

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 541 853**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/5025** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2011 E 11704308 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2533784**

54 Título: **Compuestos basados en sangliferina**

30 Prioridad:

**21.01.2011 GB 201101085**

**13.04.2010 GB 201006128**

**09.02.2010 GB 201002097**

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

**27.07.2015**

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;**

**WILKINSON, BARRIE y**

**MARTIN, CHRISTINE JANET**

**ES 2 541 853 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

Compuestos basados en sangliferina

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a análogos de sangliferina, que son útiles como inhibidores de ciclofilina, por ejemplo en el tratamiento de la infección viral producida por virus tales como el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis B (VHB) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La presente invención también proporciona métodos para su uso en medicina, en particular para el tratamiento de una infección por VHC, VHB y VIH, y en enfermedades en las que es útil la inhibición del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) tal como distrofia muscular.

15 **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, 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 de VHC

El tratamiento de referencia (*standard of care*, SoC) actual son inyecciones subcutáneas de interferón- $\alpha$  pegilado (pIFN $\alpha$ ) 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).

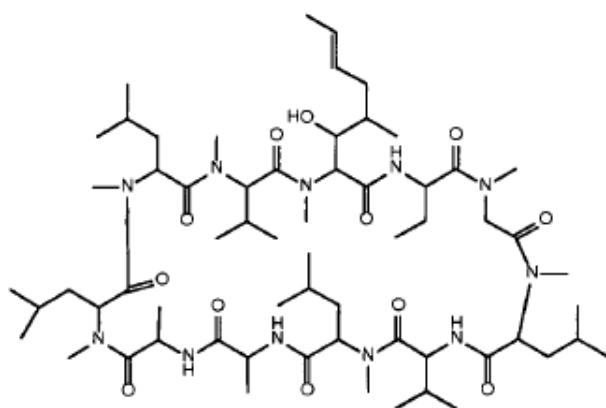
Un número significativo de pacientes con VHC no responden adecuadamente al tratamiento SoC, o no pueden tolerar la terapia debido a efectos secundarios, lo que conduce a problemas frecuentes relacionados con la finalización del ciclo completo. La tasa de SVR clínica global de SoC es sólo de aproximadamente el 50% (Melnikova, 2008). El desarrollo de resistencia es otro factor subyacente para el fracaso del tratamiento (Jacobson *et al. 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 pseudogripal, fiebre, fatiga, enfermedad hematológica, 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.

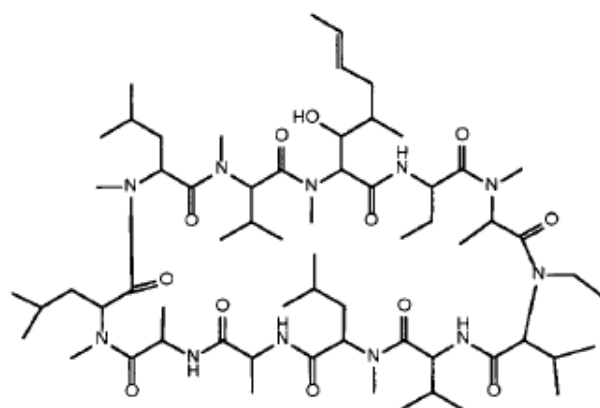
Se están desarrollando fármacos novedosos para terapia antiviral dirigida específicamente contra la hepatitis C (STAT-C) que seleccionan como diana proteínas virales tales como la ARN polimerasa viral NS5B o la proteasa viral NS3 (Jacobson *et al.*, 2007; Parfieniuk *et al.*, 2007). Además, también se 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).

## Inhibidores de ciclofilina

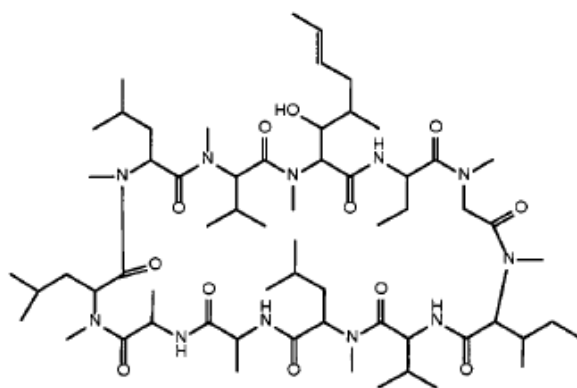
Las ciclofilinas (CyP) son una familia de proteínas celulares que desempeñan una actividad peptidil-prolil *cis-trans* isomerasa que facilita los cambios conformacionales y el plegamiento de la proteína. Las CyP están implicadas en procesos celulares tales como regulación de la transcripción, respuesta 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 PPlasa 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 fármacos para STAT actuales, con el objetivo de aumentar la SVR, prevenir la aparición de resistencia y disminuir los efectos secundarios del tratamiento.



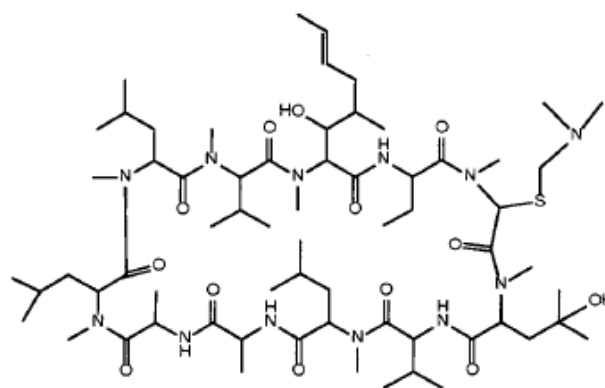
Ciclosporina A, 1



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 (PPlasa) específica,

se sugiere adicionalmente un papel para ambas ciclofilinas en el ciclo de vida viral (Hanouille *et al.*, 2009).

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 conferían resistencia a DEBIO-025 eran diferentes de las notificadas para inhibidores de polimerasa y proteasa, y que no había resistencia cruzada con replicones virales resistentes a STAT-C. Y lo que es más importante, DEBIO-025 también prevenía el desarrollo de mutaciones de escape que confieren resistencia tanto a inhibidores de proteasa como de polimerasa (Crabbe *et al.*, 2009).

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.

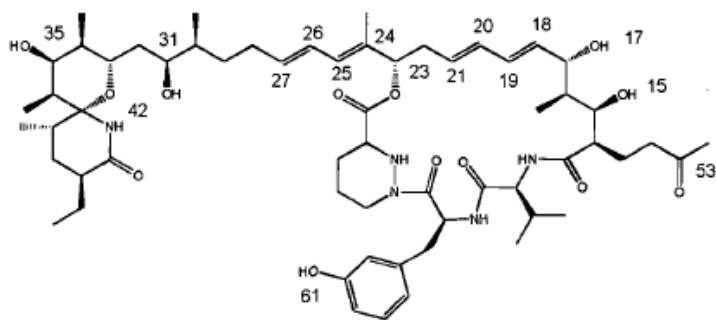
Los acontecimientos adversos (AA) que se produjeron con más frecuencia en pacientes que recibieron DEBIO-025 incluyeron ictericia, dolor abdominal, vómitos, fatiga y pirexia. Los AA más importantes clínicamente fueron hiperbilirrubinemia y reducción en el recuento de plaquetas (trombocitopenia). Peg-IFN puede producir trombocitopenia profunda y la combinación con DEBIO-025 podría representar un problema clínico significativo. 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 antiviral de los inhibidores de ciclofilina en VHC está relacionado con la dosis, una reducción en la dosis ha conducido a una reducción en el efecto antiviral, 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 administraba 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 MRP2/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).

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 (MDR<sub>1</sub>) (Crabbe *et al.*, 2009). También se ha mostrado que la ciclosporina A es un inhibidor de CYP3A4 *in vitro* (Niwa *et al.*, 2007). 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.

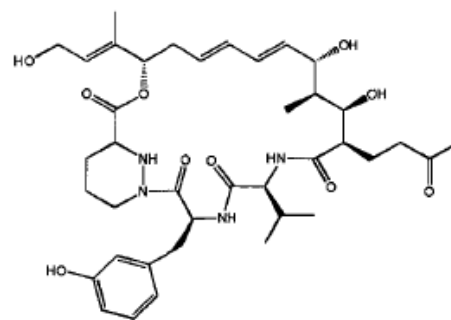
Considerando que la inhibición de ciclofilinas representa un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento del VHC, existe la necesidad de descubrir y desarrollar inhibidores de CyP más potentes y más seguros para su uso en terapia de combinación contra infección por VHC.

#### Sangliferinas

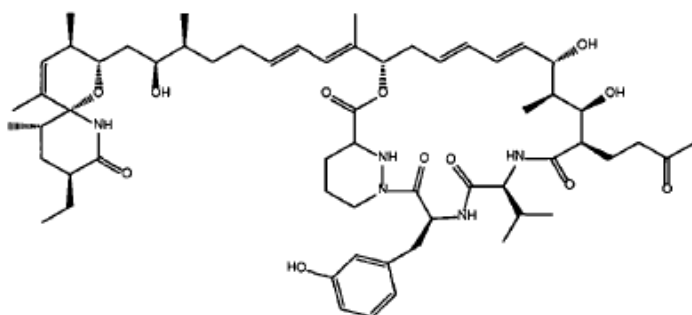
La sangliferina A (SfA) y sus congéneres naturales pertenecen a una clase de policétidos/péptidos no ribosómicos mixtos, producidos por *Streptomyces sp.* A92-308110 (también conocido como DSM 9954) (véase el documento WO 97/02285), que se descubrieron originalmente basándose en su alta afinidad por 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 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).



