Tokio)* 52(5): 474-9.
- 20 Flisiak, R., A. Horban, *et al.* (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus." *Hepatology* 47(3): 817-26.
- Furniss, B. S., Furniss, A.I., Vogel, A.I., Ed. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall.
- 25 Gaither, L. A., Borawski, J., Anderson, L. J., Balabanis, K. A. *et al.*, (2010). "Multiple cyclophilins involved in different cellular pathways mediate HCV replication" *Virology* 397: 43-55
- 30 Glavinas, H., Krajcsi, P., Cserepes, J., Sarkadi, B. (2004). "The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity." *Curr. Drug. Deliv.* 1(1): 27-42.
- Gomez, L., H. Thibault, *et al.* (2007). "Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1654-61.
- 35 Goto, K., Watashi, K., Inoue, D., Hijikata, M., Shimotohno, K. (2009) "Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor" *Cancer Science* 100(10): 1943-1950.
- Hanoulle, X., Badillo A, Wieruszkeski JM, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G (2009). "Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase activity of Cyclophilins A and B." *J Biol Chem*.
- 40 Hartel, C., P. Iblher, *et al.* (2006). "Immunosuppressive activity of the immunophilin-binding drug Sanglifehrin A in human whole blood: potent inhibition of interleukin-6 produced by lymphocytes and monocytes." *Scand J Immunol* 63(1): 26-34.
- Herrler, M., H. Bang, *et al.* (1994). "Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." *Mol Microbiol* 11(6): 1073-83.
- 45 Hite, M., Turner, S., Federici, C. (2003). "Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs". *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer*. Summer 2003 issue.
- 50 Immecke, S.N., Baal., N, *et al.* (2011). "The Cyclophilin-Binding Agent Sanglifehrin A Is a Dendritic Cell Chemokine and Migration Inhibitor." *PLOS one* 6(3):e18406
- Inoue, K., K. Sekiyama, *et al.* (2003). "Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial." *J Gastroenterol* 38(6): 567-72.
- 55 Inoue, K., T. Umehara, *et al.* (2007). "Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice in vivo." *Hepatology* 45(4): 921-8.
- Ishii, N., K. Watashi, *et al.* (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication." *J Virol* 80(9): 4510-20.
- 60 Ke, J., E. L., R. Rozier, T. Marbury, N. Nguyen, D. Serra, K. Dole, J. Praestgaard, M. Huang, T. Evans (2009). "Safety, And Tolerability Of Nim811, A Novel Cyclophilin Inhibitor For Hcv, Following Single And Multiple Ascending Doses In Healthy Volunteers And Hcv-Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S229.
- 65 Jacobson, I., McHutchison, JG, Sulkowski, M. (2007). *Gastroenterol & Hepatol* 3(S34): 1-10.

- Kallen, J., R. Sedrani, *et al.* (2005). "Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution." *J Biol Chem* 280(23): 21965-71.
- 5 Kawasaki, H., E. S. Mocarski, *et al.* (2007). "Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus infection via a cyclophilin-dependent pathway specifically in neural stem/progenitor cells." *J Virol* 81(17): 9013-23.
- Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz and M. F. Fromm (2010), *Drug Metab Dispos*, 39, 1097-1102.
- 10 Manns, M. P., G. R. Foster, *et al.* (2007). "The way forward in HCV treatment--finding the right path." *Nat Rev Drug Discov* 6(12): 991-1000.
- Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbach, *et al.* (1999). "Macrolide Analogues of the Novel Immunosuppressant Sanglifehrin: New Application of the Ring-Closing Metathesis Reaction." *Angew Chem Int Ed Engl* 38(16): 2443-2446.
- 15 Mathy, J. E., S. Ma, *et al.* (2008). "Combinations of cyclophilin inhibitor NIM811 with hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B polymerase inhibitors enhance antiviral activity and suppress the emergence of resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 52(9): 3267-75.
- 20 Melnikova, I. (2008). "Hepatitis C therapies." *Nature Rev Drug Disc* 7: 799-800.
- Metternich, R., Denni, D., Thai, B, Sedrani, R. (1999). "Toward a Total Synthesis of the Immunosuppressant Sanglifehrin A. Preparation of Two Relay Compounds by Degradation and Their Use in the Reassembly of the Natural Product." *J. Org. Chem.* 64: 9632-9639.
- 25 Millay, D. P., M. A. Sargent, *et al.* (2008). "Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy." *Nat Med* 14(4): 442-7.
- Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D., and P. Groscurin, Porchet, H., Crabbe, R. (2009). "Efficacy And Safety Of The Cyclophilin Inhibitor Debio 025 In Combination With Pegylated Interferon Alpha-2a And Ribavirin In Previously Null-Responder Genotype 1 Hcv Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S40.
- 30 Niwa, T., Yamamoto, S, Saito, M, Shiraga, T, Takagi, A. (2007). "Effect of Cyclosporine and Tacrolimus on Cytochrome P450 Activities in Human Liver Microsomes." *Yakugaku Zasshi* 127(1): 209--216.
- 35 Paeshuyse, J., A. Kaul, *et al.* (2006). "The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication in vitro." *Hepatology* 43(4): 761-70.
- 40 Parfieniuk, A., J. Jaroszewicz, *et al.* (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." *World J Gastroenterol* 13(43): 5673-81.
- Pawlotsky, J. M. (2000). "Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy." *Hepatology* 32(5): 889-96.
- 45 Pawlotsky, J. M. (2005). "Current and future concepts in hepatitis C therapy." *Semin Liver Dis* 25(1): 72-83.
- Pawlotsky, J. M. (2006). "Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets." *J Hepatol* 44(1 Supl): S10-3.
- Pemberton, T. J. and J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A." *FEBS Lett* 555(2): 335-40.
- 50 Pockros, P. (2008). "Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus." *Gastroenterol and Hepatology* 4(10): 729-734.
- 55 Ptak, R. G., P. A. Gallay, *et al.* (2008). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent." *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1302-17.
- Qu, X., Jiang, N. *et al.*, (2011). "Cloning, sequencing and characterization of the biosynthetic gene cluster of sanglifehrin A, a potent cyclophilin inhibitor." *Mol. Biosyst.* 7:852-861.
- 60 Robida, J. M., H. B. Nelson, *et al.* (2007). "Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro." *J Virol* 81(11): 5829-40.
- Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y. and Ribeill (2009). "Safety, plasma pharmacokinetics, and anti-viral activity of SCY-635 in adult patients with chronic hepatitis C virus infection." *Journal of Hepatology* 50(S1): S36.
- 65

- 5 Sanglier, J. J., V. Quesniaux, *et al.* (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity." *J Antibiot* (Tokio) 52(5): 466-73.
- Schneider, M. D. (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." *Sci STKE* 2005(287): pe26.
- 10 Sedrani, R., J. Kallen, *et al.* (2003). "Sanglifehrin-cyclophilin interaction: degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data." *J Am Chem Soc* 125(13): 3849-59.
- Seden, K. D. Back and S. Khoo (2010), *J Antimicrob Chemother*, 65, 1079-1085.
- Smith, M. B. a. M., J. , Ed. (2001). *March's advanced organic chemistry*, John Wiley and Sons Inc., UK.
- 15 Steinschulte, C., T. Taner, *et al.* (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." *J Immunol* 171(2): 542-6.
- Strader, D. B., T. Wright, *et al.* (2004). "Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C." *Hepatology* 39(4): 1147-71.
- 20 Tropschug, M., I. B. Barthelmess, *et al.* (1989). "Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* 342(6252): 953-5.
- Vrolijk, J. M., A. Kaul, *et al.* (2003). "A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C." *J Virol Methods* 110(2): 201-9.
- 25 Wring, S., C. Wille, C. Rewerts, R. Randolph, A. Scribner and S. Hopkins (2010), *Journal of Hepatology*, 52, S263
- Yang, F., J. M. Robotham, *et al.* (2008). "Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro." *J Virol* 82(11): 5269-78.
- 30 Zenke, G., U. Strittmatter, *et al.* (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." *J Immunol* 166(12): 7165-71.
- 35 Zeuzem, S. and E. Herrmann (2002). "Dynamics of hepatitis C virus infection." *Ann Hepatol* 1(2): 56-63.
- Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." *J Immunol* 166(9): 5611-8
- 40 Todas las referencias incluyendo patentes y solicitudes de patente citadas en esta solicitud se incorporan en el presente documento como referencia en el grado más amplio posible.

45 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de número enteros establecido pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de número enteros o etapas.

Lista de secuencias

- 50 <110> Biotica Technology Limited
Moss, Steven James
Gregory, Matthew Alan
Wilkinson, Barrie
- 55 <120> COMPUESTO NOVEDOSO Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN
- <130> BOA-P1257PCT
- 60 <150> Documento GB1105293.3
<151> 29-03-2011
- <150> Documento GB1113629.8
<151> 08-08-2011
- 65 <150> Documento GB1202060.8
<151> 07-02-2012

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.3

5 <210> 1
<211> 77
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

15 <400> 1
cgctctgtgg cgcctggtt ccaagcggct cgcggaccgg caccggcaca tgcataatta 60
accctcacta aagggcg 77

20 <210> 2
<211> 78
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

<400> 2
tggatgtatc gtcgcaggac gcccagaatt cacctgcgac gtcctccaga tgcattaata 60
cgactcacta tagggctc 78

30 <210> 3
<211> 46596
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cósmido

<400> 3
40 **acaccggcca caccggcggc ggccctgctg tgcccgatgt tggacttcac cgaaccgagc 60**

ES 2 533 437 T3

cacagcggct cgtcccgtc ctgcccgtag gtggcgagca ggcctgcgc ctcgatcggg 120
tcgccagcc gcgtgccgt accgtgcgc tccaccgct ccacgtccgc gggcgtgagc 180
ccggcaccgg agagcgcctg acggatcacc cgctgctgcg aaggaccgtt cggggccgtc 240
agaccgttcg acgcgccgtc ctggttgatc gcggtgccgc gtacgacggc cagtacctgg 300
tggccgtggc ggcgggcgtc ggagagccgt tccacgagga gcatgccggc gccctcggac 360
cagccgggtgc cgtcggccgc ggcggcgaag gacttgacgc ggcctccac ggccaggccg 420
cgctggcggg agaagtcgac gaagacgtcg ggggcggaca tgacggtgac accgccggcc 480
agcggccatcg agcactgcc gctgcgcagc gcctggatcg cccagtgcag ggcgaccagc 540
gacgccgagc acgcggtgtc cacggtgacc gcagggcctt ccaggccgag gacgtaggcg 600
atgcggcccg acagcacgct ggcggagttg ccgatgccga cgtagccctc cgcgctctcg 660
acggtcctgc gcacgagctg ggcatagtcc tggccgttgg tgccgaggta gacgccgacg 720
tccgcgccgc gcagggactt cgggtcgatg ccggcgcgtt cgacggcctc ccaggcggtc 780
tccagggccca gccgctgctg cgggtccatc gccagcgcct cgcgcggcga gatcccgaag 840
aagtccgcgt cgaaccggc gacgtccgcg aggaagccgc cctcccgcac gtacgacgtg 900
cccgcgtgct ccggatccgg gtggaagagg cccgcgaggt ccagccccg gtcgtcgggg 960
aacggggtga gcgcgtcgcg ctcgtcggcg agcagccgcc acaggtcctc gggcgaggtc 1020
acgccgccgg ggtaccggca cgccatgccg acgatcgcga tgggatcgtc gtcggcgggg 1080
cgggcgacgg cgggcaccgg cgccgtctcc tgggcgcgtt cgccgaggag ttcggccagc 1140
aggtggccgg ccagggagcg cgggtgggg tggtcgaaca cgagggtcgc gggcaggcgc 1200
agccccgtgg cggcggacag ccggttgccg agttcgacgg cggtcagcga gtcgaagccc 1260
agttccttga acgcccggc gggggtcacg gcggtgtcgt cgggtgtggc gaggaccacg 1320
gcggcgtgcg agcggacgag cgtgagcagg gtccgttcgc gttccgcggc ggtgagtcgg 1380
gtgagctttc cggccagggt gtccgggtccg gcgcccgcgg tggcggcgcg ccggacgggg 1440
ccacggacca gccggcgcac cagcgcgggt acggcgggtga cgccgggtggc gaacgagggtg 1500
aggtccagcc aggcggggac gacgacgggg gcggagccgg cgggtggcgcg gtcgaacagg 1560
gcgagcgcgt cgggcgtcgg cagcggcacc acgcccgtcgc gggccgcgcg ccgcaggtcg 1620
gcgcccacca ggtggccggc catgccgctg gcgtgcgcc acaggcccca cacctgggag 1680
gtggcgggca ggccctgggc gcggcgggtg gccgcgagcg cgtccacgaa ggcggtgccc 1740
gccgcgtagt tgccctgtcc gggcgcgccg aagaggccgg aggtggagga gaacagcacg 1800
aagacggccg gccgggtgcg ggcggtgagt tcgtgcaggt tccaggcggc gtcgaccttg 1860
gggcggagca ccttggcgag ccgctcgggg gtctgggagg cgatgacgcc gtcgtccagg 1920
acgccggcgg cgtggacgac tccggtcagg ggggtgctcg cggtgatccg gtcgagcagg 1980

ES 2 533 437 T3

gcggccagtt cgggtgcggtc ggcggcgctcg caggcggcga cggtcacctc ggcgccgagg 2040
 gcgcgcagtt cgccggcgag ggtcacggcg tcgggggccc cgtcgcccg cgtccggcc 2100
 aggaccagcc ggcgtacgcc gtgctcgggtg accaggtggc gggcgcagag ggcgccgagc 2160
 gtgccgggtgc cgccgggtgac gaggacgacg cgtcgggacg gccacagggc cgcctggctc 2220
 gtgggctcgt cgggtgcgcg ggcgcggacc agccgggggtg cgaggaccgg gccggagcgc 2280
 acggcgatct cgggttcgcc ggtggcgagg acagcgggca gctggtgcag tgcgtcgggg 2340
 ccgtcgatgt cgaccagcac cagcctgccg ggggtgttcgg cgcgggcgga gcggatcagg 2400
 cccacacgg gcgcgtgggc gaggtcgggtg acgtcctcgt gctcgaccgg gaccgcgccg 2460
 tgggtgagga cggccagacg ggtgccggcc agtcgctcgt cggcgagcca ctctgaaga 2520
 gcggtcagca cgcgccgggc gccggcgtgg gccgcgccgg cgggtgtcgtc ggccgactgc 2580
 tgccgacacg gcagcacgag ggtgccgggc acggtgtcca gggcggcgac ggcggcgagg 2640
 tcggggcagg aggggtatcc gggcagcggga aggccgccga gcacggcgat gccgtcgacg 2700
 tcggccgcgg gcagcggcac gggcgtccac tcgaccgggt acagctcgtg gtcgcggccg 2760
 gggccggccc tggccggcgg gcgcagggtc accgcgtcga cgggtgagcac ggcggctccg 2820
 ctgtcgtcgg tggcgtgcag ggtgaccgtg tgctcggccc cgggggtgcag gcgtaccgc 2880
 agccgggtgg cgcccacggc gtgcagggtg acgccgtgcc aggcgcgggg gaccaggccg 2940
 ggggtgtacgg ccgcgagggc gtcgggtgagc agggcgggggt gtacgccccca gccgccggcg 3000
 gtctcgtcgg tcagctcaac ggtcacgtcg gtcagctcga cggtcacgtc ggtgtccggg 3060
 tcccctggcg cggcggccgg ggcggtgccg gtgtgcggga ggaggacgcc ggtcgcgtgc 3120
 cgggtccagg gctggtcgtc gtcggcgtcg gcggggcggg agtggacggc gaccgggccc 3180
 gcgccgtcct cgttctccgc gcccagggtg acctggaggc ggcgggcttc gccgacggtg 3240
 tcgagcgggtg cctcctcgggt cagttcggccg agcgtcctgc cgtcggccgc gtgcagggcc 3300
 aggtcgagta cggcgcgggc cggcagctcg gtgccggccc gcacgcgccc ggtgaacacc 3360
 tgtccgccgg atccggcgag cggggtgacg gcgccgagca gcgggtgcc gccgccggtc 3420
 aggccaggc cggcggcgtc ggaggcgacc gggccgctgg gccagaagcg gcggcgctgg 3480
 aaggcgtagg tgggcaggtc gacgtggcgt ccgtcggggc agcccaccgt ccagtcgacg 3540
 gacacgccgt ggacggcggc ctcggcgagc gaggtgagga ggcggcggcg gccgtcctcg 3600
 tcgcggcgga ggggtccgac gacgacggcg gtccgctcgg tggcctccgc cgtctcctgc 3660
 acggcggccc tcagcaccgg gtgcgggctg atctccacga acacggcgtg gccggagtcg 3720
 agcaggccgc gcaccacggg ctogaaccgt acgggctccc gcaggttcg gtaccagtag 3780
 ccggcgtcga gccgtgtctc gccgaggggg ccgccagca ggggtgagtg gaaggcgatg 3840

ES 2 533 437 T3

ccggcctcac cgggccgcag ttcggcgagc gggcgcgca actcggcttc gagggactcg 3900
 acatgggccc agtgggaggc gtagtcgacc gcgatgcggc gcagtcgtac cccgtcggcc 3960
 gaccaggcgg ccatcacctc gtccagcgca tcgggggtcg cgctgaggac caccgacgac 4020
 gggccgttga gggcggcgac gcaaacgcgt ccggaccacg gtgcgagccg ccgtgtgacg 4080
 gtggcctcgg gcagggcgac ggagaccatg ccgccgcgcc cggccagccg ctccggcgatg 4140
 agccgcgacc gcagggcgac gatccgggcg ccgtccgcca gcgacagcac acccgcaca 4200
 caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac 4260
 gaacgccaca cctccgcca cgacaccatc accgccaca acaccggctg aacgacatcc 4320
 acccgtcca acgccaccgg atcaccagc acaccagca acgaccagcc cacgaacggc 4380
 tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga 4440
 tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc tgaccggga acacgaacac caccggccc 4500
 tcaccggca acccggcaac acccgacacc acaccctcca ccggctcccc cgcgccaac 4560
 gccgccagag aagcccgcgc accggccaca tcagcggcca ccaccaccgc acgatgcggc 4620
 aacaacgccc gcgacgcggc aagggaccag gagaggtcca ccgggtccag gccggggtgg 4680
 gtgtcgaggt gggcggcgag ccgggtggcc tgctcggcga gggcggcctg ggagcggcg 4740
 gagagcagcc acggcaccca gcgcggcgcg gcgccgcgcg cgggcgcggc cggttccgcc 4800
 ggggcctcct ccaggatgag gtgggcggtg gtgccgctgg cgcgaacga cgacacgccc 4860
 gcgcggcgcg gccggtcggc cgggggccag acggcggcgc cggtgacgag ttcgacggag 4920
 ccggaggccc agtcgatgtg cggtgagggg gcgtccacgt gcagggtgcg gggcacttcg 4980
 ccggcgcgca gcgcgagcac cgtcttgatc acgccggcca cgcccgcgc ggggccggtg 5040
 tggccgatgt tggacttcag cgagcccagc cgcagcggct gtgcgcggtc ctggccgtag 5100
 gtggccagca gggcgttggc ctcgatgggg tcgccgaggg tggtgccggt gccgtgtgcc 5160
 tccacgacgt cgacgtcggc ggcggtgagg ccggcggcgg ccagcgcgga gccgatgacc 5220
 cgctgctggg cggagccgtt gggggcgggt agcccggagg aggcgcctc ctggttgatc 5280
 gccgagccgc ggaccacggc cagcacgggg tggccggtgc ggcgggcgtc ggacagccgc 5340
 tccagcacga ccacgcccgc gccctcgac cagccgatgc cgtccgcggc ggcggcgaac 5400
 gccttgacg gcccgtcggg ggcgaggccg cgctgccggg agaactccac gaaggcacgc 5460
 ggggtcgaca tgaccatcac gccgccggcg agggccagcg agcattcgcc gctgcgcagg 5520
 gactggccgg ccaggtgcag ggcgacgagc gaggacgagc aggcggtgtc cacgctgacg 5580
 gccgggcctt ccaggccgag ggtgtaggcc acccggccgg agagcacgct ggcgtagttc 5640
 ccggtgccga gcagcccctc gtccacgccg gcgaccgcgc cgtgccgtga gtcgtagcgc 5700
 tggtcggtga cgcccgcgaa gacgccggtg gcgctgccgc gcaggccgtg ccgatatgacg 5760

ES 2 533 437 T3

ccggcgtgct cgaacgcctc ccaggcgact tcgaggaaca gccgctgctg cgggtccatc 5820
 gccagcgctt cgcgcgggct gatgccgaag aagtgcggct cgaagccggc ggcgtcgttc 5880
 aggaagccgc cctggcgcag gtaggtgtgt ccggcccggg ccgggtcggg gtcgtagagg 5940
 ccgtcgaggt cccagccgcg gtcggcgggg aagtgcgccg tgacgtcacg gccttcggcg 6000
 aggagctgcc acaggtcgtc gggcgaggcc actccgccgg ggaagcggca ggccatgccg 6060
 accacggcca gcggctcgtc ggccgggggtg gcgcggacgg cggggcgggc cgggacgggc 6120
 gcgccgtcga gccgggtgag cagatggtcg gtgagggcgg ccgggttcgg gtggtcgaag 6180
 acgacgctgc tggccagcgt caggccggtc gcctcggcca gcgcgggtcg cagccgcagg 6240
 gaggcgaggg agtcgaagcc gagggcggcg aaaccgcggg gcggttcgat cgcggcgggg 6300
 tcggcgtggc cgagcacggc ggcggtccgc agccgtacca ggtccatgac ggcgtgccgg 6360
 cgttcggcgg gggtcagccc ggccagctcg tcgcgccagg gcgtgccctc gtcggcggtc 6420
 cgctgcgcgg ggagcgcgac gggggtggcg gccgggggca gcgggcgggc cgctgcgtcc 6480
 acgggcggcc agtaccggtc gcgctggaag gcgtacgtcg gcaggtcggc cgggtgggct 6540
 ccggtgcccc ggaagaaggc ggtccagtcg atgcgcacgc cgtgcgtgtg cgcctcggcc 6600
 aggttggcca gcagggtcgg caggccggcc cggtcgcgct ggagggtgcc gacgaccgcg 6660
 gctccggtct ccgtgcgctc gacggtctcc tgggtgccga cggtcagtac ggggtgcgga 6720
 ctgacctcga tgaagccccg gtggccctgg gcgagcaggg cggcgacggc gtcggcgtag 6780
 cggacggggt cgcgcaggtt gcggtaccag tagccggcgt ccagcgccgt gccgtccgcc 6840
 cactcccccg tcacggtgga gaacagcggg accgtgccct caccggcccg cacgccctcc 6900
 agatcagcca gcagagcctc acgcaccggc tccaccagca ccgaatgcga ggcatagtcg 6960
 acagcgatac gccgggcccg cccccccga ccccgcgaat gagccaggaa ctctccagc 7020
 gccaccccct caccgcgac gacgaccgac tcaggaccgt tgaccgcagc caccgccaac 7080
 cggcccggcc agcccaccaa cagctcctcg acaccggacg gcccggcagc gaccgacacc 7140
 atccccccac tgcccgcag cgccgtcaa gccctgctgc gcagggcgac gaccggggcg 7200
 ccgtccgcca gcgacaacac acccgccaca caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga 7260
 ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac gaacgccaca cctccgcaa cgacaccatc 7320
 accgcccaca acaccggctg aacgacatcc acccgtcca acgccaccgg atcaccagc 7380
 acaccagca acgaccagcc cacgaacggc tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc 7440
 cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga tccaccgcca tcccaccca ctgcgcccc 7500
 tgaccgggga acacgaagac ggcgcggccg tcgcccagcg cgcggcccg caccacgtcg 7560
 gccgactcgg cgccttcgcg cacggcggtc aggccggcga gcaggggtgc gtggtccgcg 7620

ES 2 533 437 T3

ccgaggacga ccacgcggtg ttcgaaggcc gtacgggtgg tggcgagggc gagggccacg 7680
 tcgtgggggg cggcgtcgtg cgcgggccgg tgggcgagga ggcgttcggc ctgggcgcgc 7740
 agtccggccg ccgtccggga ggacagcgtc cacgggacga ccggcagggg gcggtccgtg 7800
 gcctcgtcgg tgggctcggg ccgggcgggt gcctgctcca ggatggcgtg ggcgttggtg 7860
 ccggacacgc cgaacgacga cacgcccgcg cggcgcggtc gctccccgcc cggccagtcc 7920
 cgctcctcgg tgagcagttc cacggcgccg gcggtccagt cgacgtgcgg tgacgcctcg 7980
 tccacgtgga gcgtgcgcgg cagcgtgccg tggcgcatgg cctgcacat cttgatcaca 8040
 ccggccacac cggcggcggc ctgcgtgtgc ccgatgttg acttcaccga accgagccac 8100
 agcggctcgt cccgctcctg gccgtagggt gcgaggagg cctgcgcctc gatcgggtcg 8160
 cccagccggg tgcccgtacc gtgcgcctcc acggcgtcga cctggctcgc ggccaggcgg 8220
 gcgtcggcca gcgcctggcg gatcacgcgc tgctgggcca gtccgttggg ggcggtgagt 8280
 ccgctgctcg cgccgtcctg gttgatggcg gtgccgcgga ccacggccag cacggggtgg 8340
 ccgttgccgc gggcgtccga gagccgttc aggacgagca tgcccgcgcc ctccggcgaag 8400
 ccgaaccctg cggccgcgcg ggcgaacgcc ttgcagcggc cgtcggccgc gagggcccgc 8460
 tgccggctgt actcgtgaa cacgccgggc gtggacagca cggtcgcccc gccggtgagc 8520
 gccagcgtgc actccccggc gcgcagcgag cggaccgcga ggtgcagggc gaccagggac 8580
 gaggagcagg cgggtgtccac ggagagggcg gggccctcca ggccgagggg taggagcacc 8640
 cggccggaga gcacgctggg cgaggtgccg gtgacgacgt acccctccag ctccggtggc 8700
 accgggcccg tgatgtcga gtagtcctcg ctgctgaagc cgacgaacac gccggtggcg 8760
 gtggagcgc gccggccgg gtcgatgcca gcccgctcca gggcctcca tgaggtctcc 8820
 agcaccagcc gctgctgcgg gtccatggcc agcgcctcgc gcgggctgat gccgaagaag 8880
 ccggcgtcga agtccgcggc gccgtcaggg aatccgcctt cgcgggcgta ggaggttccg 8940
 ggccggtcgg ggtccgggtc gtagaccgag gccatgtccc agccgcggtc ggccggggaac 9000
 gccgagaccg cgtcgtccc atcggtcacc agccgccaca ggtcctcggg cgaggtcacg 9060
 ccgccggggt agcggcaggc catgcccacg atcgcgatcg gttcgcggtc gcgggcctcg 9120
 gcctcgcgca gccggcggc ggcgacctgg agatcgcggc tgacctgctt gaggtagtcg 9180
 agcagtttgg cctcgtcagc catcgggtgca cccccgtgcg gttcgttcgg cgcgggtcac 9240
 gagacgcccc ggtcgtcag gtcgaagagt tcgtcggcgg tgacgccgtc cagagcggcc 9300
 cgctcgggtg tgccgtcggc cgtgccggcg tcccagcggg ccgcgaggtc ccgcaggtgc 9360
 gccgccacc gccgcgggtc ggtgccgtcg gccggcagtg cgcgagcgc gctctccacg 9420
 cgggccagtt cggcgatgat ccggtcggcg ctgcctcgc cggactcgtc cggcaggagc 9480
 gcgtcagga ggtggtcggc gagcgcggcc gggttcgggt ggtcgaacac gatggtggtg 9540

ES 2 533 437 T3

ggcaagtcga ggccggtggc ggtgccgagg cggttgcgca gttccacggc ggtcagcag 9600
 tcgaagccca gttccttgaa gccgcggtcg ggtgccaccg cgtcgcgtcc ccggtgtccc 9660
 aggacgtcgg cgacctggcc gcggacgacg tcgagcaggg cgggggcgcg ctccggcgcg 9720
 ggcagcccgg tgatccgcg caccagggcc gccgcaccgg gcaccggggc ggcggcggcc 9780
 gggccggccg ggggtggcgac caggccgcg agcagcggcg ggggtggcg ggcggagggc 9840
 gtggcgaggt ccaggcgcg ggtgacggtc acggcgtcgc cgggtggcggg ggccgtgtcg 9900
 aacagggcca gtccttcggc ggcggccatc ggcacgatgc ggttgcggcc ggcgcggggc 9960
 acgtcggcgg cgtccaggtg ccgggtgagg ccggtggcgt cggcccacag gccccaggcc 10020
 gcggcggtgc cgggcaggcc ggcggcgcg cgccttcgg cgagcgcgtc gaggaaggcg 10080
 ttggcgcgcg cgtagtggc ctgcgcgggg gtgccgaggg tggcccgccg ggaggagaac 10140
 agcacgaagg cggacaggtc cttgtcctcg gtgagttcgt gcaggtgcca ggcggcgtcg 10200
 gccttcgggc gcagtaagcc cggcagccgg ccggcgccga gttcggtcag cacgccgtcg 10260
 tcgagggcgc ccgcggtgtg caccaccgcg gtcagcgggg cctcggcggg cagcttggcg 10320
 agcagcgcgt cgagggcgcc gcggtcggtg acgtcgcagg tctcgaagcg gacgggtggcg 10380
 cccgcgcgg ccagttcggc gaccaggtcc gcgctgccgg gggcgggcg gccgcgccgg 10440
 ctggccagca ccaggtcacg ggcgccgtgt tcggacacca gatgccgggc gagcatgccg 10500
 ccgagcacgc cggcgccggg gatcaggacg gtgccgtcgg cgtacggggc gacgggtgagc 10560
 acgatcttgc cgggtgtccg ggcctggggc atgaaccgga acgcgggtcg cgcgtcggcg 10620
 aggggcccagg tccgggtggg cagcccggtc agctcgcgcc cctcggcgtg ggcgacgacc 10680
 tcggtcagca ggctctggac gcggtcgggg ccggcgtcca gcagcaggtc gaacgggagg 10740
 tagtcgacac cgggcaggcc ggcggggtcg cggcggtcgg tcttgccgag ttccacgaac 10800
 cgtccgccgg gacggagcag tcgcagcgac gcgtccacga actcaccctg gaggaggttc 10860
 agcacgacgt ccatctccgg gaaccgctgc gcgaactccg tatcccgcga cgacgccaca 10920
 cgcgcctcgt ccagaccggc cgcccgcagc acctcgtgct tgccgggact cgccgtcgca 10980
 tacacctcgg cgcccagcag ccgcgccacc cgcaccgcgg ccatgcccac accaccggcc 11040
 gccgcgtgca ccagcaccgg ctccccgcc cgcaccgcgg ccacatcgcg cagcgcgaac 11100
 caggcggtgg cgaacacgga cggcagggcc gcggcgcgga cccaggacca gccggcgggc 11160
 acgggcacca cgagccgccc gtccaccacg gcgaggggtgc cgaagccgcc cggcaccatg 11220
 ccgaggactc ggtcggccgac ggcgaggtcg gtgacgtccg gggcgaccgc gaccacgggtg 11280
 cccgcggcct cggagccgat cgcgtcgacc tcgtccgggt acatgtcgag cgcgcacagc 11340
 acgtcgcgga agttcaggcc cgccgcgcgg acggcgtatgc ggacctggcc ggggtgccagg 11400