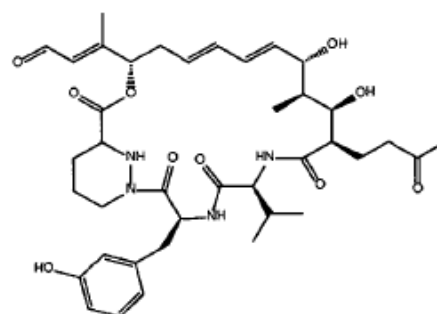
sangliferina A, 5



hidroximacrociclo, 6



sangliferina B, 7



macrociclo aldehídico, 8

5

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 dependientes 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.

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 (hidroximacrocilo) 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 hidroximacrocilo se une al mismo sitio activo de CyPA que CsA. También se ha mostrado 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.

Uno de los problemas en el desarrollo farmacológico de compuestos tales como las sangliferinas son las bajas solubilidades de estas moléculas altamente lipófilas. Esto puede conducir a problemas de escasa biodisponibilidad, una posibilidad aumentada de efecto de los alimentos, liberación incompleta más frecuente de la forma farmacéutica y variabilidad entre pacientes superior. Las moléculas escasamente solubles también presentan muchos problemas de formulación, tales como elecciones seriamente limitadas de las tecnologías de administración y pruebas de disolución cada vez más complejas, con correlación limitada o escasa con la absorción *in vivo*. Estos problemas a menudo son tan enormes que detienen el desarrollo de muchos compuestos (Hite *et al.*, 2003).

Otros usos terapéuticos de inhibidores de ciclofilina

Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

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  $>1$  log<sub>10</sub> 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).

40

## Tratamiento del VIH

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.

## Virus de la hepatitis B

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 ( $CI_{50}$  de 4,1  $\mu$ M), mientras que Xie *et al.*, 2007 describieron cierta actividad de CsA contra VHB ( $CI_{50}$  >1,3  $\mu$ g/ml). Esto es en contraste con VIH y VHC, donde hay numerosos informes de actividad antiviral nanomolar de inhibidores de ciclofilina.

## Tratamiento del VHB

El VHB infecta hasta 400 millones de personas en todo el mundo y es una causa principal de hepatitis viral crónica y carcinoma hepatocelular. Desde 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).

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

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  $Ca^{2+}$ , 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

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).

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 virus, en particular infección por VIH e infección por VHB, distrofia muscular, distrofia muscular congénita de Ullrich, miopatía de Betlem, esclerosis múltiple, diabetes, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, infarto de miocardio y consumo del alcohol crónico. 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: solubilidad en agua mejorada, potencia antiviral mejorada contra VHC, VIH o VHB u otros virus, 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 una

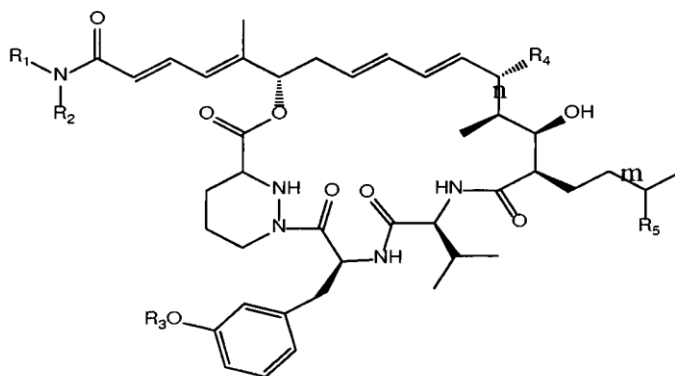
5 dosificación menos frecuente), interacciones fármaco-fármaco reducidas, tal como a través de niveles reducidos de metabolismo por CYP3A4 e inhibición e inhibición reducida (Pgp) (que permite combinaciones de múltiples fármacos más fáciles) y perfil de efectos secundarios mejorado, tal como baja unión a MRP2, que conduce a una posibilidad reducida de hiperbilirrubinemia, efecto inmunosupresor inferior, tal como podría mostrarse mediante un estudio de reacción linfocitaria mixta (MLR), actividad mejorada contra especies de virus resistentes, en particular especies de virus resistentes a CsA y análogos de CsA (por ejemplo DEBIO-025) e índices terapéuticos (y/o selectividad) superiores. La presente invención da a conocer análogos de sangliferina novedosos que pueden tener una o más de las propiedades anteriores. En particular, la presente invención da a conocer derivados de amida novedosos, que se prevé que tengan una o más de las siguientes propiedades beneficiosas: solubilidad mejorada y por tanto formulación mejorada, inmunosupresión reducida y potencia aumentada contra determinados tipos de virus, incluyendo VHC, VIH y VHB.

### Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona análogos de sangliferina macrocíclicos novedosos, que se han generado mediante la modificación semisintética de sangliferinas nativas. Estos análogos pueden generarse mediante la dihidroxilación de una sangliferina, tal como SfA, seguido por escisión para generar el macrociclo aldehídico, seguido por química adicional, incluyendo reacciones de tipo Homer-Emmons para generar moléculas con una variedad de sustituyentes para reemplazar al aldehído. Como resultado, la presente invención proporciona análogos de amida macrocíclica de SfA, métodos para la preparación de estos compuestos, y métodos para el uso de estos compuestos en medicina o como productos intermedios en la producción de otros compuestos.

20 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona amidas macrocíclicas y derivados de las mismas según la fórmula (I) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable de las mismas

25



(I)

en la que:

30  $R_1$  y  $R_2$  representan independientemente alquilo, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alquenicicloalquilo, alquenicicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquilheteroarilo pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

35 o  $R_1$  y/o  $R_2$  representa hidrógeno;

y en la que uno o más átomos de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  que no forman parte de un grupo arilo o heteroarilo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  están reemplazados opcionalmente por carbonilo;

40

o  $R_1$  y  $R_2$  se unen para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por carbonilo y pudiendo estar el anillo heterocíclico opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo;

45

y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo  $R_1$  y/o  $R_2$  pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más átomos de halógeno;

50  $R_3$  representa H o -(CO)<sub>x</sub>-alquilo;

$R_4$  representa H u OH;

R<sub>5</sub> representa H, OH u =O;

n representa un enlace sencillo o doble con la salvedad de que cuando n representa un doble enlace R<sub>4</sub> representa H;

5 m representa un enlace sencillo o doble con la salvedad de que cuando m representa un doble enlace R<sub>5</sub> representa H; y

x representa 0 ó 1;

10 incluyendo cualquier tautómero de las mismas; o un isómero de las mismas en el que el enlace C=C en C26, 27 mostrado como *trans* es *cis*; e incluyendo un aducto de metanol de las mismas en el que se forma un cetal mediante la combinación de los grupos ceto en C-53 e hidroxilo en C-15 y metanol.

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

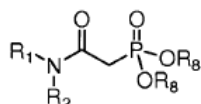
Los tautómeros específicos que se incluyen dentro de la definición de la fórmula (I) son aquellos en los el que (i) el grupo ceto en C-53 forma un hemiacetal con el hidroxilo en C-15, o (ii) el hidroxilo en C-15 y C-17 puede combinarse con el ceto en C-53 para formar un cetal. Todas las numeraciones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

La invención proporciona además un compuesto según la fórmula (I) para su uso como producto farmacéutico.

25 Además, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la fórmula (I) junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de fórmula (I) es para su uso en el tratamiento de infecciones virales seleccionadas de VHC, VHB o VIH.

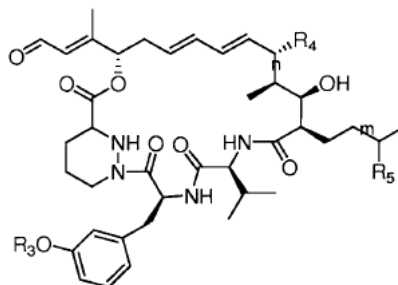
30 La invención proporciona adicionalmente un procedimiento para preparar un compuesto según la fórmula (I) que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula II:



fórmula II

en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y R<sub>8</sub> representa alquilo C<sub>1-4</sub> o bencilo;

40 con un macrociclo aldehídico (compuesto de fórmula III):



fórmula III

45 en la que R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, m y n son tal como se definió anteriormente.

### Definiciones

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.



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 el reemplazo de un átomo por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular).

5 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 composición (como en el reemplazo 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.

10 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*.

15 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 “VHB” se refiere a virus de la hepatitis B, un virus con envuelta, de ADN circular, de la familia viral *Hepadnaviridae*, y el agente causante de la hepatitis B.

20 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”.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término “amida macrocíclica” se refiere a una amida mencionada anteriormente 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.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención tal como los compuestos de fórmula (I) incluyen sales convencionales formadas a partir de sales de adición de bases o ácidos orgánicos e inorgánicos así como de ácido de amonio cuaternario farmacéuticamente aceptables. Los 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. Los ejemplos más específicos de sales básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaina. Las referencias a continuación en el presente documento a un compuesto según la invención incluyen tanto compuestos de fórmula (I) como sus sales farmacéuticamente aceptables.

50 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 C<sub>1-6</sub>. “Alquenilo” se refiere a un grupo alquilo que contiene dos o más carbonos (por ejemplo 2-10 carbonos por ejemplo 2-6 carbonos) que está insaturado con uno o más dobles enlaces.