ES 2 533 437 T3

ggggcggtgg cgtcgggagc ggcgacggcg tcgacgccgt cgatgctgcc gggccggacc 11460
 acgtcgacgc gccaggcgtc ggcgccgacg ggcggggcgca gcgcgggtctc agcggccccg 11520
 gtgagccggg cgacgaggcg ttcgccgtcg cggagcgcg tctgcccgtc gtcgccgacg 11580
 gccggcacag cgtccagggg ggcgggtgtg ccgtcggtgt cgacgagcag gaaccggctc 11640
 ggggtgctcgg tctgcgcgga gcgcaccagg ccccagaccg cggcggcggc cgggtcgggt 11700
 tcctcgcccg gccgggcggc gacggcgctg cgggtgacga tcgcgagccg ggcctgcccg 11760
 aaccggctcg cggcgagcca ctcgctgacg agttccagca cctgggcggg ggcgccgttg 11820
 gcggcggcga ccacatcggc tcctgtgctg acgggagcga ggacgaggtc caccgcgccg 11880
 gcgtcgatgt cggcgagggc ggtgctcagg ggcgcggcga ggccttccgg tccgtcgccc 11940
 aggacggcgc agcgcgcggc ggcgggtgtc tcggcgtcgg gggctgcca ggtcacgcgg 12000
 aacagcgcgt cgcgcgtgcc ggcggcggcc acggcgcgga gctgcccggc cgacgcgggc 12060
 cgcagccgca gcgcggccag ctccacgacg ggccggccct cgcggtcggg cgcggtgagg 12120
 ctcagcgtgt cggcgtctc ccgggcggcg cgcacccgca ggacccgggc cgggccgggg 12180
 tgcacggtca cgccggtcca ggtgaacggc agcagcagcg gcgcgtcctc gggctcggcg 12240
 gcgggcacgg cctgggtgac ggcgtcgagc agcgcggggg gcacgagatg gccggcggtg 12300
 tcgacggtgt cggggagttc gacctcggcg tagacctcgg tgtcccggcg ccacagggcg 12360
 cgcagggcct ggaaggcggg cccgtagccg tagccgcggg cggcgaaaacg gtcgtacacg 12420
 ccgtccaccg ggaccggctc agcgcgccgc gggggccacg cgcgggtctc gggctccgcc 12480
 ggctcggccg gctcggccgg tgccaggacg cccgtggcgt gccgggtcca gccgtcgccg 12540
 gagtgggagt ggacggcgac cgtgcggcgg ccggaccggt cggcgccgtg cacggtgacg 12600
 cgcagggta ggccgtcggc ggggacgccg atgggcgcgg ccagggtcag ctctcgatc 12660
 tgggcgcggg cgagccggtg gccggcgtgg gccaccatct ccaggacggc ggtgccgggc 12720
 agcagggcgg tgcccagcac ggtgtgctcg gtcagccagg ggtgctctc ggggctgatc 12780
 cggccggtga ggagcaggcc gtcctcgtcg gggagttcgg cctcggcggc gagcagcggg 12840
 tgccctccgg cggtgaggcc gacggcggtc aggtcgccgg cggcggcctg gggggtgagc 12900
 cagtagcgct cgcgctgga ggggtaggcg ggcagttcga ccgggcgggc gccgggtggcg 12960
 tcgaacaggg ggcgccagtc gaccggcacg ccgtcggcgg ccacctcggc cagtgcgggtg 13020
 gtcagggcga gccggctcgt ctcgctcgcg cgcaggggtg cggcgaccog cagttcgggtg 13080
 cccgccgct cggcggctc ctgcatggcg accgtgagca cggggtgcgg gctgatctcc 13140
 acgaagccgt ggtggccggc ggcgagcaga tcgctgatcg cgttctggaa gagcacgggc 13200
 tcgcgcaggt tgccgtacca gtagcgggcg cccagttcgc tgccgtcgat ccagtcggcg 13260
 gtgacggtgg agtagagggg cacgtcgccg tcccgggggc ggatgccctt gaggtcggcg 13320

ES 2 533 437 T3

agcagccgct gccgtacggc ctccacctgc ggggagtgcg aggcgtagtc ggcggcgacg 13380
 cggccggcgc gcagcccctc gtcgtcgcag aggtcgagca gtcctccag ggcatacgcg 13440
 tcgcccgcga cgaccagcga gcgggggctg ttggcagcgg cgatgccgag ccggccgggc 13500
 cagcgtctca gcatccgctc gacgttcgcc gcgggggcg cgacgaaggc catgccgcag 13560
 cggccgggca ggtcggcgac ggccttggcg cgcagcgcga cggcttcgc ggcgtcgtcc 13620
 aggtgaggg cgccggcgac gcaggcggcg gcgatctcgc cctgggagtg gccgaccacg 13680
 gccgccggca cgacgccgtg ggagcggcac accgcggcca gcgagaccat gagcgcgaac 13740
 agcaccggct gcaccacgtc gacgcggctg agcggcggcg cgtcctcggc tccgcgcagc 13800
 acgtccacga ccgaccagtc caggtagggg gcgagggcgc gtcgcactc ggccatgcgc 13860
 gcggcgaaca ccgggtgggt gtcgagcagt tccacgcca tgccgagcca ctgtccgcc 13920
 tggccggcga agacgaagac gacgtgccg tcggctccgg cggtgccgcg gacgacggcc 13980
 gggtcggcgc cgcccgcggc gagcacgtcg agcgcggcga gcagttcggc gcggtcccgg 14040
 cccacgacgg cggcgcgggt ctcgaacgcg gtgcggcggg tggccagggt gaacccgacg 14100
 gaggcgggct cgaggccggg gtcggcggcg acgaactcgc gcagccgggc ggcctgttcg 14160
 agcagcgcgg cctcgggtgc cgcgacagc tgccagggca cggggagcgc accggccggc 14220
 ggcgccgtcg ctctcctcggg ttcgggcgcc tccgccacga tcacatgggc gttggtgccg 14280
 ctgacgccga acgaggacac gccggcccgg cggggacgct cgccccgggg ccacgggcgg 14340
 gcctcggta gcagccgtac gtcgccggac acccagtcca cgtgcgggggt gggctcgtcg 14400
 acgtgcagcg tcttcgggag cagtccgtgc cggagcgcga gcaccgtctt gatcactccg 14460
 ccgacgccgg cggcggcctg ggcgtggccg aggttgact tcagcgagcc cagccacagc 14520
 ggccggtcgc ggtcctggcc gtaggaggag aggagtgcct ggcctcgat ggggtcggcc 14580
 agggcgggtc cggtgccgtg gccctccacg gcgtccacgt cggcgggacg cagtccggcg 14640
 tcggccagtg cctgccggac cacgcgtgc tgggcggcgc cgctcggcgc ggtgaggccg 14700
 ttggaggcgc cgtcctggtt gacggcggtg ccgggcagca gggcgagcac cgggtggccg 14760
 tttcgccggg cgtcggagag ccgctccagc aggagcatgc cgacgccctc ggaccagccg 14820
 agtccgtcgg cggccttggc gtacgagcgg cagcgaccgt cctcggacag gccgccctgc 14880
 ttggtgaagt cgacgaacag ctccggcgtc ggcatacagc tcacaccgcc ggccagcgcg 14940
 aggtgctct cgcccagagc cagcgaccgc accgcctggt gcagggcgac gagggaggac 15000
 gagcagggcg tgtccaccgt gaaggcgggg ccttccaggc cgaggacgta ggagatgcgg 15060
 ccggccacca cgctggccag gcggccggtc agggcgtgcc cgtcggccgc ttccgggatg 15120
 ccggcgagca gcgaggagta ggactgggcg ttggcggcga cgaacacgcc gacgcgtccg 15180

ES 2 533 437 T3

ccccgccacg agccgggtgc gacgccggcc cgctccagcg cctcccagct ggtctccagc 15240
agcagccgct gctgggggtc catcagctgg gcctcgcgcg ggctgatgcc gaagaagccg 15300
gcgtcgaaca gggcgacgtc gtcgaggaat ccgccgtgcc gggcgcggtc ggccgagggg 15360
ccgtccgggt cggcgagggc ggcgaggtcc cagccgcggt cggcggggaa cggcgtgatg 15420
gcgtcgcgct cctccagcac gagccgccac agctcgtcgg gggtggtcac accgcccggg 15480
aagcggcagc ccatgccgac cacggcgacc gggtcgtcgt cggccgcgcg ctgtacgggc 15540
tcgtcgtcct cggcgagccg gacgtgccgg cgggagggcg cgtcgaccag gacgtccgcc 15600
agggcgcggg cggtggggtg gtcgtagatg gcggtgggtg gcagcttcac gccggtgccg 15660
cggctgagcc gcagcagcag ttgtacggcg gtcagcgagc gcagtccgag ttcccggatc 15720
gcccgggtccg gcggtacgtc ggcggcggtg ccgaggtcga gcacctccgc gacctgtgtc 15780
cggaccaggt ccaggacgac gcgccggcgc tcgggttcgg gcagaccggc gagccgggtc 15840
gcgagcgcgg gcggtgagc agccttcggg tcggtcagcg gctcagtcac gggtggtccc 15900
ctccagcggg tccggtgctg gcagtgcgga gacgggcagg ccgggttcgg cgagtgcggc 15960
ctgtagcagc gcggcggtgc cggccagcag gccgtccacg acgcgtcggc cgagggcggc 16020
ggcgcggtgt acgacgtgtc cggtgaggcc gccgtcgggg tcctcgacca ggtgcacctc 16080
gaggtgccag cgggcgtacg cctggtggcc cgtgaactgc tcgacgcggg cggcaggcag 16140
gccgagttcg ccgagttcga cgttgacgag ctggaacacg acgtcgacca gcggctgttc 16200
ggggtccagg ccgaggcctt cgacgacgcg tcccagggc agggcctggt gggcgtaggc 16260
gtcgagggcg gtgtcccgga cccgctccag caggccggcg aaggacgggt cggcgtgag 16320
gtcgacgcgc aggggcacga agttggcgaa gaagccgatc agcccctcga cctcggcccg 16380
ggtgcggccc gccaccgggg agccgacggc gaggtcgtcc gtgcccgcc accgggagcag 16440
cgtggccgtg aacgcggcca gcagggcat gtagagggtg gcgtcgtgct cggcgccgac 16500
ccggcgggcg gtggcgacca ggccggcggg cagccgccac tcggtcagca cggcgtggc 16560
gtcgtgggcc gcgtcggccg ggacgcccgg cagggcgagg ggcgcaggc cgtccagccg 16620
gcggcgccag tggccgagct gggcgtcagc cgcggctccg gtcagccagg accgctgcca 16680
gaaggcgaag tcgccgtact ggacgggagc ttcgggcagc tcggccggac ggttctctcg 16740
tagtgccgcg taggcgccg acagttcggc ccagagcacg ccctgggacc agccgtcggc 16800
ggcgatgtgg tgcacctca gcagcaggac gtggtcgtcg gggcgatcc gcagcagtc 16860
gggccgcagc accggtcccc ggacgaggtc gaacggccgg gccgctgcct cgtcggccag 16920
ggcgcgggcg gcggtctcgt cggccacgtc caccgggtcc agcacgatgt ccgtggcggg 16980
caggatcacc gacgccggct cgtcgccggg cacgaagacc gtgcgcagcg cctcgtgccg 17040
gcgcacgacc tcggtcaggg cgcggcccag caggtccgcg tccagttcgc cggatgatccg 17100

ES 2 533 437 T3

cacggccagc gggatcgtcc agaccgggtc gccggggtcg gcctcgtgca gccgccacag 17160
ccgcagctgg cccagcgaca gcggcagggg ctctctgccg gacaccggca ccaggggagg 17220
tacggccgtg cgcggggcca cggcgacgac ctccggcgagg gcgcgcgggg tgcggtgctg 17280
gaacagctcc cgcagggaca cctcggcgcc cagcgcctcg cggatccggg cgaccgtgcg 17340
ggccgcgacc agcagagtgc cggcgagcgc gaagaagtgc tcgtcgtatgc cgaccccgcc 17400
ggtctccagc acctcggcga acacctcgca cagcgtctgc tccgcaccgg tacgggggtgc 17460
ggtgaagccg gtgtcagagc tggcgcgag gtccggggcg ggcagcgcgg cccggtcgat 17520
cttgccggtg gtggtcagcg ggaacgcgtc cagcgcgacg agcgcggcgc gcacatgta 17580
gtccggtacg gcgtcggcca ggtgggcgcg cagccgggcc ggcagccctc cgtcggtagc 17640
ggggacgggc acgacgtagc cgacgagccg cttgacgccg ggggcgtcct cgcggggcgc 17700
gatgacggcg cgggtgacct cggggtggcg cagcaggacg gcctcggacct cgcccagctc 17760
cacccggaag ccccggatct tgacctggtg gtcgagccgg cccaggtatt ccaggctgcc 17820
gtcgggcccgc cagcggccca ggtccccggt gcggtagagg cgggagccgg gcgggcccga 17880
cgggtcgggc acgaacttct gcgccgtcag ttccggcttg ccgacgtagc cgcggggcag 17940
tccggggccg gcgaagcaga gttcggccgc cagcccacg gggaccggcc gcagccggtc 18000
gtccaggacg taggcgcggg agttgtcgac cggctcgccc aggtgtgagg tccggggcca 18060
gtcggcgacg tcagcgggca gggtaagga ggtgacgacc tggatctcgg tggagccgta 18120
gtggttgtgc agacgcagac ggggccgggc ggcgcagaac tcgcgcagca cgggtgtccag 18180
cgacagcggc tcgcccgcct gggagatgtg ccgcagcgag gtgagccggg cccggccggc 18240
gccggcctcc tcggcgagcg cgcggatcat caggttgggc acgaatatct gctcgacggc 18300
ccgttcgtcg agccagcggg cgaagcgggc cgggtcgcgg cgggtctcct cgggtgggat 18360
gaccagcgtc tcgccgtaca ggagcgcgga gagcacctcc tgacatgca cgtcgaaggt 18420
gagggcgggtg aactggggcg tgcgcgtgcc gggctcgccc ggtaccgtct tcttctgcca 18480
ggcgagcatg ttgaccacac accgggcggg catggcgatg cccttgggca cgccggtgga 18540
gccggagggtg tagacgacgt aggcgagga gtcggggccg ggtcgtccgg cggccgttgc 18600
cgcgggcggc tcctgcccgg ccggggcgtc cagcaggacg agggcggtgc cctcggcgaa 18660
gacgtcccg ttagcccggc cgggtgacggc gacggtcatc cgggcgtcgt cgacgatgag 18720
ccgatccgg tcccgggggt ggctcgggtc gatcggcaca taggcggcgc cggccttgag 18780
gatgccgatc agagcggcca tctgcacggt gccgcgtcc aggcagaggc cgacgaggtc 18840
gtccggcccc acgccctggg cccgcagccc ggcggcgatc cgctcggcct cgtggtccag 18900
cgcggcgtag gtgaggacgt cgtcctcgca ctccacggcg cgggcggccg ggggtcgggc 18960

ES 2 533 437 T3

gacctgctcg gcgaacagct ccacgagcgg gacgtcccgg tacgggaggg cgggtgctgtt 19020
ccaccgctcc agcagcaggc gccggtcgtc gtcgtccagc agcagagagcg cggacagcgg 19080
cgcgtccggg tcggcgaggg cggcgcgcag cagcacctgt tggatgatgca gcaggcggcg 19140
gaccgtgtcc gcctcgaaca gcgcgggtgga gtgcagcacg gtgccgcgca cccggtcgcc 19200
gtcctcggtg aggtgcaact cgaggtcgac gcgggtgaag gcgtgctcgt ccagcagcgg 19260
ttccaggcgg gcggcgccga ggcggtcgcc cttgtccccg ggcgcccgca tcagctggaa 19320
gaccacctgg accagcgggt tgcgggacag gtcccgtcgt ggtgccaggg tctccaccag 19380
gtgctcgaag ggcaggtcct ggtggtccat ggcgcccacc accgtctcgc gcacccggcc 19440
cagcaggtcg cgaaggtcg ggtcgccgga gacgtcggtg cgcagcacca gcatgttgac 19500
gaagaagccg atcagccgct ccacctcggg gcgggtacgg cctgccacgg gggcgccgac 19560
ggcgacgtcc tcggtgccgg cgaacctgac caggaccacg gtgaaggcgg tcagcagcgt 19620
catgtagagg gtggcgccct cgggtgctgcc gaacgcgcgc gcggcccgga ccaggtcctc 19680
gggcagttcc cacggctggg aggcgcccgc cgagccggcg accgcggggc ggggcccgtc 19740
caggggaagt tccagggggc gcagcccggc gagccgcgcc cgccagtagg tgaggtaccg 19800
ctccagttcg gcgccggtga gccggccctg ctgccagacg gcgaagtgc cgtactggac 19860
aggcagttcg ggcagttcgg cggggtcgcc ggacagttcg gcgcggtagg cctcggccag 19920
ctcgccccag aacacggcgt gcgaccagcc gtccgtgacc gcgtggtgcg cgggtgatcag 19980
gacggcgtgg tcctcgcccg cgagggcgag cacgcggggc cgcagcagcg gtccccgggc 20040
caggtcgaag gggcgcgcgg cgtccgcctc ggccagggcg cgtacctcgg cctcgtcggc 20100
gacgtccgtg acctccaggc ggagcggggg cgcggggcgt acgacggcca taggctcgcc 20160
ggcgtcggcg gcgaagacgg tgcgcagcgc ctcgtggcgg gagaccacca gggacagtgc 20220
ccggccgagc gcgtcgacgt cgagcggggc gtgggcgcgt acgcccacgc ccacgtcca 20280
gaagccgctg tccggggtga gccggtcag gaaccacagg cgcgctggg aggacgacag 20340
cgaagcgcg gcgccgtccc ggcggggcgg ccgatgacg tccgtggcgg tgccgggctc 20400
gccgagggtc tcggccagcc ggcgcgggga gcgccgttcg aacaccgcct ggagcggcac 20460
gtcgggcccg aagcgggcgc ggatccgggc gatggcgcgg gtggccagca gcgagtgcc 20520
gccagggcgc aagaagtctg cgtcggcgc caccgggtgg acgtccagca cctcggcgaa 20580
gatctcgac agcaccgcgt ccgcctcggc cgcggggcgg acgtaccgc tctcggcgac 20640
cgagcgggtg tcgggcgcgg gcagggcccg gcggtcgatc ttgccggtgg tggacagcgg 20700
gaacgcgtcg agcgcgacga acgccgacgg caccatgtag tcgggtacgg agcccgggc 20760
gtgggcgcgc agggcgggca gcacgctcgc gccggcctcc ggctccagca ccacataggc 20820
gaccagggcg ttgtcgcccg ggatgtcctc gcgcacggcg acggtgacct gcgagaccgc 20880

cggtgcccgc agcagcgcgg cctcgacctc gccgggctcc acccggaagc cgcggatctt 20940
 gacctggacg tcggcgcggc cgaggaactc cagcgcgccg ccgggcagcc accgtacgac 21000
 gtcgcccgta cggtagatcc gctcgcccgg cccgccccac gggtcgggca cgaacttctc 21060
 ggcggtcagg tcgggcccgg ccaggtagcc gcgcgccacc cggggcccgc cgatgaccag 21120
 ttcgcccgcc acgcccagcg gcgcccggcg gagggtgtcg tcgaggacgt acacccgggt 21180
 gttgtcgatc ggcgcgccga tgggcacccg ggagccggcg agccggaagc cgggttccat 21240
 cgggaacagc gtggtgaacg cgtcgcctc ggtcgggccg taggcgtcgg ccacggtcag 21300
 gtgcgggtgg gcggccatca cctgggcgac ggtctcgccg gacacggcct cgccgccggt 21360
 gagcacctcg cgcagcccgc cgaagcactc catgcactcc tcggccagga ggctgaacag 21420
 ggggtcggggc aggcacatcg cgtgacgcc gtgctcgcg atgagccggt cgaaggtgtg 21480
 cggttcgacg tgctcgtcgg tggcgacgac gatctgcttg ccggtcagca ggaacggcca 21540
 cagctcgtag gtggagatgt cgtggccag cggatagtgc agcagcacc gttcgtggtt 21600
 gccgttgctc cagcggcggc cggcggccag cacgacgacg ttgcgggtgg tcacggccac 21660
 gcccttgggc tcgcccgtgg acccgagggt gtagatgacg tacgccgtgg tgtcggggtg 21720
 cgggtcgata ccggggtcgg tgcgggccc ggggcccggg tcggtgacgt cgaggacggt 21780
 gatgccgtcg gtgccgggca ccgggcggtc ggcgatgacg acgcgcagcc ccgaggtggc 21840
 cacgatgcgc tcggtgcggc ccgggggggt gcgcgggtcg agcggcacgt aggcggcgcc 21900
 cgcttgagc acgcccagca cggcggccac catgccggtg gagcgtccgg tggcgacgcc 21960
 gaccggttcg tcggcgcgca cgccgtgggc cagcaggagg tgggcgaagc ggttggcccg 22020
 ccggtccagt tcggcgtagg tgaccgcctc gtcgccgcag atcagggcga cggcgtcggg 22080
 ggtgcgggcg gcctgctcgg cgtagagccg gggcacgcag ccgtccggca gcggtgcggc 22140
 cgtgtcgttc caggcgacca ggtgcgggtg ccggtcggtc tcgtcgagca tggtcgcccg 22200
 ggagaccggc cggtcggggt cggcgagcac ctcgccgagg accaccgaca cgtggtgcat 22260
 cagctggcgg acggtgtcgg cgtcgaacag gtcggcccg tacaggacgg tcgcccgcac 22320
 ctgctcgccg gtctcgacgg cgtgcacctc caggtccatc cgggtgtacg cgtggtcgat 22380
 gtcgaacggc tcggcccggg cgccctgcca ccagggcccgc cggggcgcggt cggcgagcag 22440
 ctggaacgcc acctgcacga gcgggttgcg ggacaggtcg cgctcggggc gcagccgttc 22500
 caccaggtgc tcgaagggga cgtcctggtg ctcgacggcg ccgaccaccg actcccgtac 22560
 ccgcccagc agttcccgga agtcgggtc gccggacagg tcggtgcgga cggcgacgac 22620
 gttgacgaag aagccgatca gcgcctcggc ctcggcgcgg gtccggccgg ccgtcggcga 22680
 gccacggcg atgtcctcgg tgcgggcgta ccgggacagg acgaggtga acgcggccag 22740

ES 2 533 437 T3

gagcaccatg tagagcgtgg ctccctcgcg ggcggcgacg gcccgggcgt cccggatcag 22800
ctcggcgggc agctgccagg gcaggggtgcc cgcccggccg gtggcgacgg cgggcccggc 22860
cttgtccagc ggcagttcca gcggggcgag gccggccagc cggccgggtcc agtagccggc 22920
ccggcgctcc agcacctcgc cggtcagcca ggaccgctgc catacggcgt ggtcgccgta 22980
ctggacgggc agttcgggca gcggggcgcc gtcgtacgcg gcggcgatct cggcccacag 23040
cagggcctgg gaccagccgt cggtcgcgat gtggtgcacg gcgacgacga ggacgtggtc 23100
gtcgggggcg agccggagca gcgtggcgcg cagcagcggg ccccgctca ggtcgaacct 23160
ggtggacagc tcggcggagg ccgcggcgcg tgccgcgtcg gcgtcgggta cgtcgacgat 23220
ccgcggggcg accggggcg cggcgccgat gaccgcggcg ggcacgccgt cggcgacct 23280
gaaggtggtg cgcagggctc cgtgccgggc gacgaccgcc gacagggcgc cggccagccg 23340
ctcgggggtcc agcgtccgc gcacgcgag ggctccgcc gaggtgtacg aggcgctgcc 23400
gggggcgagc tgggtccagga accacatccg ctgctgggcg aaggacagcg gcagcagccg 23460
gtcgcgggtcc gcgggcacca gcggcgcgcc cgggtcggcc gggagcgcgg cggcggcgac 23520
caccgagggc agggctcgcg gggtgcggtg ctcgaacacc tcgcgcagcg ggacctcgt 23580
gccgaaggcg cgggcgattc gggcgacgag gcgggtggcg agcagcgagt ggccgccgcg 23640
tacgaagaag tcgtcctcgg ccgcaacgc gtcggcgtcg agcagctcgg cgaagatctc 23700
gcacagcgcc cgctcggcgt cggtcgcggg ggcggccagg ccggcgtccg ccgtctccgc 23760
cggggcgggc agcgcggcgc ggtcgacct gccgggtggcg gtcagcggca gcgcgtcggc 23820
gaggacgaag gccgagggca ccaggtagtc gggcagggcc gccgcggcgt gggcgcgcag 23880
ggcggcggtg tcggtggtgc ggccggcgcg cgggacgacg tgggcgacga gccgcttgc 23940
ggccgggccc tcaccgcgca ccacgacggc ggctgcgcg acggcggggg gggcggccag 24000
gacggcctcg acctcgccgg gctcgacct gaggcgcgc agcttcgct ggtcgtcggc 24060
gcggccgagg aactccagga cgccgtcggg gcggcgggc accacgtcgc cggtcgggta 24120
catgcggctg cccgccggtc cggacgggtc gggcaggaag cgctcggcgg tggccgccgg 24180
ccggccggcg tagccgcggg ccaggcgcgg gccgccgacg tacagttcgc cgggcacgcc 24240
gaacgggacg ggccgcagcc ggtcgtcgag gacgtggcg cgggtgtgt ccagggggct 24300
gccgatgggc acccggccgc cgggggcccg gtcggccggc gcgatcgggt ggaggggtggc 24360
gaaggtggtg gtctcgggtg ggccgtagcc gttgacgacc gtcaggtccg ggtggcgccc 24420
gcgcacgcgg gccacggtcg ccggggacac ggtgtcgcg ccgacgacga gttcgcggac 24480
gccggccagg caggtgacgt cctcctcgac cacgaggtcg aagaggccgg aggtcagcca 24540
cagcgcggtg acgccctggt cggcgacgac acgggcgagg gcggcgggtc cgagggcgcc 24600
gggcggggcc accacgacgc ggcggccgga cagcagcggg gaccacagtt cgtaggtgga 24660

ES 2 533 437 T3

ggcgctcgaac gcctgcgggg agtgcagcag gacccgttcg tgggcgcccgc cggaccagcg 24720
 ccggtggagg gcgagggcgg ccacggcgcg gtgggtcgtg gcgacggcct tgggcgtgcc 24780
 ggtggaaccg gaggtggaca tcacgtacgc gaggccgtcc gggccgacgg tgttcggcaa 24840
 agccgtgtcg ggggctgtgc cggggacggc gcgcaggtct acggccggca ggtgctcggc 24900
 gccggcgggt gcgggaccgc cgtcggtcag cagcagcgcg gcaccggtgt cggcgaggac 24960
 ggcgcgggtc cgggcggccg ggttgccggc gtcgagcggc aggtaggcgc cgccggcctt 25020
 gaggaccgcg agcacggcga cgaccaggtg ggcggaacgt tccgtcgcca gcgcgacgac 25080
 gctctcgggt ccggctccgt ggccggccag gacatgggcg agccggttgg cggcgcggtc 25140
 cagctgggcg taggtgaggt gttccgtccc gtcggccacg gcgacggcgt ccggggtgcg 25200
 ggcggcctgg gcggcgaaca gctcgggcag cgaggcctcg ggcagcggtc cgccggtgcc 25260
 ccgggcggcc cggctccagg ccgcgtcctc gcccgcgtcg gtcacgtca gccgggacag 25320
 cggccggtcg ggctcggcgc aggcggcgcg cagcagggcc gtcaggtggc gggccagccg 25380
 ctcgacggtc tcccggtcga acagggcgcg gctgtagttg atcagtccct cgacgccgcc 25440
 ctcggcgtcc tcgccgaggt agacctccag gtccatgcgg gtgaaggcgc ggtcgcccgc 25500
 gaagggttcg gcggtggtgc cggggaacgg cgcggggcgc gcggcgggcc ggggcacgta 25560
 ctggaagacg acctgggcga gcgggttgcg ggacaggtcg cgctcgggga ccagccgctc 25620
 caccaggtac tcgaacggca cgtcctggtg gcocatctcg tccaccgagg cggcgcgac 25680
 gcgttcgacg agttccgcga aggtggggtc gccgccgagg tcggtgcggg tgacgacggt 25740
 gttgacgaag aatccgatga gttgctcgac ctcggccagg ggccggccgg cgaccggctg 25800
 ggcgacggcg acgtcctcgg tgcgggcgtg ccgcccgagg accgcgctga acgcggccag 25860
 cagggtcatg tgcagggtcg cgcctgcccg tgcggcgacg gcccgggcgg cggcgacggc 25920
 gtccgccggc agccgccagg tgacgacgcc gccctcggcg gaggcgacgg ccgggcgggg 25980
 ccggtcgagc ggcaggtcca gcgggggacg gccggccagc cgtcctgcc agtacgccag 26040
 ccgccgctcc agcacggcgg gcgacagggc acggcgctgc caggcggcga agtcggcgta 26100
 ctgcaccggc agttccggca gcgcgggctg ccggccgtcg gccaggggcg tgtaggccgc 26160
 ggtcagctcg gccacagca ggccgtgcga ccagccgtcg gtggcgatgt gatgcaccgt 26220
 cagcagcagg acgtggtcgt cgtcggcgag ccgcagcagg cgggcgcgga gcagggggcc 26280
 cttggtgagg tcgaaggggc gcgcggcctc ctcgccggcc agccgctcgg cgtcggcctc 26340
 gtccacggcg tcggtcacgg gaacgggcac cggctccggc ggcaggacga cggcgccggc 26400
 cacgccctcg tggtcggcga agacggtgcg cagggtctcg tgccgggcga cgacacagct 26460
 cagcgcccgg gccagcaggc cggcgccgag cgggccgcgg acgcgcacgg cgggtgccgaa 26520