Los ejemplos de grupos alquilo incluyen grupos alquilo C<sub>1-4</sub> tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo y n-butilo. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen grupos alquenilo C<sub>2-4</sub> tales como -CH=CH<sub>2</sub> y -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término “cicloalquilo” representa un grupo alquilo cíclico, que contiene normalmente 3-10 átomos de carbono, opcionalmente ramificados, por ejemplo ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo o cicloheptilo. Un ejemplo ramificado es 2-metilciclopentilo. “Cicloalquenilo” se refiere a un grupo alquenilo cíclico que contiene normalmente 5-10 átomos de carbono, por ejemplo ciclopentilo, ciclohexenilo o cicloheptenilo. Los grupos cicloalquilo y cicloalquenilo pueden ser por ejemplo monocíclicos o bicíclicos (incluyendo espirocíclicos) pero de manera adecuada son monocíclicos.

65

Tal como se usa en el presente documento, el término “heterociclilo” representa un grupo cicloalquilo en el que uno o más uno o más átomos de carbono del anillo (por ejemplo 1, 2 ó 3 átomos de carbono del anillo tales como 1 ó 2 por ejemplo 1) están reemplazados por heteroátomos seleccionados de O, N y S. Los ejemplos incluyen morfolinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, piperazinilo y N-metilpiperazinilo.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “heterociclenilo” representa un grupo cicloalquenilo en el que uno o más uno o más átomos de carbono del anillo (por ejemplo 1, 2 ó 3 átomos de carbono del anillo tales como 1 ó 2 por ejemplo 1) están reemplazados por heteroátomos seleccionados de O, N y S.

10 Los ejemplos de grupos arilo incluyen (excepto cuando esté indicado) grupos monocíclicos, es decir anillos de fenilo y bicíclicos (por ejemplo, anillos de 9 y 10 miembros) que son aromáticos o (en el caso de los anillos bicíclicos que contienen al menos un anillo aromático). Por ejemplo, un anillo bicíclico puede ser completamente aromático, por ejemplo naftilo o puede ser parcialmente aromático (por ejemplo que contiene un anillo aromático), tal como tetralina, indeno o indano. El arilo preferido es fenilo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos por

15 ejemplo con uno o más (por ejemplo 1, 2 ó 3) sustituyentes por ejemplo seleccionados de alquilo (por ejemplo, alquilo C<sub>1-4</sub>), hidroxilo, CF<sub>3</sub>, halógeno, alcoxilo (por ejemplo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>), nitro, -SO<sub>2</sub>Me, ciano y -CONH<sub>2</sub>.

Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen (excepto cuando esté indicado) grupos monocíclicos (por ejemplo, anillos de 5 y 6 miembros) y anillos bicíclicos (por ejemplo, anillos de 9 y 10 miembros) que son aromáticos o (en el caso de los anillos bicíclicos contienen al menos un anillo aromático) y contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo 1, 2, 3 ó 4) seleccionados de N, O y S. Los ejemplos de anillos de heteroarilo de 5 miembros incluyen pirrol, furano, tiofeno, oxazol, oxadiazol, tiazol y triazol. Los ejemplos de anillos de heteroarilo de 6 miembros incluyen piridina, pirimidina y pirazina. Los ejemplos de anillos bicíclicos incluyen anillos completamente aromáticos tales como quinolina, quinazolina, isoquinolina, indol, cinolina, benzotiazol, bencimidazol, purina y quinoxalina y anillos

20 parcialmente aromáticos tales como cromeno, cromano, tetrahydroquinolina, dihydroquinolina, isoindolina e indolina. Se prefieren los grupos heteroarilo monocíclicos. Los grupos heteroarilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos tal como se describió anteriormente para los grupos arilo.

30 Cuando los grupos arilo y heteroarilo bicíclicos son parcialmente aromáticos, la conexión con el resto de la molécula puede ser a través de la parte aromática o a través de la parte no aromática.

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

Leyendas de las figuras

- 35 Figura 1: A: Perfil de HPLC de muestra de caldo completo recogida de sangliferina A, 5 y sangliferina B, 7, (monitoreado a 240 nm)  
B: espectro UV de sangliferina A, 5
- 40 Figura 2: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 10  
Figura 3: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 13
- 45 Figura 4: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 16  
Figura 5: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 19
- 50 Figura 6: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 22  
Figura 7: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 25  
Figura 8: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 28
- 55 Figura 9: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 29  
Figura 10: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 32  
Figura 11: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 35
- 60 Figura 12: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 41  
Figura 13: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 45
- 65 Figura 14: <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 51

Figura 15:  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 55

Figura 16: Fragmento de ADN sintetizado que contiene una región de homología en el sentido de 5' del bucle reductor del módulo 12 de sangliferina (SEQ ID NO: 1).

5 Figura 17: Producto de PCR con MGo013 + MGo14 con G insertada en la posición 1978 (SEQ ID NO: 4).

Figura 18:  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 144

## 10 Descripción de la invención

La presente invención proporciona análogos de amida macrocíclica de sangliferina, tal como se expuso anteriormente, métodos para la preparación de estos compuestos y métodos para el uso de estos compuestos en medicina.

15 En una realización, el compuesto es un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación de los grupos ceto en C-53 (si está presente) e hidroxilo en C-15 y metanol. En otra realización no lo es.

20 Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  contiene un grupo  $\text{S}(\text{O})_p$ , la variable  $p$  representa de manera adecuada 0 ó 1. En una realización  $p$  representa 0, en otra realización  $p$  representa 1. En otra realización  $p$  representa 2.

Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  representan -alquilarilo, un ejemplo incluye alquilarilo  $\text{C}_{1-2}$  por ejemplo bencilo.

25 Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  representan -alquenilarilo, un ejemplo incluye alquenilarilo  $\text{C}_{2-3}$  por ejemplo -etenilfenilo.

Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  representan -alquilheteroarilo, un ejemplo incluye alquilheterarilo  $\text{C}_{1-2}$  por ejemplo -metilpiridinilo.

30 Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  representan -alquenilheteroarilo, un ejemplo incluye alquenilheteroarilo  $\text{C}_{2-3}$  por ejemplo -etenilpiridinilo.

En una realización  $R_1$  representa alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquenilo, alquencilicloalquilo, alquencilicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo.

35 En una realización  $R_2$  representa alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquenilo, alquencilicloalquilo, alquencilicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo.

40 En una realización  $R_1$  representa arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico.  $R_1$  puede representar, por ejemplo, 4-bifenililo en el que cualquiera de los anillos de fenilo está opcionalmente sustituido.

45 En determinadas realizaciones, un átomo de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  está reemplazado por un heteroátomo, por ejemplo uno, dos o tres por ejemplo uno o dos por ejemplo un/uno átomo(s) de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  está(n) reemplazado(s) por un heteroátomo. Por ejemplo en determinadas realizaciones en el resto  $-\text{NR}_1\text{R}_2$  uno, dos o tres por ejemplo uno o dos por ejemplo un/uno átomo(s) de carbono está(n) reemplazado(s) por un heteroátomo.

50 Si  $-\text{CH}_3$  está reemplazado por N, el grupo formado es  $-\text{NH}_2$ -. Si  $-\text{CH}_2$ - está reemplazado por N, el grupo formado es  $-\text{NH}$ -. Si  $-\text{CHR}$ - está reemplazado por N, el grupo formado es  $-\text{NR}$ -. Por tanto, los átomos de nitrógeno dentro de  $R_1$  y  $R_2$  pueden ser átomos de nitrógeno primarios, secundarios o terciarios.

Cuando un átomo de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  está reemplazado por un heteroátomo, está reemplazado de manera adecuada por O o N, especialmente O.

55 En determinadas realizaciones, un átomo de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  está reemplazado por un heteroátomo de manera que  $R_1$  y/o  $R_2$  representa heterociclilo, heterociclenilo, alquilheterociclilo, alquilheterociclenilo, alquenilheterociclilo o alquenilheterociclenilo.

60 En una realización,  $R_1$  puede representar arilo o heteroarilo sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico, -alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , -O-alquilo  $\text{C}_{1-4}$ , -CO-alquilo  $\text{C}_{1-4}$  o -alquenilo  $\text{C}_{2-4}$ .

Los anillos heterocíclicos formados cuando  $R_1$  y  $R_2$  se unen normalmente contienen 4-8 átomos en el anillo, por ejemplo 5-7 átomos en el anillo, particularmente 5 ó 6 átomos en el anillo.

65 Los anillos heterocíclicos formados cuando  $R_1$  y  $R_2$  se unen normalmente contienen sólo el átomo de nitrógeno

mostrado o uno o dos (por ejemplo uno) heteroátomos adicionales, especialmente un átomo de nitrógeno o de oxígeno.

5 Cuando  $R_1$  y/o  $R_2$  contienen más de un heteroátomo, normalmente estos deben estar separados mediante dos o más átomos de carbono.

Por ejemplo, el anillo formado cuando  $R_1$  y  $R_2$  se unen puede ser morfolinilo o 1,2-oxazinano.

10 Cuando  $R_1$  y  $R_2$  se unen para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por carbonilo y estando condensado el anillo heterocíclico con un anillo de arilo o heteroarilo, un ejemplo es tetrahidroquinolinilo.

15 Cuando un átomo de carbono de  $R_1$  o  $R_2$  está reemplazado por un carbonilo, el carbonilo se ubica de manera adecuada adyacente a otro átomo de carbono o un átomo de nitrógeno. De manera adecuada, los grupos carbonilo no se ubican adyacentes a átomos de azufre u oxígeno.

20 Por ejemplo  $R_1$  y/o  $R_2$  puede representar -CO-alquilo C<sub>1-4</sub> por ejemplo -COMe.

De manera adecuada, un átomo de carbono de  $R_1$  no está reemplazado por un carbonilo.

De manera adecuada, un átomo de carbono de  $R_2$  no está reemplazado por un carbonilo.

25 De manera adecuada,  $R_1$  no representa hidrógeno.

De manera adecuada,  $R_1$  y  $R_2$  no representan ambos hidrógeno.