gttgtagaag gcgctgtccg gcatcagccg gtcgaggaac cacagccgct gctgggcgaa 26580
 cgacagctcc agcggccggt cgcgggggac cgggctgatg cccgogggtg tcgtgccggt 26640
 cctcgccgtg cgctcccga gccggttag tgccgagtcc agtcccggcc gtcgagagct 26700
 cccctgcgtc atccggtgt ctcccgtcc tcgtcggctt cggtgagtcc gcggtcgcgc 26760
 atcacgctgg ccagggcgcg gtgggtgccg gactcgcttg cttcgaactg ctcgaccacg 26820
 cgccgccgca tcggggcggg cttctcctgg ctgagcttga acatcgtctg cacggaatcg 26880
 accgcaggg tgaaggcgcc cacgccgggc gcgatctggc ggaagtagtc gagggaggac 26940
 tcctggtccc agccgcgcc gaagccggac tccagccgcc gggcgggtgc ggagacgatg 27000
 tccagcacgg cggcggggtc ggcggtgggc tccactgtgc cgttcacgtg gacggcgatg 27060
 aagtcccagg tgggggccgc gggcgtgacc ccgtagaccg tcggcgagac atagccgtgc 27120
 gggccctgga agacgatgag cgcccggtcg ccggagcgca tccggcgcca ctgcgggttc 27180
 tcgacgttca tgtggccgat cagggtggag ccggcgagcg ggacgggtgcc cgcggcgacg 27240
 gcctcggcgt cggcgcctc ggtccgtgc cggaacagca ccggcgcgtg ggtggccacc 27300
 gggacgtcgt cgtgcgaggt gacgaccatt gccagtgggt tgtgtcgcag aaacgccagg 27360
 acgacgccgt cgcaatcctc ccggtacagc ggacgttctg acacttcagc ccctgttccc 27420
 cgctgctgcc ttgcttccgg tggagcggtc cgggtcgcac cggccgccgg tgatcgaccg 27480
 ggcgatctcg cccgcgcgga ccgccaccat ggacagcagg gtggaggcga tgccgtgggt 27540
 cgctcggtg gcgccctgga cgtagatgcc gcaccggaaa tccccggtgg tgccgagccg 27600
 gtagtcgcgg ccgatcagca actccccgc ctcgtcccgg cggagggcgc cggagacgcc 27660
 gccgagcagt tcggccgggt cgggtggagtc gtaccgggtg gcgtacacga ccaggtcggc 27720
 gtccaggtcg gtgtgttcgc ccgtgggcag gaactccacg cgtacggcgg cggattcctg 27780
 gcgcggttcg acggacacca ggcgggaggc gttcatcacc cgcagcccg gggcgcggga 27840
 caccttctgc tcgtactggc ggcggtagag gccctggagg acgtcctcgt cgacgacggc 27900
 gtagttggtg ccgccgtggt agcgcgatgat ggcctgcttg acctcgggcg gggcgaagta 27960
 gaagtcgtcc acggcggccg ggtcgaagac gcggttggcg aacgggctgg agtcggcgac 28020
 gctgtagccg tagcgggca acaccgcga cacctcggcc tcgggtagc ggtccatgag 28080
 gtgcgcggcg acctcggccg cgctctggcc ggcgccgacc acgacggccc ggcggggcgg 28140
 gcgttcgtcg aacgcgggca gccggtgcag caactgggag ctgtgccaga cgcgttcgcc 28200
 ggtctccgc ccctcgggca gccggggcg caggccggag gcgaggacga ggtttctggt 28260
 ccgggcgacc acccgggtccc cggcgagcac gtcgagcgcg acgacctcac cggcttcggt 28320
 caccggccgc acaccggtgg cctccacgce gtactcgacc aggtggttca gccggtcggc 28380
 ggcccactgg aggtagtcgt ggtactcgat ccgggagggc agcaggggtg gctggttgat 28440

gaagtcgacc agccggtcct tctcctggag ataggacagc aatccgaaat cactggtggg 28500
 attgcgcacg gtggcgatgt ccttgagaaa ggacacctgg agcgaggagc ccccaggag 28560
 catccccga tgccagccga attccttctg cttctccagg aaaagggcct tcccggcggc 28620
 ttcggattca tggagcgcca ccgccagggc gagattcgcg gcaccgaatc cgattccggt 28680
 gacgtccagt acttctgatt ccgggctctg ctgcgcagtg gatgattgct ctgcgagccg 28740
 ggtcatatat caaccgccat tagtttttca atggatgtat cgtcgcagga cgcccagaat 28800
 tcacctgcga cgtcctccag atgcgtgagg gaacgcgcgc tgtaaaaggt ggtctggtac 28860
 tgggttatgt cgtagtcgac gtgggccatg tcggcgatgt ccagcggccg gatctccgcg 28920
 gaacggaagt gctccagctc gccgtaggag gagacgacgc tggcgccgta ggcccggggc 28980
 ccgtcggcgg cgtccagcag gccgcattcg agcgtgaacc agaaggtctt ggcgacgaac 29040
 tggacggcgt cctcggactc caccctgcgc acggcctcgc cggccaggcg gtacaggttg 29100
 gcgaaccggt cgtcggccag ggcgctgccc tgcccgatga cctcgtgcag gatgtccggt 29160
 tccgtcaggt agaaggggtg cgcgctgtcg cggaggactt gggaggagtg gaagtaccgg 29220
 tcggccagag agccgcagaa cagggcgaag ggaaccacgc cggacgcggg gcgtaggcgg 29280
 aatccggtca gctggtcgag ccggtcggac acttcacgca actgcgggac gccgtcgcg 29340
 cccacctcga gccgctccgc cgcctcgacg aactccggcg ccgccatgtg ccggtgccgg 29400
 tccgcgagcc gcttggaaac caggcgccac agagcgtgct cggcgtccgt gtactcgacc 29460
 tctggaatgg gctcgcgggg cacataggcg gcagcgttg cggcgatttg gtcacgccgc 29520
 tgctgataca ccgacgacgc ggttaattcg ggcgcgcccg agccgatttc cacgaacttc 29580
 cccctacttc catcgacaga aggcagcagt tgctgtccga agctattttg gttcggacgc 29640
 ccgcatcaac cttccottgt ccagccgatt cattaggacc ctacaagcca cccgcagcac 29700
 tcgcaagagt tttctatgcg cccgctatgt acccttttg gcagactcac cggaaattat 29760
 cgtcatccgc accgcggaa ccggagtcaa gcgttggtc ggagggcg cttcaagttc 29820
 ccgataggag cgggccctag gcgattcctc agatccggcc ggcgcgttcg ggtgtgtccc 29880
 aatcactgg cctaaatcct tcatgaggac ccgtcagctt gccgacggac gctctttcgc 29940
 ttgtggtgcc gggcgtttcg gtgtccgggc aggcgcgcgc ggagcgcccc aactgccgcg 30000
 tcgggctgtc gcgtcgggtg ggcgccgggt tccacggctc cgggagtcct tcgacagggc 30060
 ccggcgaata tctccaggac caagccgtgg gcggtgaggt ggtcggcgag ggcggtgagt 30120
 tcggcggcgt tcgacccgag ccgcttccgc tcgtacaccg tgaagatgac acggcagtgt 30180
 gggcgtgcg ccttgacctc ccgcgccgc ctcagcgcct cctcccggaa cttcgggctg 30240
 cccgcgccc ggggtgctgat cttctcggcg aagatgtagt cgcgcgagat gccgtgtttg 30300

ES 2 533 437 T3

gcgagcgcgt cgagctggga gtcacttcgc ctgcatccgc ccgcgcgcgg agtgggtgcgg 30360
 catcgtggca gcgcgcgtca gatgcgcggc gtcgccccca ggtgaactcc gtccgccctg 30420
 gggcagggtg ggcggagttc accgcgtcgt gcggttcaac ggggtccaatg gaggtcgcga 30480
 tacgggtccgc ccggcgcgcg ggccgcgata atcattccgg cggggcggag ccgtcagtgc 30540
 ttgacgggtga acgtggcgcc ttggggcgcg aaggctcgtgt cgtggtcctt ggcgggtggcc 30600
 agcacggata cgtgccagac gcccttgggc aacgcggcgg cttccttggc cgagctcttc 30660
 acgggtgtagg tgcacaccga ggccgtcgcg gaagtgcct tgcacgtggc ttcctcgaca 30720
 tcccgcattc cccccccgt gggcgcaagg cccgaactcg ccggccaggc gagcaccgc 30780
 aggctcttga ttccggagtt gtcggccacg gtggcgctga aggtgagcga ggcgctccca 30840
 ccggccgtac tgggtgtagt ggcgggtggcc tttgagatct ccggcttggc cggcacagcg 30900
 gcgtcggccg aggagacgaa caccacgggt ccggcaacga cggctgcggc cacggcgagc 30960
 gacgagacga caaggcgctt ggacatgaag tatcccctca tagatgaccg ctactggtct 31020
 cttcgccgag cgctctgcgc accgcggcgt tgtgtacaca gcctgtctcg acggccctgc 31080
 ccctcacatg ggcagaacta ctcaaccgaa gtactcagac gccctgagct tgtcgttcaa 31140
 cctcgtctcc gttgggggcg ggtattgagc aggcgctttt cgaatgtggc gtccagcacc 31200
 gccgtccagg atgtgcagcc ggtctgcaag cttcgtcgcg atcaggacct tcagcagatc 31260
 cagcgcgtcg tccaccgccc gcgacgtgag gtacaccgcc gcggccagca gcgttgtgag 31320
 gctgcgagag tccgagtgcc ggcgcggcaa cgacaccttg tcgtccgccc cgtaccgcga 31380
 ccaactctgcg ccgccccgtc acccgtagcg gtccgcggcg cagccggctc agctccacca 31440
 ggcggccccga cgagcagaga atccagcacc gcccgctgca cgacgcgcgg catcccgcac 31500
 aaggcgtccc aaaacgccga ttcgccgcct cccacaccga tcccacagga caggccggac 31560
 agctcgcccc cagcagcagc ggctactgtc acccgttcgg cggcggggcg gacagagccc 31620
 gtgacaacca gattgtgacg ttcggtgatc gtgacaccaa ttcggagctg gcccgctgac 31680
 ctgtgacagc ggactggcct cgaagggtga ccgaatgcag ttcttgacag caaagacgga 31740
 ccgccgcagc tcaggggcg agtgccccgc cgcagcacag tcggttcagg gctcgacgcc 31800
 ggctacggac agacgtgat ccgccgtcgc ggtcagcgcg aacgctgtcc ggtgaagagg 31860
 cggtagcagca ggagcacgat caccgagccg acgaccgcgg cgatccatgt cgagaggtgg 31920
 aagaagccgt tgatggagtg cacgccgaag atcaccttgc cgagccagcc gccgagcaga 31980
 ccgccgacga tgccgatgag catcgtgacg aggcagccgc ccgggtcctt gccgggcatg 32040
 agtgcccttg cgatggcgcc cgcgatgagg ccgatgagaa tccaggcgat gatgcccacg 32100
 gtgtgcgtcc tttgctgtag gtgggtccga ggaaggccc acgaggctcc gccggggctg 32160
 cccgccggtc gctccgcgcg gacgaccggc gacatacggga tatccgctcc ggaacactcc 32220

ES 2 533 437 T3

acacgggtca aaggtcccgt ttctcctgac cgaccacccc ggcacccgat ccgtcggccc 32280
 atccggtcga cggcggattc ggtgactggt caaccttcga tggcgctcga tcaaggttcg 32340
 ctgtcacagg tcatccgcc tcagtccctc aggtcgcccc tcggaaggcg tccaccagag 32400
 gtcaggcggg tccattcctc cggatcccca gctgcctcac agggtgctgg ggacccgggg 32460
 acggccctcg gtgttatgga taagccgaag ctcaggacgt tctcacggcg acgccggatg 32520
 agctggcgag gagggcgtgc cgaggcagtt cggttgtcac cgaggaggca tcccacttct 32580
 cacgcgtgct cattcggcgg acttctgtc accggcgccg acgagccgga gttcccgggc 32640
 tccccggctg ggcccggctg agggctgagc ccttccacgg cgaggcgga gaggcggctc 32700
 gcctgggtgt cggggctctgt gtggtgctcg gtggccaggg cgatgccgac ggcgagggtc 32760
 agcaggtcgt gaaaggtgac gtgcggtgca accgccttgt cgcgatggc ccgctggagc 32820
 aaggagttg cggctgcttc gattacgcc ccgcagctct tcggggaggg ttcttcggtg 32880
 ggcggtcgt agctgaggat atgggcgaat ccgcgggctg agacggcgta gcggacgaag 32940
 gcgtggaacc actccagcag tgcggtgctg ccgtcctcgg acgcactcag ccgatgggcg 33000
 cgctcgaca ggcccgcaat gcgctcctgg aagacggctt cgaggagcgc ccggcgggtg 33060
 gggaagtgac ggcgcacggt cgccgaaccg acgcctgcga tgcgggcgat ctgctcctgg 33120
 gatgcctcgg cgccgtgcgc ggcgacttcg gcttcggcga cggcgaggat gcgctgatag 33180
 ttgcgtcggg cgtccgagcg ctggccagtc atggtctcct cgttgctaag tggcgggccc 33240
 cgccatatct tagcggcaca cgaaacggcg ggccccgccg ttttgtctct ccggcccttg 33300
 aggagcagca ccatgccag cagcagcgat accgtcctgg tcaccggcgc caccggccag 33360
 caaggcgggg ccacggctcg cgcgcttttg gccgccaagg tgcccgtacg tgcgctcgta 33420
 cgcgatccct cgtcgaagtc cgcccgggcg atcgaggcgc tgggcgcgga actggtacgc 33480
 gcggatcttt ccgaccgggc ctccctcgac ccggcggctc agggggtccg cgcggtgttc 33540
 tcggtgcaga tgccgcccat gaccgagacc agcgtggact tcgcgagcga actcgcccag 33600
 gccaccaacc tgggtggacgc ggcgaagata gggggagtac ggcagttcgt acagtcctcg 33660
 accagtggag tcggtgaaca caccgggtc gccggctggg ccgagggccg ctgggcggcg 33720
 atggcggagt acttccacac caagcaggcg atcatggagg cggtgctggg tgcgggtttc 33780
 gcccgctgga cggatgacaa gcccgcttc ttcattggaga acctgccct gctggcacc 33840
 aaggggcccc gcggcggact gctgacggta ctgaagccgg acaccgaact ggccttgggtg 33900
 gccgtgcggg acatcggcac ggccgcggca cacgcctcc gagacccga ccggttccac 33960
 caggtggaac tggaactggc tgggtgacct cgcacgatgg agcagatcgc gcagacctg 34020
 tccgccgcct ggggcgtgcc cgtgaccgcg ccctccctga gcgtggaaga ggcccttgcc 34080

ES 2 533 437 T3

gcgggcatgc cgaagtgggg agccggacac gagtggaaaca acgtggctct ccagcccgcc 34140
cggcccacat tcgcccggaa gttgggcatc ccgctcacca ccttcgccga gtgggcggat 34200
gagcagttga cacatgtgtc tgattagggg tgtggcggca agggcgcgcc attgaccctt 34260
acggggagcg cggcgggttc ccgcagaggg cattgcggtc ggggggcatc ggtgccggtc 34320
ccctggacgg gctgcaatga gcaggacagc gcagaggggt ggacacgaga tccttgaggt 34380
gcacgacgtg gccatcaggg ggtcgggcgg tacgggatgg ggatgatgta gcgcgggtgt 34440
ggaggcatcg gccagtgcg ctgcttcgcg tgcttcgcgg ggtgccggca gcctgttcgt 34500
tggagtctgc gtggcttcgg agcccgtccg ggaagtacac gccgtggcg ctggccatg 34560
ctgcccgggt gtcgctcgcg tgggggaacg agtaccgcaa ggacgcgggc gatgcggctt 34620
cggcggcctc cctcgggtcc tcgccccttt cctcgtcgt ctcgttccag tcgagagcgc 34680
ggcccgggtcc cgcccatccg cacgagcaca ccgcgcgcaa cgctgccgcc cgcggtccgc 34740
catgaggccg gccgtcgtag acgctccgct ccgatagcca cctggcctcc gctccggaag 34800
agctgaggaa gagcacagga tccgggacgg tgccatcggc cagcaacacc ccgaccgcac 34860
ccacgtggga cgaccogaac tcctccgtcg tccacgtctc cctctcaact tcacccatcg 34920
tctcgcccct ctctcatcg ccgcatccgc accgggccga acgcacggat acagacgatt 34980
ccggagtcca aggttccgca cagcgagatc ctcgaaaagg tgacctcgca cctccaccgt 35040
gcaccaggcc tcaaagccca cgacgagccg accgagcgca gaccaccgaa gacgaagcgc 35100
atcgccgctt cccagtgcg tggttgatga ggttcaggaa agcgggggtca cttctctaca 35160
tcggacagct accgcagctt gccgcgcccg ccgcccggag cggcggttgc tcggcgcccg 35220
cgtgcgggtc ggaagcggag gctcggccgg cgaggttcgc cgtcgatgcc ggcggcacga 35280
cgggccagct ctccgatctt ctctcgggc agtcgggaca tcctgacggc ctggcgcaact 35340
gcggcccggc agtcgggccc tgagcagtg gccgacgata ccggccgtcc gaccgtcgga 35400
tgctcgggcg gcaggtagat cgctgcgcag ccgacgcaca gatagattga tcgcaaggcg 35460
cttccccttc gtcagctgag gccgctgccg tggcaggtat tgcaggagcc ggtccagcta 35520
cgggcgacgg gcttctggtt cccgtcctta tcgacttcga cagagtgtc ggtgtgctca 35580
gtgactccgg atccgctgca agcggagcaa ggcacgtcag acattttccc aggatgcccg 35640
attctgtggg gccgtgtcag tcgtcccgcg aactcgcgc gctaccggac cgggcgggcc 35700
catcccgaga atctcccgcc tgcacacgg cggcgccaac ggcgagcccg aacctctggg 35760
ccacgcggtc gctcgcggc ccggtggggc acctcgtgcc gccacgttcc cactgcgcgc 35820
tgttccgcca ctccccgcc ccccagggcg agtcctcgt gcgctcgag tactgccgca 35880
cgagcaggtc gcccgctccc ggagaggccc cagcatcacg gcccgtaag gtgctccgga 35940
tcggtggtgg ccgtgtgaa ccgccacgcg ccgcccggct cgtcggcctg gccatcgccc 36000

ES 2 533 437 T3

ggctgtgtcc cgctcaggat gccggggcgg tcaggacggc cttggcagcc agccggaaat 36060
 tcctgatcat cggattcggg tcgcccttgc gggtgaccag gacgacccgg ctgggggggag 36120
 cgccctcgac cgggacggtg acgaggtcgg gacgcagtga gctgcgccga tcgccgaccg 36180
 gtagcacggc gatggccctg ccgctcgca cgagttcgag cttgtcctcg tagctctcga 36240
 tcggcggcac gccgggtccc aggaactggg aggaagccca gcctgcggtc tcgaacgcac 36300
 acggcgccgc ctcttcggcg gccagttctt ccgcggtcac cgacgcggcg tcggccagag 36360
 gatggccggc cgggaccacg agcatccggg gctcctcgta cagcgggggt gtgaacacgt 36420
 cgtcggcgac gagcggcagc ggggcccgcg cgatcagggc gtcgacgcgc ctgtcggaca 36480
 gtgccccgac gtcgcgggcag tgcagatgcc ggggtggcgat ctcggcgtcg gggtaacggc 36540
 ggcgcagttc ccgcacggcg gcagtgatca ccaggtcttc gacgtagccg atggcgattc 36600
 gttcgggtccg ggcttgttca cgcacggcca gctcggcctg gcggggcgcc cgcagcaggg 36660
 cctgggcccg ggggaggaac gtccggcccg ccggagtgag ccgggtgcc tggggggtgc 36720
 ggtccagcag tcgtgtgccg agatatttct cgagccgttg gatctgacgg ctccagcggc 36780
 gctgggctac gtgcaggtcg gcggcgccc gcccgaaagt ctggtgcgcc gccaccacgg 36840
 tgaagtagcg caccagccgc agttccaggt cctgcccagag atcgttcacc ctccaggggt 36900
 acgcgtcatg ccgtttcgga atggtcagat tgccgaaccg gtcttgagcg gccatgccgt 36960
 cccgggcttt gactgaagga gcaacgtttc cccgagaaag cgacaggcgc gatgaaggcg 37020
 atccagatcc acgaagcggg tgggccgga gttctgcggg acgacgaggt gccggctccc 37080
 gagatcggcc cgggcgaggt gctcgtccgg gtgcacgcgg cgggcatcaa cccgccggac 37140
 tggtagctgc gtgaagggat gaaggtcatg ccggccggga tgaggccggc gctggagttc 37200
 cctctgatcc ccggaacgga catgtcgggc gtggtccagg cggtcgctcc ggacgtgccg 37260
 gggttcggcg tcggcgacga ggtcttcggc atgctcgggt tccccgatt cgacggcccg 37320
 acgtacgcc agtacgtggc cgcgccggct tctgacctgg ctacaagcc ggccggatc 37380
 gaccacgtgc aggcggccgg ggcgccgatg gccgtgctca cggcctggca gtacctggtc 37440
 gacctcggcc acgaggtgcc gtctcctttc accggccagg tgcaccagcc ggtgccgatc 37500
 acgccgggga tgaccgtgct ggtcaacggg gccgccgggt gagtgggcca tttcgcggtg 37560
 caattggcga aatggaagg ggcacacgtc atcgcgggtg cctcaagtcg gcacgagcgg 37620
 ttctgcgcg agctcgggtc cgatgagttc atcgactaca ccacgacgca ggccgcggac 37680
 gtggtcagcg gtgtcgacct ggtgatcgac accgtcggcg gcccgacgg ctccagcttc 37740
 ctgaccgtac tcaagcggcg cggcacctc ctcccgggtg tcttcgccga gtacgacctg 37800
 gaagagacgg cgagtctgga catcaccgtc tcgaacattc aggtacgttc ccacggcccc 37860

ES 2 533 437 T3

cagctcgccg agatcgggcg cctgttcgac gagggcacac tccgggtcgg ggtggacagc 37920
 acctacccgc tgtccgaagc ggtcagcgca cacacgcgag ccgcgaggg ccacatccaa 37980
 ggcaagatcg tgctgacggt ggcctcgtga tcgccgaaac tccagcagge ggtggcgaac 38040
 tacgcccacg ccttggacga gttgcatata cccgagctgg aaacggtoct ggccgaagac 38100
 accacctgga ccgtcacgat gcccgacag gggatgctcg gccccgtcgc cggacgcgcy 38160
 gccgcggcgg tgctcgactt catcttcac ccccggtgca gctcggtag cgggtgcca 38220
 gaccggcccg ggacctcagc agttgccag ccgacccgat gagcgogggc gccgagttgc 38280
 ccgcgagcag ccgcggcgc atcttgacgg gcaggcccag tcgcgctgcc gcgtcggatt 38340
 cacgcccgtt tcctcgggtc gctgtcggcc aagtcagcgg tcattgtgcc acccgtcca 38400
 cttcgggaaga cgctgaccgc cgctccccg atcctggatg cggcggcttt cacggcacgc 38460
 tgctccgctg ccgtgccgac gaggtctccg gacggctgag ccgtgctgcy catgccgcgc 38520
 cgctcggcy accgatcgc gcgcagcgc agatgcgcc gactttcgc acggcaaggg 38580
 cgtccgcgac ctcccggacg acacgcttcg cgtcgtcggg gctgttcacc acgtcggtc 38640
 ggttcatgtc gatcacgagg acatcgtcg cggaatagtg ctcgtgcacc cagtcgtcgt 38700
 acccgccca aagcgtccgg tagtactcga cgagactttg gtccctgctcy aagtcacgcc 38760
 cccgcagtcc gatgcggcgc agcaccgtct cgaagtccgc tctgagatac accatgagat 38820
 cgggtgcctt gcgatagggc aggcgcgcga tctcacgcat catctccgc agcaaccct 38880
 cgtacacctg catctccagg gaactgatcc tgccgaggtc gtgattgact ttggcgaagt 38940
 accagtccctc gtagatcgc cggtcgagga cgttgcgctc ctgtttgtac gcctccttga 39000
 tcgcggcgaa tcgcgtctgc aagaagtaga gctggagaag gaagggatag cgcttcgcgc 39060
 ctatctcctc aggaccggcy gtgtagaaga gcggcaggat cgggttgcct tccacgctct 39120
 cgtagaagac catgctcccc agctctttgg cgatcagctc ggccacgctt gtcttcccga 39180
 tcccgatcat gccgccgacg cagatcactg ccatacctcg ctctttccc gggacaccgt 39240
 ccgcgggcgc gattcccgc caccggctct tccacggcac acgcaccgcc gcggagcgc 39300
 gtcgtggaag cccccaggc gcaggtgacg agcctggcct ccgtcggacg accgaagcgg 39360
 catcatatcg gcacggagg gtgttcgaat ctacgtgctc gtgccctgga tggaaagcgc 39420
 tgggtcaccg gtagcggga tcatcggagg tgatcatgta gcgggtgggc ggaacgacgc 39480
 ggaacgacg agtggtggga caggggccac tgacgcagct atccgcagcc gcgtggagt 39540
 cggcgacctc cacaggttca ctctcaccgg tgaccaagga aagatcgcce gcatgccagg 39600
 ctgcgccgct cctccccgga acagcgcgta caccgatcag gagaacgacg ccgcgacccc 39660
 gagcgagcag ccgagcctgt gtggacgccg aacgtgtcgg ttaccactcg acgaccagcc 39720
 ttgacacacc gcgcgtcgc aggcctccc gccatacagg ggcctcgtcc cccggtgcga 39780

gtcgcaggcc ggggaagcgc tgccacaagc gggtcagcgc gatcttcac tggagaagaa 39840
 ccagtggcgc gcccatgcac cggtgggcgc cgtgtccgaa tgtgaggtgt gcaggccggc 39900
 gggcgtgct cttcgcaccc gatgtgcaaa atacttcggc gtcattgattg ccgtgcagca 39960
 acgagacgat gacggcctct ccttggcgc caagtcgtccc gccaggaca aggtcctcga 40020
 tggccactcg gggaaaactg ataggtgtgg acggcgtctt gcggagcagc tcctcaacca 40080
 gatcctccac ggattgcccg tcgagcgcgt caccgggtgag cagttcgagt atggcaaggc 40140
 tcaattgatg ggcgggtggtc tcgtaaccgg ccatgagaag tgccagtccg aggttgatca 40200
 actcgatgcy ggatatctca cccgactgct caaccgcac cagcgcgctc aggagatcct 40260
 gcccgggcgc atccctcttt ctttcgatca gtgaggacat gtacttgata agagtcagga 40320
 tatggcggcc tcttctgcgg gttccctgag gcgtcatgtc gaacagcgc caacacggcg 40380
 cgtcgaaaac gggccgctcc gccgccggca cggcagcagc tgagctcaac gcgaccatgg 40440
 gaaggggcga agcataaccg ctgaccaggt cggcgcctgg ccccgcaacc tgtagccgat 40500
 ccagcagtgc gtcggcggcc tcctcgatca ccgctgcctg tgcggtgact cgggcgctgg 40560
 tgaacgctgc tccggcgacc cggcgcagcc gggcgtggtc cgcaccgtcc agactcatga 40620
 tcgagttggg tgagaggtcg acggatcccc atttcggagc atcggggtgg gtggccgcag 40680
 ctctgctgag acgtgtgtcg gcgagcgcgg cgcgccccac ggcgtagtcg gtgaccagcc 40740
 acatgtgatc accagtgggc atccgcaccc gtttgacggc ctacttgat ggcgctgccca 40800
 ggaagggcgg cagggggccg accctgtggt gatcgaaagt gccggacatg gtcgattact 40860
 cctgttcggt cggaaacgcc gcggggtgct tgtctcccct gccgccgacg gccgtgggag 40920
 acgaccatc ggggtggcggc cgggtcgggc gagcgggctt tttccaccgc ccggaaggcg 40980
 gcccgctggt cggctctgcac gctgttcggg ctgcccggct tcggcggaca gaccggcttt 41040
 ggcggacaga ccggctgccg gatgttcgtc acgtagcgcg cacggtgtgt tcctgcctc 41100
 tcagcgcac cgcgcgtcgc ggcctgacgc gttggacgcc tgtggtctca gccgagcgtg 41160
 ggcaccgaac tgctcggcc cgtcgacctg cgctctgcgg gacaggacga ggtcccggag 41220
 tcgctgtggc agggcgtcgt caaagcggag gtggtccggc accgtgacgc cggcgttgcg 41280
 cagcggcgtc gcgatctcgc ggcaggtggt gctgagccag ttgaggaccg cgggatctcc 41340
 cgagcggccc gcgaccggcg tccaggtggc cacttccggc tgccggaggc cggcgtcgag 41400
 gaacgtccgg gtgagggcgg ggccgaagtc ggggacggcg ccggccgcca ggaaggggccc 41460
 gggccacagc gcgtagtact cgtcccactc cggcagcggc ggacgtgacg gcgacgtggt 41520
 ggtgaagtcc atctcgtgca tgacgacgat cccgtccggt ttcagcaggg acgtcagacg 41580
 gcgcagtgcg gatgcgggat cgggcaggtc catcaggatg tacctgccga ccaggacgtc 41640