30 De manera adecuada, los grupos  $R_1$  y  $R_2$  no comprenden un resto C=C adyacente a un heteroátomo. De manera adecuada, los grupos  $R_1$  y  $R_2$  no comprenden un resto C=C terminal que es adyacente al grupo N mostrado en la fórmula (I).

De manera adecuada, un átomo de carbono de  $R_2$  no está reemplazado por ningún heteroátomo.

35 En algunas realizaciones un átomo de carbono de  $R_1$  no está reemplazado por ningún heteroátomo.

De manera adecuada,  $R_2$  representa hidrógeno, alquilo o alquenilo.

40 De manera adecuada,  $R_2$  representa hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> o alquenilo C<sub>1-4</sub>, especialmente hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub>. En una realización  $R_2$  representa hidrógeno. En otra realización  $R_2$  representa alquilo C<sub>1-4</sub>.

45 Alternativamente, de manera adecuada  $R_1$  y  $R_2$  junto con el nitrógeno al que están unidos representan un anillo heterocíclico de 5-7 miembros, tal como un anillo de pirrolidina, piperidina, morfolina o piperazina en el que el nitrógeno en 4 de piperazina está opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>.

50 En otra realización, de manera adecuada  $R_1$  y  $R_2$  junto con el nitrógeno al que están unidos representan un anillo heterocíclico de 5-7 miembros, tal como un anillo de pirrolidina, piperidina, morfolina o piperazina en el que el nitrógeno en 4 de piperazina está opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub>, y en el que un átomo de carbono adyacente a un átomo de nitrógeno dentro del anillo está reemplazado con carbonilo. Por tanto, por ejemplo,  $R_1$  y  $R_2$  junto con el nitrógeno al que están unidos representan piperidinona.

55 En otra realización, un átomo de oxígeno es adyacente al átomo de nitrógeno al que están unidos  $R_1$  y  $R_2$ . Por ejemplo,  $R_1$  puede representar alquilo o alquenilo en el que el átomo de carbono adyacente al átomo de nitrógeno al que está unido  $R_1$  representa O. Por ejemplo  $R_1$  puede representar -O-alquilo C<sub>1-4</sub> por ejemplo OMe. Alternativamente  $R_1$  y  $R_2$  están unidos y el átomo de carbono adyacente al átomo de nitrógeno al que está unido  $R_1$  representa O por ejemplo para formar un anillo de 1,2-oxazinano. De manera adecuada, x representa 0.

60 Cuando uno o más átomos de carbono de un grupo  $R_1$  y/o  $R_2$  están sustituidos por uno o más átomos de halógeno, átomos de halógeno a modo de ejemplo son F, Cl y Br, especialmente F y Cl particularmente F.

Por ejemplo, los restos  $R_1$  y/o  $R_2$  pueden estar sustituidos por hasta 6 átomos de halógeno (por ejemplo átomos de F) por ejemplo hasta 3 átomos de halógeno (por ejemplo, átomos de F).

65 Un resto  $R_1$  y/o  $R_2$  halogenado a modo de ejemplo es -CF<sub>3</sub>.

De manera adecuada, los átomos de carbono de un grupo  $R_1$  y/o  $R_2$  no están sustituidos por uno o más átomos de

halógeno, es decir  $R_1$  o  $R_2$  representa independientemente alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquenilo, alquenilcicloalquilo, alquenilcicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

5

o  $R_1$  y/o  $R_2$  representa hidrógeno;

y en el que uno o más átomos de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  que no forman parte de un grupo arilo o heteroarilo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y  $S(O)_p$  en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de  $R_1$  y/o  $R_2$  están reemplazados opcionalmente por carbonilo;

10

o  $R_1$  y  $R_2$  se unen para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y  $S(O)_p$  en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por carbonilo y pudiendo estar el anillo heterocíclico opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo.

15

Los grupos  $R_1$  a modo de ejemplo incluyen metilo,  $-CF_3$ , etilo, propilo (por ejemplo n-propilo o i-propilo),  $-CH_2CH=CH$  o butilo (por ejemplo n-butilo, t-butilo o i-butilo). Los grupos a modo de ejemplo mencionados anteriormente pueden tomarse por ejemplo junto con  $R_2$  que representa H, Me, etilo, propilo (por ejemplo n-propilo o i-propilo) o butilo (por ejemplo n-butilo, t-butilo o i-butilo).

20

Los grupos  $R_1$  a modo de ejemplo adicionales incluyen ciclopentilo o ciclohexilo. Los grupos a modo de ejemplo mencionados anteriormente pueden tomarse por ejemplo junto con  $R_2$  que representa H, Me, etilo, propilo (por ejemplo n-propilo o i-propilo) u -OMe.

25

Los grupos  $R_1$  a modo de ejemplo adicionales incluyen piridinilo opcionalmente sustituido o fenilo opcionalmente sustituido, por ejemplo fenilo sustituido con fenilo. Los grupos a modo de ejemplo mencionados anteriormente pueden tomarse por ejemplo junto con  $R_2$  que representa H, Me u -OMe.

30

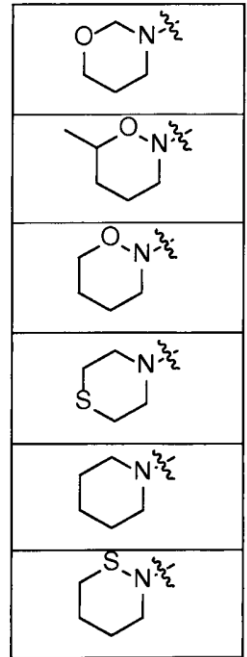
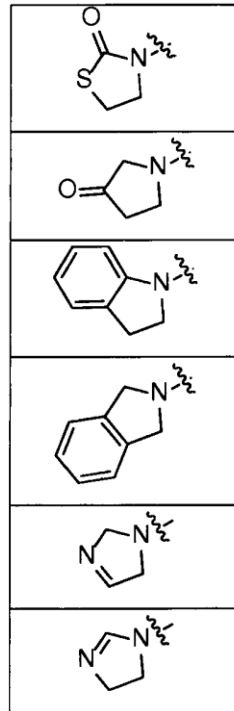
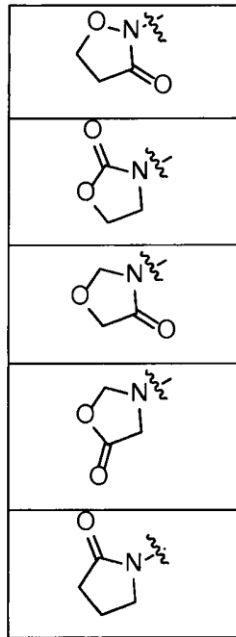
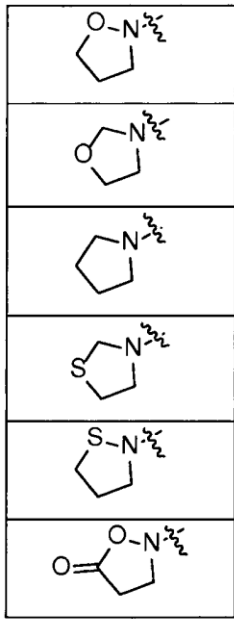
Los grupos  $R_1$  a modo de ejemplo adicionales incluyen -OMe,  $-OCF_3$ , -O-etilo, O-i-propilo, -SMe, O-n-propilo, -O-n-butilo, -O-t-butilo, O-i-butilo,  $O-CH_2C(Me)_3$ . Los grupos a modo de ejemplo mencionados anteriormente pueden tomarse por ejemplo junto con  $R_2$  que representa H, Me, etilo, i-propilo o t-butilo.

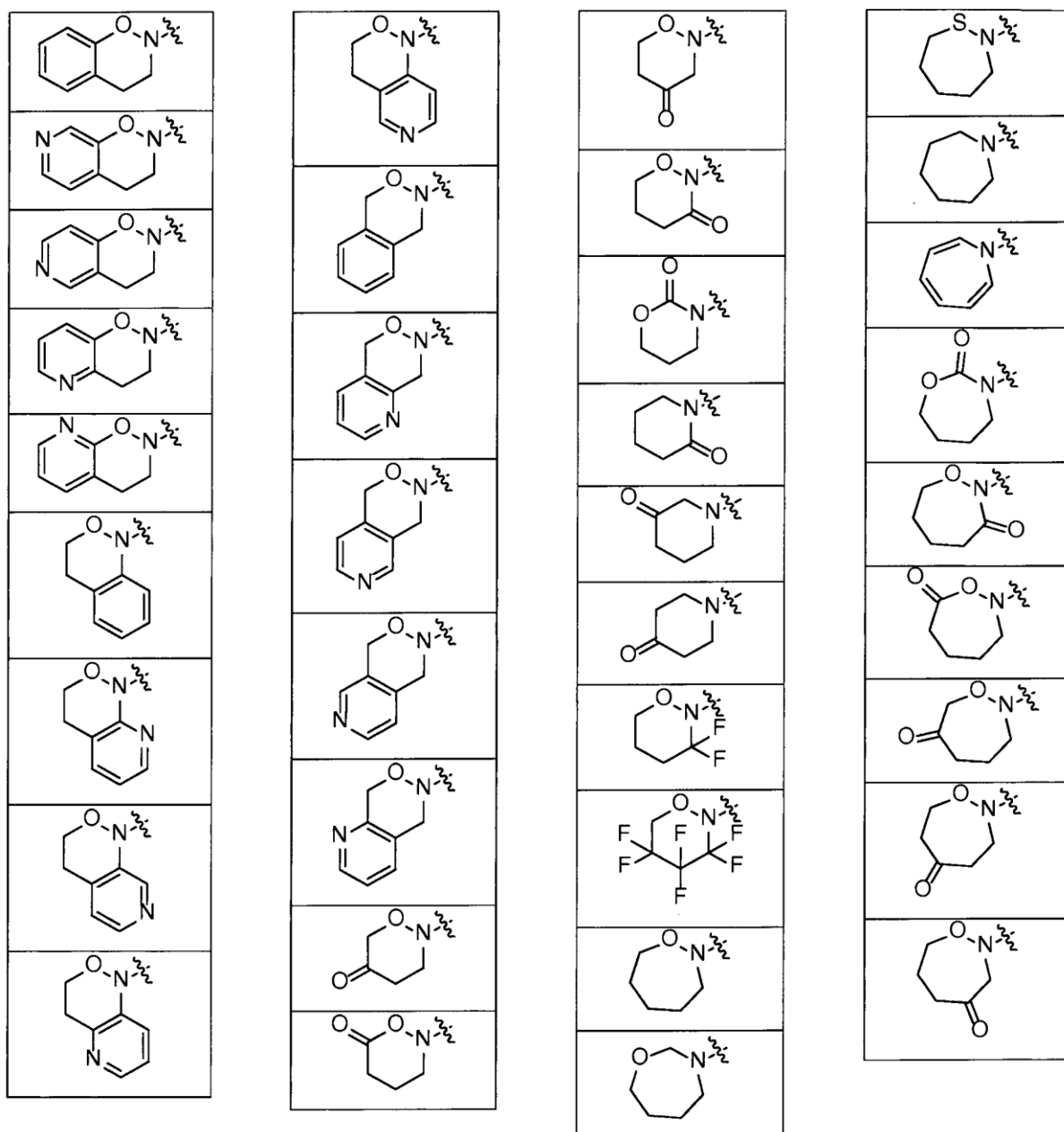
35

Los grupos  $R_1$  a modo de ejemplo adicionales incluyen -O-(fenilo opcionalmente sustituido) u -O-(piridinilo opcionalmente sustituido). Los grupos a modo de ejemplo mencionados anteriormente pueden tomarse junto con  $R_2$  que representa H o Me.

40

Los restos a modo de ejemplo que  $NR_1R_2$  pueden formar juntos incluyen morfolinilo, piperidinilo, pirrolidinilo, oxazinano (por ejemplo 1,2-oxazinano) y los restos dados a conocer en la siguiente tabla:





R<sub>3</sub> adecuado representa H o (CO)<sub>x</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub> por ejemplo H o alquilo C<sub>1-4</sub> tal como H o metilo, especialmente H.

5 De manera adecuada, n representa un enlace sencillo.

De manera adecuada, m representa enlace sencillo.

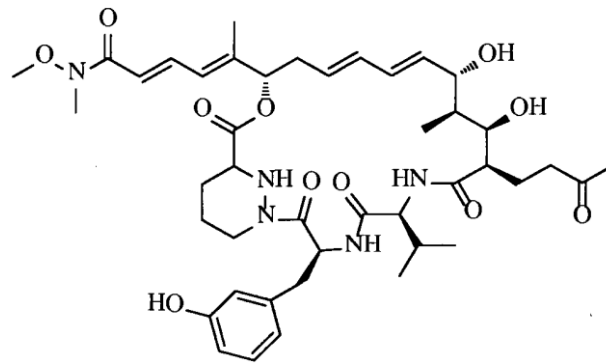
De manera adecuada, R<sub>4</sub> representa OH.

10

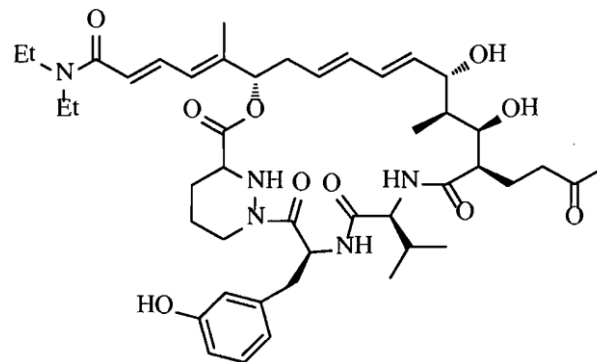
De manera adecuada, R<sub>5</sub> representa =O.

En una realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

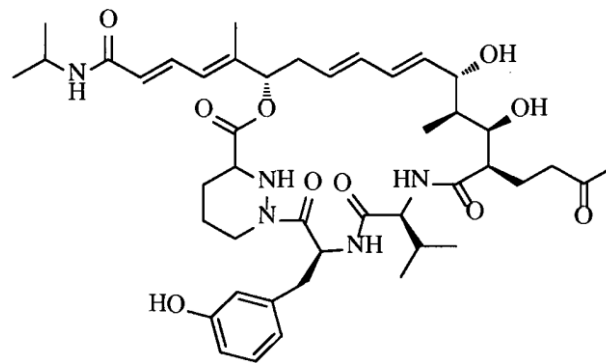
15



- 5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa etilo, R<sub>2</sub> representa etilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

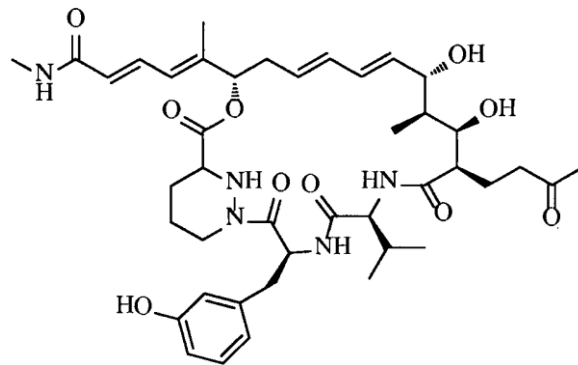


- 10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

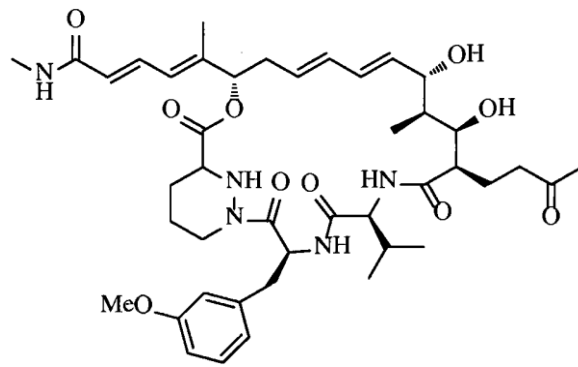


- 15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

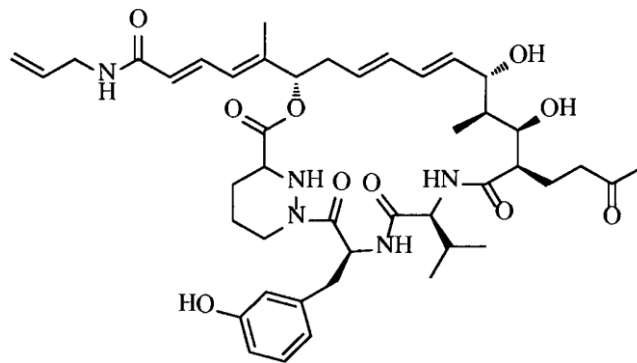




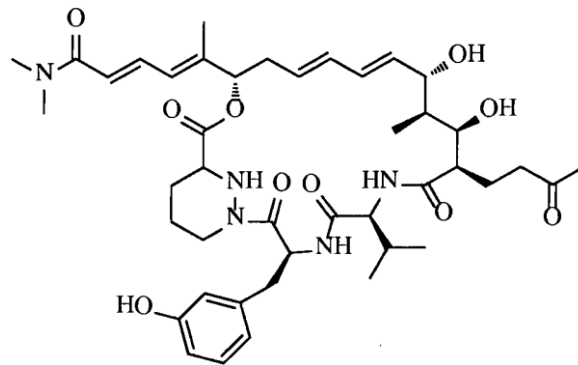
5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa Me, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



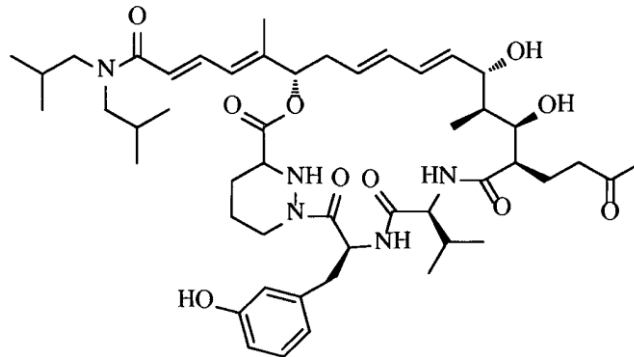
10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



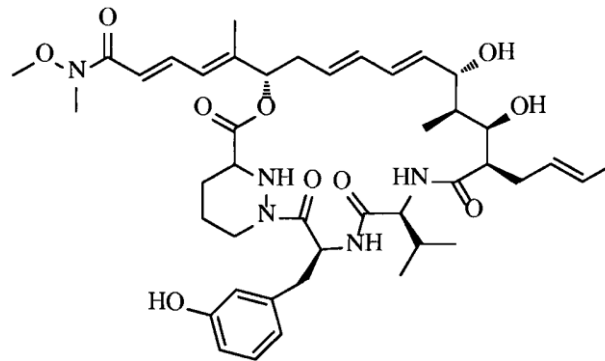
15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa metilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace, m representa un enlace y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