ES 2 533 437 T3

gaacttcatac ggccaggtga agtcggccag gtccgcggct tcgtaccgca ccgagtccgc 41700
 gagccccgcc tcctgtgcca ggatccgcgc cttgtggacg gttccgggggt cgcgctcgat 41760
 tcccacgacg tgtccgccgg gcccgaccag ttgggcggcc agcagagaga cgtatcccag 41820
 tccggcaccg atgtcgagga cgctcatccc cggacgtact ccggccgacc gcaggggtgcg 41880
 ttcggtgaac ggcgagatcg cctcgttctg aagggtcagc ctttggtgct cgctatcgga 41940
 gtaaccgagc aggtatgctg cgtgcccatt gcgaggcctc cagggccgggt cgtgcgggga 42000
 gttccccacg gcaggtggcc agggggctcc gcggtgtctg gagcaactgag tgccctgtag 42060
 cggccgtgcg gtgtggtccg gtgttccggg tatgtcacgc accggagcgg gacatgtacg 42120
 tgtccgaagc cggcggggcg cgcagagcct tgccgctgga ggtgctgctg atcccgccgc 42180
 gccgcacgaa ctcgatcgtg tcgggtgtga tgcccagctc ggccaccaca cgtgcgcgga 42240
 tgtgttgctg cgtggcacga cggctcgcct cgtcgtgccg cgtcgtctcg acgacgagcc 42300
 cgaggcggcc tcctcgtcg ctccagatct gctcggccag gacgcctggg acgaggaggc 42360
 cgggtgtgtc ccgcacgacc gcctcgatgt cgctcgccca gtggttcgcg ccgaagacga 42420
 tgatcacctc tttcgtgctg cccacgatgt acagctcgcc gtcgtgccac aggcccaggt 42480
 caccggtcgc caaccagccg cccggaagga ggacgcgacg gctctcttcg ggggtggcgg 42540
 cgtaccggtg gctcgtgacg gacgcccccc ggacctcgac ggcgcccacc gtgccgggca 42600
 cggccggtgc gccgctcgcg gtggtgagcc ggacctcggg acgcccacc ggcttccca 42660
 cactgaccag ttcgcgacac ggcccggcgc cggacggcac cggtaactaa cggccccgg 42720
 tcagttcgtc ccggtcggca cgcagcacct tggccggggc gccgagggga gggaaaggcga 42780
 ccgccagggt cgcctccgcc agtccgtagg ccggcaggaa gacgttctcg gacagtccgg 42840
 cgggcgcgaa acgctcggcg aaggcgtcct gaagccgccg gtcgaccggc tcggcgccgt 42900
 tcaccgcgat gcgccagcgg gagagatcga ggccggccgg cggcgcccg tccgcccctca 42960
 ggacgtagcg gtagccggag tcaggagcca tgggtgaaggt cggccccagc cggcccatgg 43020
 cccggatcca gtcaccgga ctgctcaggt agtcctccgg tgtcagcaga tggatgtcga 43080
 cgtcgtgacg cagcgggtgtc aagaaggaac cgatcaggcc catgtcgtgg aagaggggca 43140
 gccaggtgca gccgacgtcg gtcttgccga gccgtgtgcc atgggcgatg gccgccacc 43200
 cggccgcccac gttgccgtgg ctgagcacga cggcccgcgg ttcgctgctc gtgcccagc 43260
 tgtactgaac gacggccggg tccgacgccg cccgcgcgac gtgggcccgg gacggctcgg 43320
 ccacctccgg caccaggagt acgtcgaccg ggcggggcgc gtcggacagt ccaggaccga 43380
 gcagcgggcy catggccgga gccgtcagca cgggtccgtac ccgagagcgg cgcagggccg 43440
 cggaggtgcy ccggagatag gcgtcggacg acccgaaggg cgcgggaccg ggcagcggca 43500
 ccgcgaccgc gcccgccgcc agcacgccga agaaggcgcg cgcgaagtcc accgacgtcg 43560

gcaggacgag ggcgacccgc tcgcccgggtc gcacccccgcg cgacagcagc cccgcggcca 43620
cccgcccggc ctccggcgaag aggtcgtctgt aggacagcgc gtcgccgtcc tggccccggc 43680
gcagcacgtg catgccccgt ccggagcctt gtgcccgcgac gcggccgagc gcggcgaaca 43740
gggtcacgac agcggttccg tgcccggcctc cgcgatcacc ttggtgatcg cggccgcgaa 43800
ctcccgcacg gtgctcgtct cgaagacgat gcggtcctcc acctcgtatgt cgtagtgtctg 43860
ctcgatctcc agcacgatct ggagcgcgtg gatcgagtcg aagcgcggca aggagcgcag 43920
atcgggtgcc acgcccacct cctcgacacc gatgocgagt tgctcggcga cggatcggcg 43980
gacggtctgt tcgatgtcgg tgacactcgc ctgtgacatg gcgtggtggt gtccctgttct 44040
gtgaggccgg cgcgtcgggg cgcggcggga ggcggacgcc gggactgacg gtcagcgcagc 44100
gccgggcccgg cgggcccagg cgcgcagctt ggctttgatg tcccgcgggg tctccaacga 44160
gtcgtcgtcc gccaggagcc ggacgatcga catcaccttg gcgtccgcgg cgtccaccga 44220
gtcgtgctgg atggtctcga tacggcggat gccggcccgtg gatgtggaat gcgggtagaa 44280
catgcccgcc ggggtgcttga cgccttgct acgggtccgcg agccagatgt aggccatgcy 44340
cagcgcggcg gcctgatggg ccggatcgtc gtgcacagt tcccgcataga agacggagaa 44400
cgcacggcag tgcccggcct cgtcgcgggc caggagcccgc cagattctgc ggatcaccgg 44460
ctccgacaca tgggcggcga gcgccttga gagggcggac gcgcgtgact ccgagatcac 44520
gttcatcatg aggggtggcg agcgcacgtc gccctgcgga tacggctctc gttttagag 44580
cgcgtgcttc gaacggagtg agaccccgat ccgggtccagg tagcgggcct ggaccagtga 44640
gtgccgggat tcctccgcac ccattgcag tgcccaggag gagaagctga cctcgtcctg 44700
ccattcccgc aggaagtgt gagcgcggg taggggtgccg aactcgtatga cggccgcctc 44760
ggtgaggaag tccacgggtcc gttcgtcagc catgcccgtc tcgatgcccgt ccagggtccac 44820
ctcgggtccag tcccagcgcg tcgtctcga ccagtcgaag atcttgttga aggtcatgtc 44880
gaggtagtag tcggtgtaga ggtcgtccgt catcagcgcg cgggtgcgcc gcagggccag 44940
ttcgaccgag gtggtgaacc cttcgggcgc caccgcggcg ggccggacga tgtcctcgac 45000
gtccagtgtc tccgcccagc cgggaaccgg gcccgccgta tcggggcccga cgacgtacac 45060
ccgggtccgg ttgaacttcg agtgcgaccg cagcgcggcg acggcgggca gcggctcggc 45120
gtccgccccg atccacaccg ccgcgagctc ggatgacggt tcgaactcgt gcaggtagcy 45180
gtgccagtcg gcgtgtgccg gccgggtccac ggtgacgtcg ccgaaggcgg ggacgggtgag 45240
cctttcggcg ggggagactg cgggtggtggg tgccagcagc gcgatggtgt gcgggggcac 45300
ggagggcgtc ctctctgtcg gtctgcgag gccgtcggcg agcaccttgc cgcgcgttgt 45360
gtggggctcg gctccgtaac acgtgcgtgc cgcgacgtca gagcccccg tactccgcgg 45420

cagggccgag gagtacgggc agcgcctcga tgctgttgct gacgaacgag ggcacggggcc 45480
 gcacgggtcca cgtgtcggac ggggccagcc gcacgtcggg gaaccgggtg aagaatccgg 45540
 ccagtgccgt ctccagctgg agacgggcca ggtgtgtccc gatacagaag tgcggggccgt 45600
 gcccgaagcc gaggtggccg gcctgccgcc ggcggacgtc gaagaggtcc gcgtccggcc 45660
 cgtggtgcmc cgggtcccgg cccgccgagc cgaaggacgc gaggatggct tctccccggg 45720
 ggatcgtctg gccggcgatg acgacgtcct cggtcgggta gcgcatcggg aactggttca 45780
 ccgcgccggt ccagcgcata gtctcctcga ccaccgcact ccacgggacc tccccggcgc 45840
 gggcggaggc cagttgctcg ggggtgggtga gcagcgcgtg gcaggcgttg acgagtacgt 45900
 tgatgacgct ctggtggccg gcgaagaaca tcagcaggat catgccgtgc agttcgtctg 45960
 cggtgagccg gtcgtctccg tcctggcgtg ccgtgagcag gacgctgatg aggtcgtccc 46020
 gggggacgtc gcgacgttcg gcgacgatct cccggagcag cgcttcgatc cgtccgtcga 46080
 tctcctggac ctgttcgggg gagttgttcg tacgggtctg catgccggtg agcacgtgca 46140
 gcagacgccg cttgcgctgc gggatcccca gcaggccga gatgacggtg gtggggatgg 46200
 ggtaggcgaa agccttgccg agatccaccg gccgggtcttc cggccgtgtg gcgagctggt 46260
 cgaggagccc gtcgacgagg cgttccaccc ccgggcgcat ggcctccacc cgttccgggg 46320
 tcagtgcctg gtcgaccagt ccgcgcagcc gccgggtgatc cgcgccgtgc gaattgatga 46380
 cgctgtcggg cgcgacgaag cccatcaacg gccacccgtc cggcacttcg ccgcgggccg 46440
 ctgcctccca gtgcgtgatt cccttggcga ccctgggatc cgtcagcact cggcgcaggt 46500
 cctcgtggtg cggaatcgc caccgccgca caccgccggg gagttggacc ggaacggctc 46560
 tccccgccgc ccgcaggcgg gcgttctccg cgtgct 46596

5 <210> 4
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 4

cagagaattc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtc 37

15 <210> 5
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5

gcgcatgcat gtgccggtgc cggtcgcga gccgcttg 39

5 <210> 6
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador
<400> 6

cctcatgcat ctggaggacg tcgcaggtga attctgggcg 40

15 <210> 7
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador

<400> 7

25 gggcaagctt ctctggctg agctgaaca tcg 33

30 <210> 8
<211> 3994
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Fragmento de ADN

35 <400> 8

ES 2 533 437 T3

cagaggatcc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtcgtt gccgcgccgg cactcggact 60
 ctcgcagcct cacaacgctg ctggccgagg cgggtgtacct cacgtcgcgg gcggtggacg 120
 acgcgctgga tctgctgaag gtccctgatcg cgacgaagct tgcagaccgg ctgcacatcc 180
 tggacggcgg tgctggacgc cacattcgaa aagcgcctgc tcaatacccg cccccaacgg 240
 agacgaggtt gaacgacaag ctccagggcgt ctgagtactt cggttgagta gttctgcca 300
 tgtgaggggc agggccgtcg agacaggctg tgtacacaac gccgcggtgc gcagagcgt 360
 cggcgaagag accagtagcg gtcatctatg aggggatact tcatgtccaa gcgccttgtc 420
 gtctcgtcgc tcgccgtggc cgcagccgtc gttgccggca ccgtggtgtt cgtctcctcg 480
 gccgacgccg ctgtgccggc caagccggag atctcaaagg ccaccgcca ctacaccagt 540
 acggccggtg ggagcgcctc gctcaccttc agcgcaccgg tggccgacaa ctccggaatc 600
 aagagcctgc gggtgctcgc ctggccggcg agttcgggccc ttgcgcccac ggcgggag 660
 atgcgggatg tcgaggaagc cacgtgcaag gcgacttccg cgacggcctc ggtgtgcacc 720
 tacaccgtga agagctcggc caaggaagcc gccgcggtgc ccaagggcgt ctggcacgta 780
 tccgtgctgg ccaccgcca ggaccacgac acgaccttcg cgccccaagg cgccacgttc 840

ES 2 533 437 T3

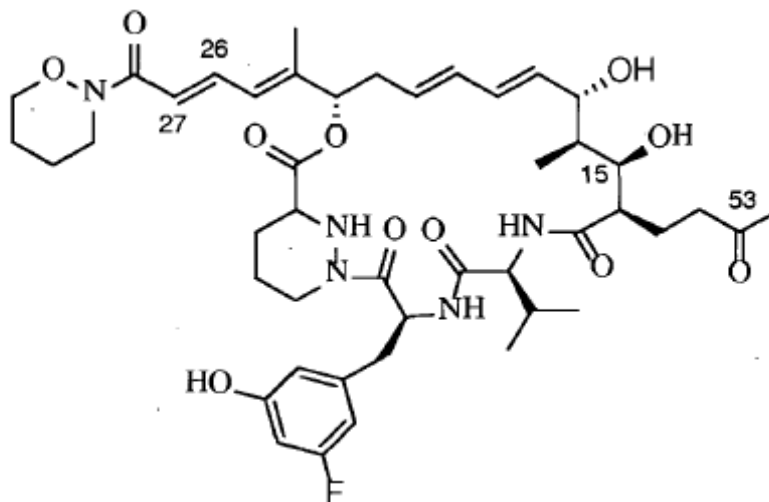
accgtcaagc actgacggct ccgccccgcc ggaatgatga tcgcgccccg cgcgccgggc 900
 ggaccgtatc gcgacctcca ttggaccctg tgaaccgcac gacgoggtga actccgccca 960
 ccctgccccca gggcggacgg agttcacctg ggggcgacgc cgcgcatctg acgcgcgctg 1020
 ccacgatgcc gcaccactcc gcgcgcgggc ggatgcaggc gaagtgactc ccagctcgac 1080
 gcgctcgcca aacacggcat ctcgcgcgac tacatcttcg gcgagaagat cagcaccggg 1140
 gcgcggggca gcccgaagtt ccgggaggag gcgctgaggg cggcgcggga ggtcaaggcg 1200
 cacgccccac actgccgtgt catcttcacg gtgtacgagc ggaagcgggt cggtcgcaac 1260
 gccgccgaac tcaccgccct cgccgaccac ctaccgcccc acggcttggc cctggagata 1320
 ttcgccgggc cctgtcgaag gactcccgga gccgtggaac ccggcgcccc cccgacgcga 1380
 cagcccgcag cggcagttgg ggcgctcccg cgcggcctgc ccggacaccg aaacgcccgg 1440
 caccacaagc gaaagagcgt ccgtcggcaa gctgacgggt cctcatgaag gatttaggcc 1500
 agtgatttgg gacacacccg aacgcgccgg ccggatctga ggaatcgctt agggcccgtt 1560
 cctatcggga acttgaagcc gccctgccga gccaacgctt gactccgggt ccggcgggtg 1620
 ggatgacgat aatttccggg gagtctgccc aaaagggtac atagcgggcg catagaaaac 1680
 tcttgcgagt gctgcgggtg gcttgtaggg tcctaataa tccgctggac aagggaaagg 1740
 tgatgcgggc gtccgaacca aaatagcttc ggacagcaac tgctgccttc tgtcgatgga 1800
 agtaggggga agttcgtgga aatcggctcg ggcgcgcccg aattaaccgc gtcgctcggg 1860
 tatcagcagc ggcgtgacca aatcgccgca agcgtctgcc cctatgtgcc cggcgagccc 1920
 attccagagg tcgagtacac ggacgccgag cacgctctgt ggcgcctggg ttccaagcgg 1980
 ctcgcggacc ggcaccggca catgcatctg gaggacgtcg caggtgaatt ctgggcgtcc 2040
 tgcgacgata catccattga aaaactaatg gcggttgata tatgaccggc ctcgcagagc 2100
 aatcatccac tgcgcagcag agcccggaat cagaagtact ggacgtcacc ggaatcggat 2160
 tcggtgccgc gaatctcgcc ctggcgggtg cgctccatga atccgaagcc gccgggaagg 2220
 cccttttctt ggagaagcag aaggaattcg gctggcatcg ggggatgctc ctggggggct 2280
 cctcgtcca ggtgtccttt ctcaaggaca tcgccacgat gcgcaatccc accagtgatt 2340
 tcggattcct gtcctatctc caggagaagg accggctggg cgacttcac caccagcaca 2400
 ccctgctgcc ctcccggatc gagtaccacg actacctcca gtgggcccgc gaccggctga 2460
 accacctggt cgagtacggc gtggaggcca ccggtgtgcg gccggtgacc gaagccgggtg 2520
 aggtcgtcgc gctcgacgtg ctcgccgggg accgggtggg cgcgccgacc agaaacctcg 2580
 tcctcgctc cggcctgcgc ccccggctgc ccgagggcgc ggagaccggc gaacgcgtct 2640
 ggcacagctc ccagttgctg caccggctgc ccgcgttcga cgaacgcccg ccccgccggg 2700
 ccgtcgtggt cggcgcggc cagagcgcgg ccgaggtcgc cgcgcacctc atggaccgct 2760

ES 2 533 437 T3

acccgcaggc cgaggtgtgc gcggtgttcg cccgctacgg ctacagcgtc gccgactcca 2820
 gcccgttcgc caaccgcgtc ttcgacccgg ccgcccgtgga cgacttctac ttcgccccgc 2880
 ccgaggtcaa gcaggccatc atgcgctacc acggcggcac caactacgcc gtcgtcgacg 2940
 aggacgtcct ccagggcctc taccgccgcc agtacgagca gaaggtgtcc ggcgccccgc 3000
 ggctgcgggt gatgaacgcc tcccgcctgg tgtccgtcga accgcgccag gaatccgccg 3060
 ccgtacgcgt ggagttcctg cccacggggc aacacaccga cctggacgcc gacctggtcg 3120
 tgtacgccac cgggtacgac tccaccgacc cggccgaact gctcggcggc gtctccggcg 3180
 ccctccgccg ggacgaggcg ggggagttgc tgatcggccg cgactaccgg ctccggcacca 3240
 ccggggattt ccggtgcggc atctacgtcc agggcgccac cgaggcgacc cacggcatcg 3300
 cctccaccct gctgtccatg gtggcggctc gcgcgggcga gatcggcccg tcgatcaccg 3360
 gcggccggtg cgacccggac cgctccaccg gaagcaaggc agcagcgggg aacaggggct 3420
 gaagtgtacg aacgtccgct gtaccgggag gattgcgacg gcgtcgtcct ggcgtttctg 3480
 cgacacaacc cactggcaat ggtcgtcacc tcgcacgacg acgtcccggc ggccaccac 3540
 gcgcccgtgc tgttccggca cggacccgac ggcgccgacg ccgaggccgt cgcgcggggc 3600
 accgtcccgc tcgccggctc caccctgatc ggccacatga acgtcgagaa cccgcagtgg 3660
 cgccggatgc gctccggcga ccgggcgctc atcgtcttcc agggcccga cggctatgct 3720
 tcgccgacgg tctacggggt cacgcccgcg gccccacct gggacttcat cgccgtccac 3780
 gtgaacggca cagtggagcc caccgccgac cccgccgccg tgctggacat cgtctccgac 3840
 accgcccggc ggctggagtc cggcttcggg cgcggctggg accaggagtc ctccctcgac 3900
 tacttccgcc agatcgcgcc cggcgtgggc gccttcaccc tcgcggtcga ttccgtgcag 3960
 acgatgttca agctcagcca ggagtctaga gcc 3994

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

5

10

incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C en C26, 27 mostrado como *trans* es *cis*; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un acetal mediante la combinación del grupo cetona en C-53 (si está presente) y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

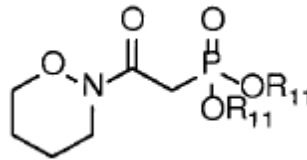
15

2. Compuesto según la reivindicación 1 en forma cristalina sólida.
3. Compuesto según la reivindicación 2 en forma de su polimorfo cristalino de forma I que tiene los siguientes datos de XRPD:

N.º de pico	Posición [°2 Theta]	Intensidad relativa [%]
1	6,2097	6,86
2	6,5031	7,76
3	8,2581	27,43
4	8,4838	33,64
5	9,5994	23,88
6	10,0981	8,54
7	11,0546	29,76
8	12,5883	14,81
9	13,1703	7,1
10	13,9184	100
11	14,2891	13,04
12	14,9759	10,37
13	15,3159	5,81
14	16,8844	18,15
15	17,1816	9,72
16	17,7384	53,03
17	18,1703	9,02
18	18,5613	32,19
19	19,0241	52,81
20	19,4201	5,08
21	20,0954	13,7
22	20,449	63,25
23	20,8962	43,44
24	21,1871	15,02
25	21,6388	16,08

26	23,0029	50,8
27	23,2869	17,19
28	23,6883	17,16
29	24,1071	13,7
30	24,2587	19,55
31	24,9948	13,34
32	25,209	26,16
33	25,9577	10,06
34	26,4298	9,38
35	27,3687	11,1
36	29,0171	7,95
37	29,5603	5,14
38	30,0609	7,35
39	30,5824	6,5
40	32,1814	4,39
41	32,6521	6,74
42	33,5957	6,6
43	34,7946	9,04

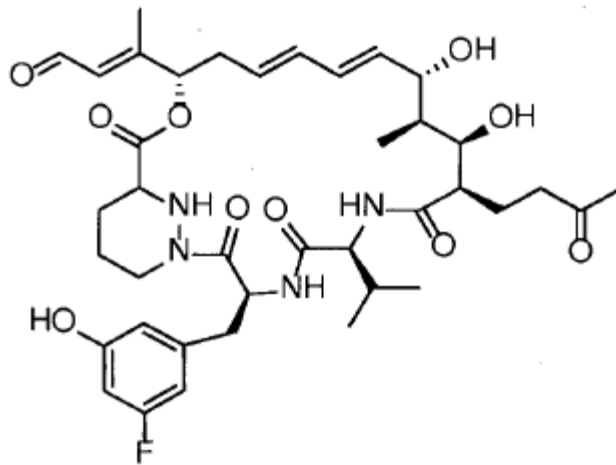
4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como producto farmacéutico.
- 5 5. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como producto farmacéutico para el tratamiento de infecciones virales tales como infección por VHC o VIH o como agente inmunosupresor o antiinflamatorio.
6. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 10 7. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable que comprende además un segundo principio activo o principio activo posterior.
- 15 8. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula (V)



20 Fórmula (V)

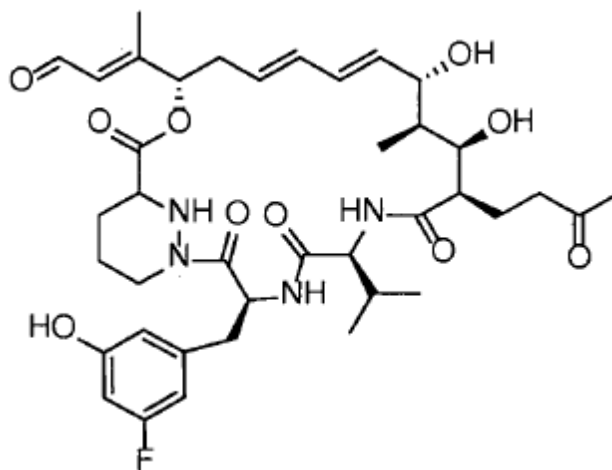
en la que cada R₁₁ es independientemente alquilo C₁₋₄ o bencilo;

25 con un macrociclo aldehídico (compuesto de fórmula VI):



Fórmula (VI).

5 9. Compuesto de fórmula (VI):



Fórmula (VI).

10. Procedimiento para la preparación de un compuesto de fórmula (I) en forma de su polimorfo cristalino de forma I según la reivindicación 3, que comprende la etapa de cristalizar un compuesto de fórmula (I) en metil isobutil cetona.

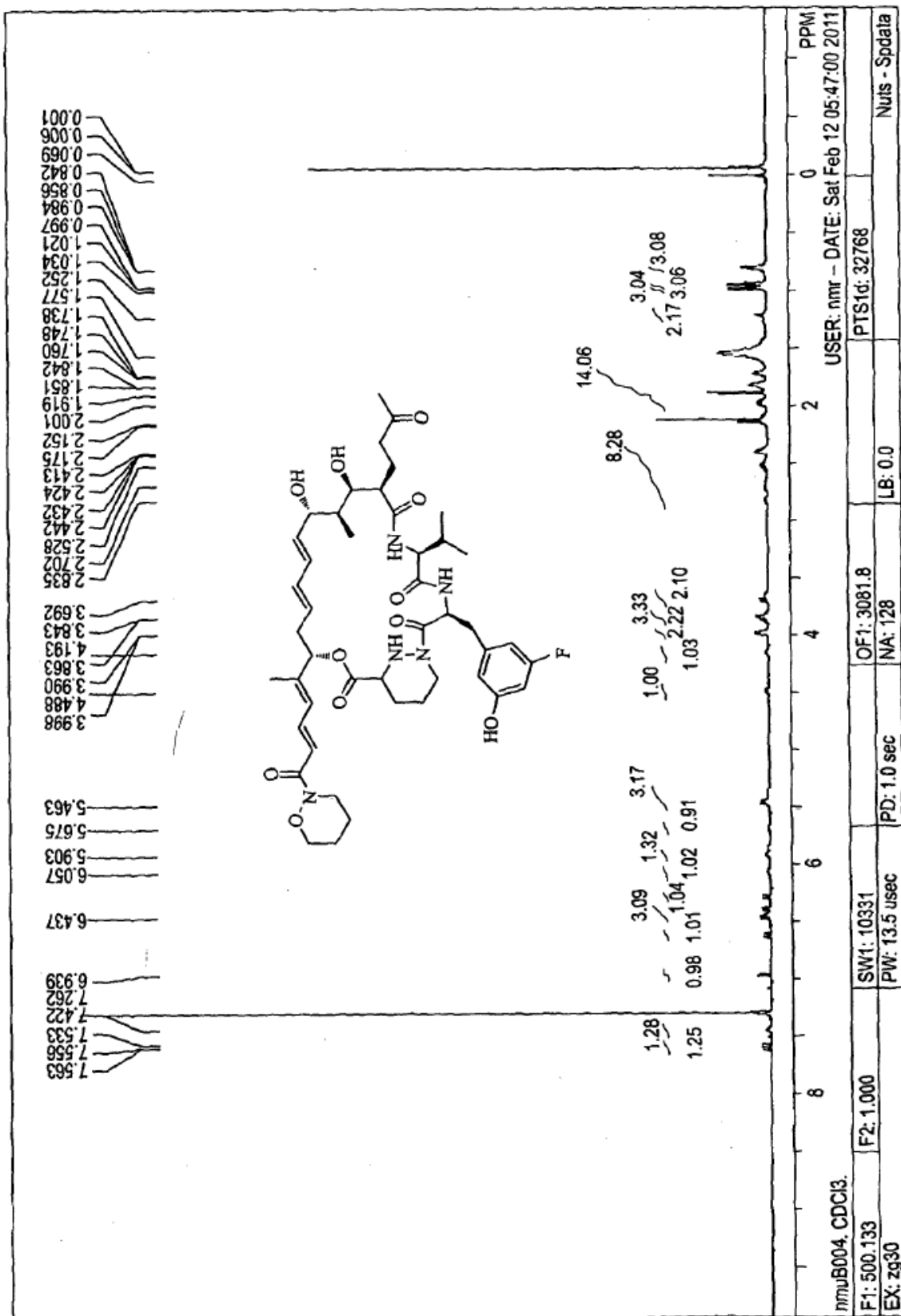


FIG. 1

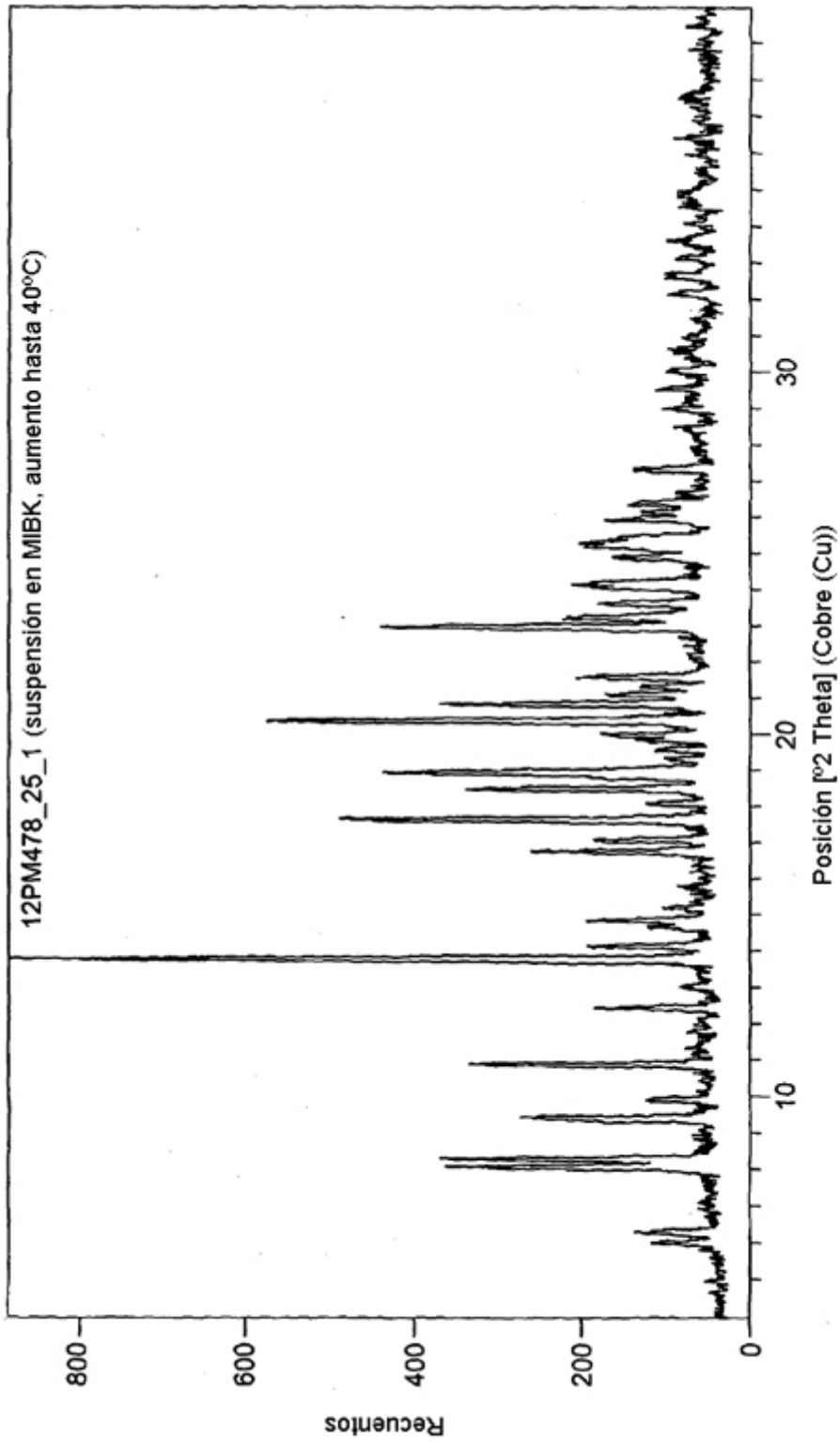


FIG. 2