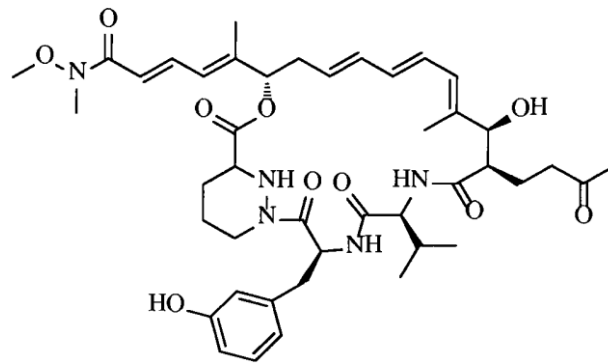
- 5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



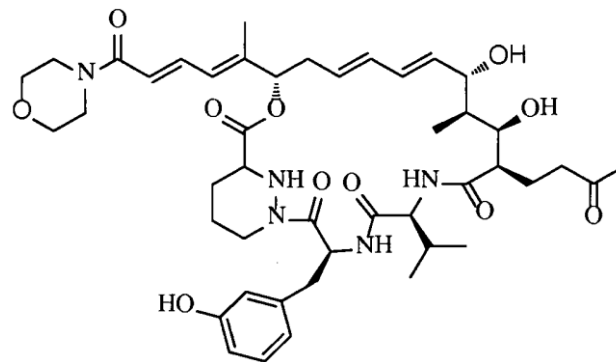
- 10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R<sub>5</sub> representa H tal como se representa mediante la siguiente estructura:



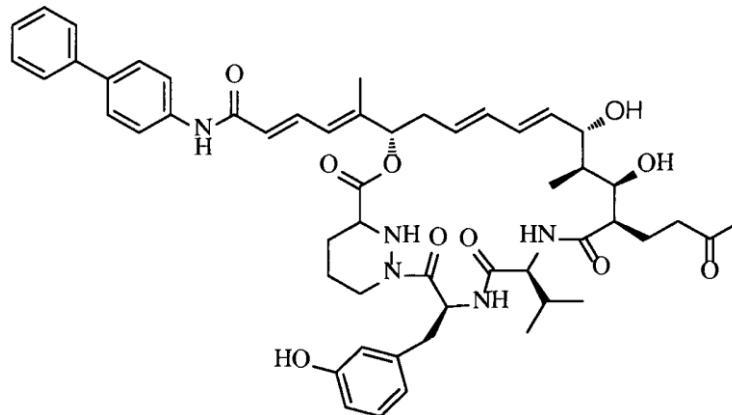
- 15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un doble enlace, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



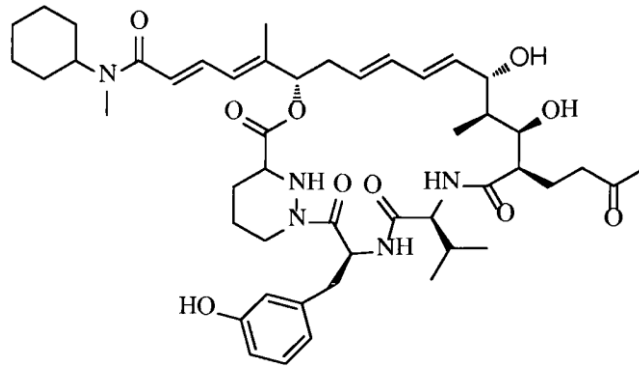
- 5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan juntos -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



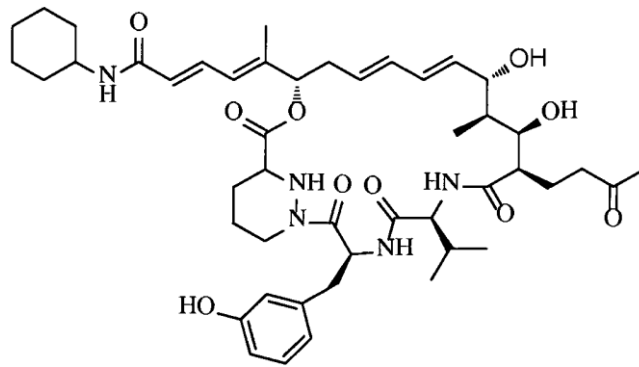
- 10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa 4-bifenililo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



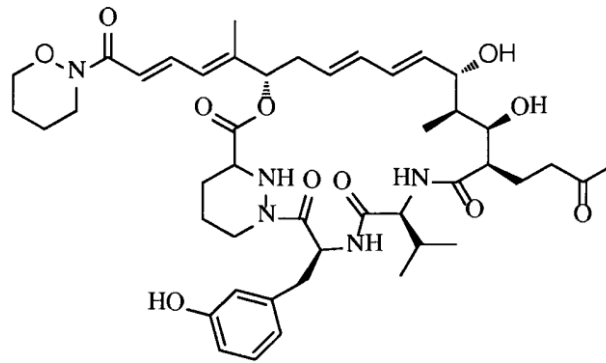
- 15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



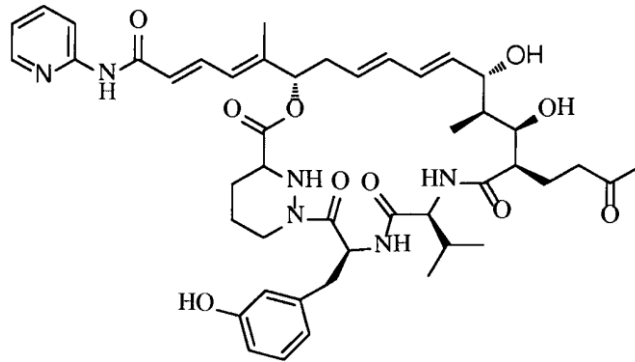
5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



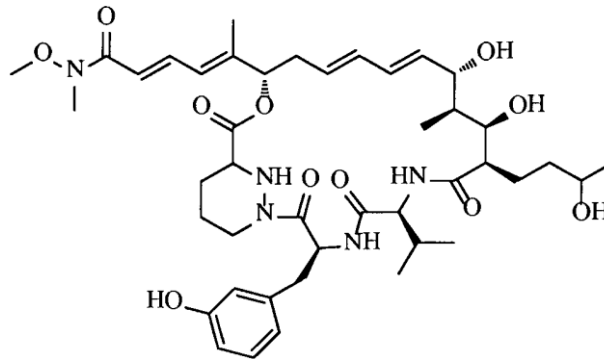
10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan juntos -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros. R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



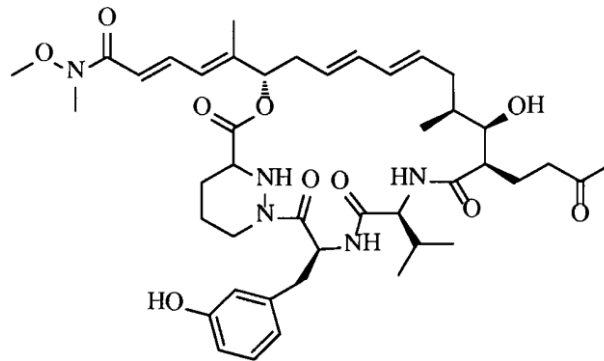
15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa 2-piridinilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



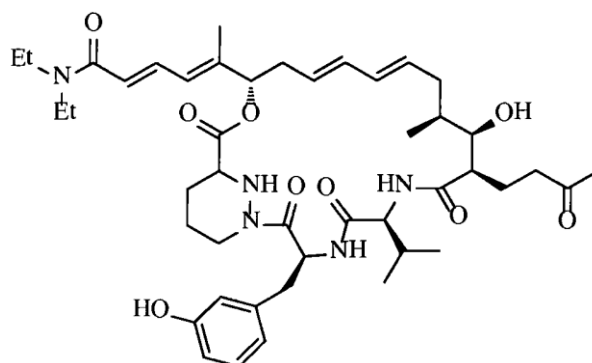
5 En una realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa OH tal como se representa mediante la siguiente estructura:



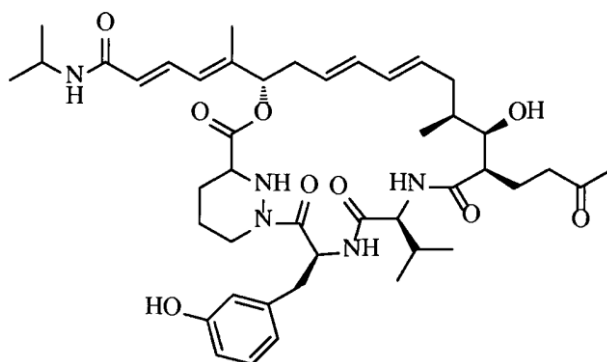
10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



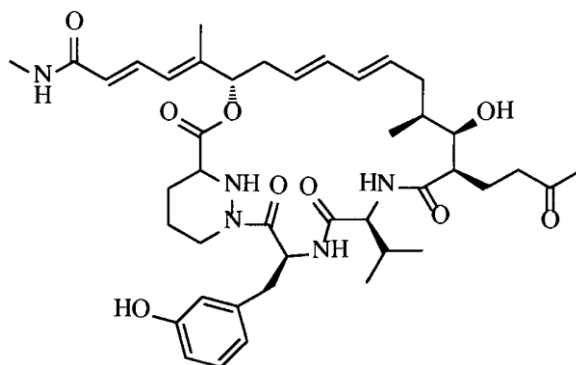
15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa etilo, R<sub>2</sub> representa etilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



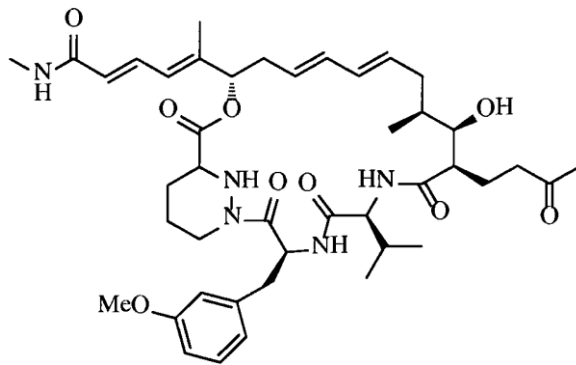
5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



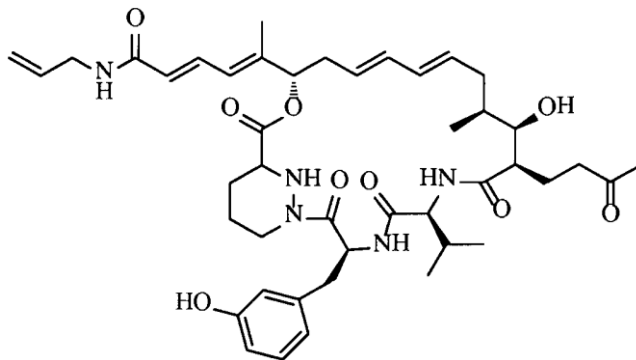
10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



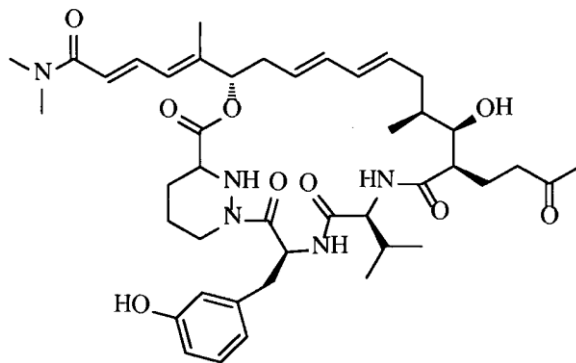
15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa Me, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



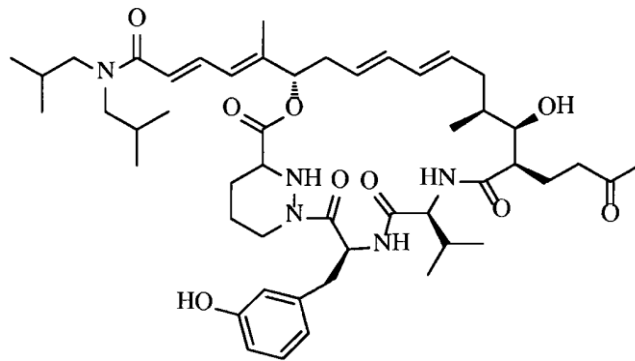
5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



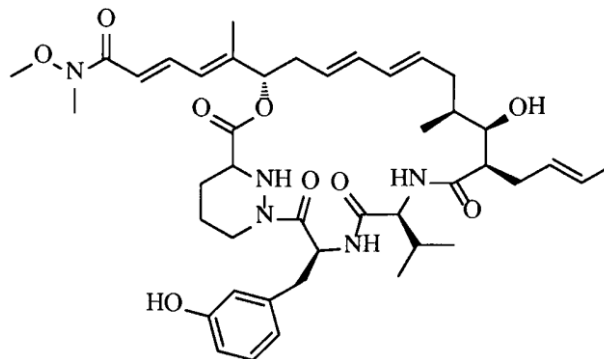
10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa metilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace, m representa un enlace y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



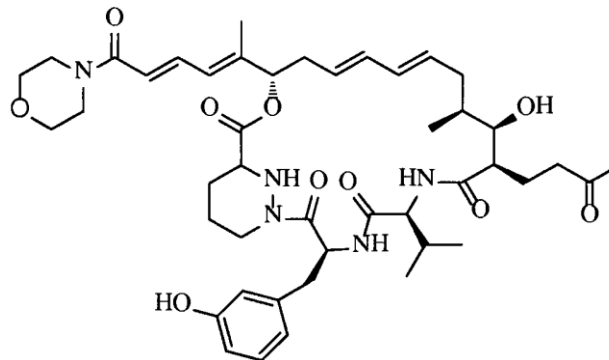
15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



- 5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R<sub>5</sub> representa H tal como se representa mediante la siguiente estructura:

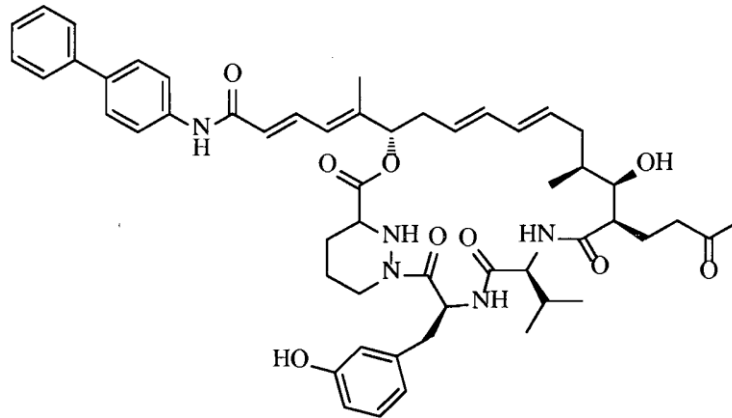


- 10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan juntos -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

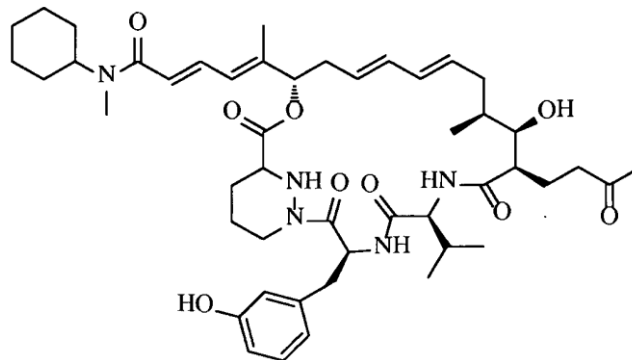


- 15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa 4-bifenililo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

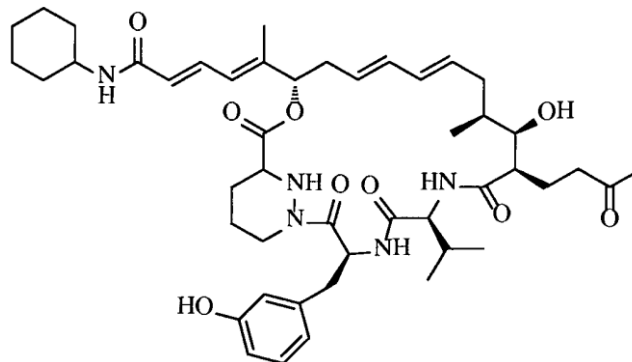




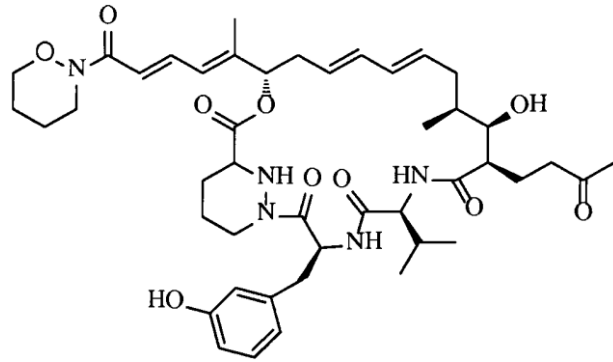
- 5 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



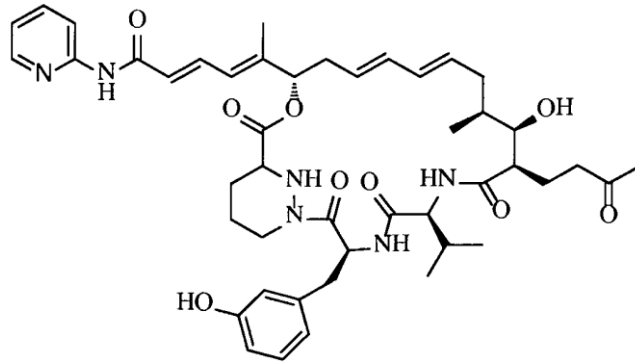
- 10 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



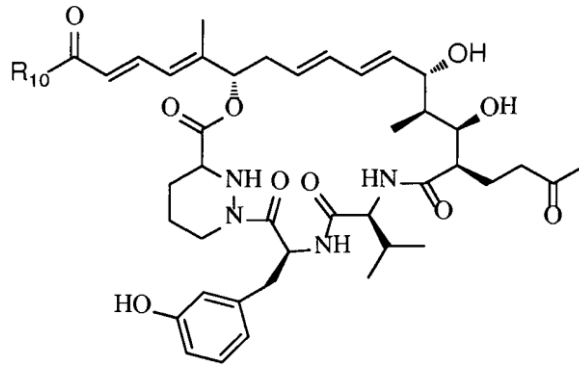
- 15 En otra realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan juntos -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



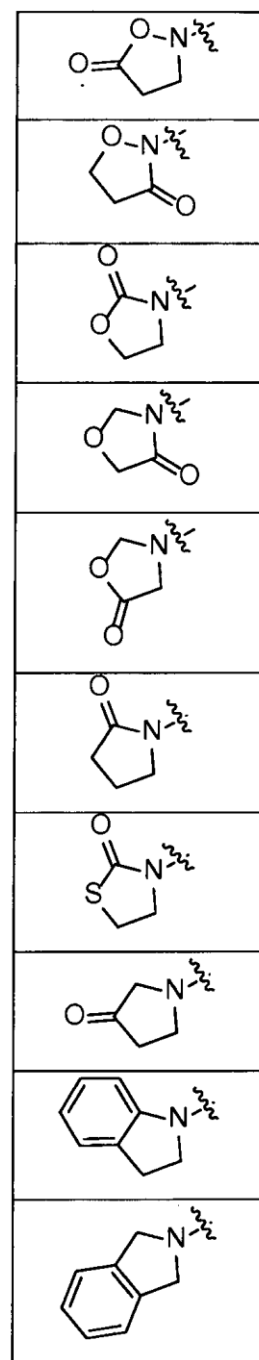
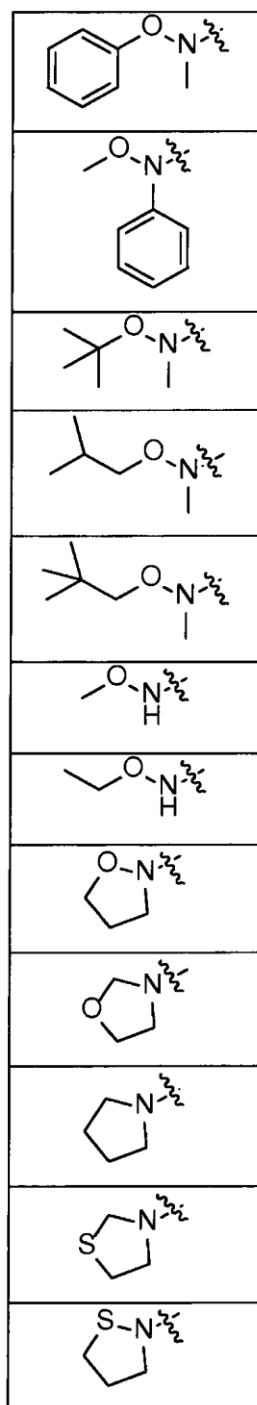
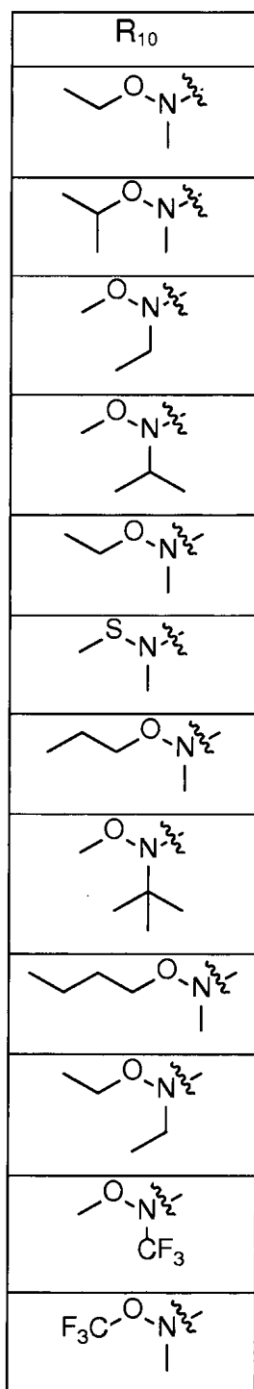
5 En una realización adecuada de la invención, R<sub>1</sub> representa 2-piridinilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

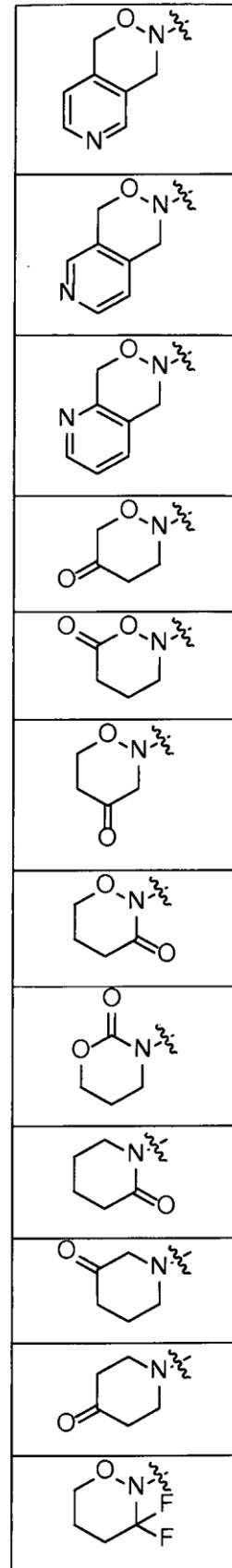
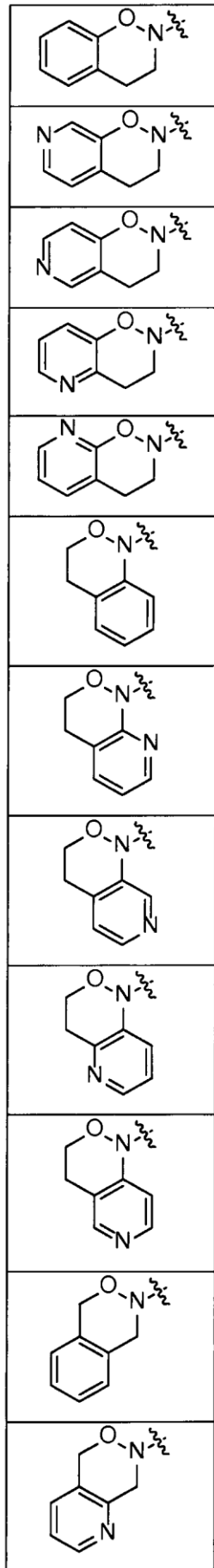
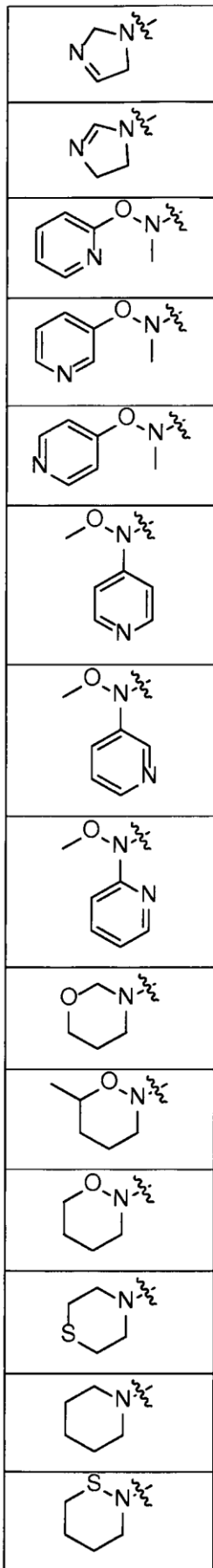


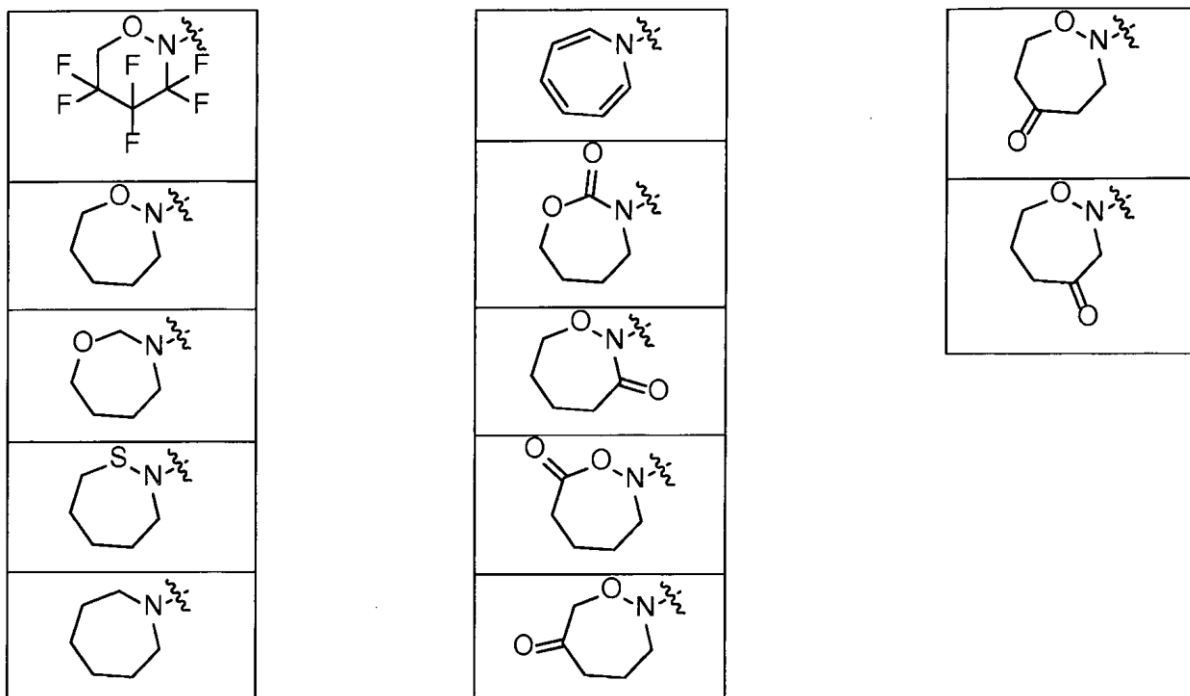
10 En otra serie de realizaciones adecuadas, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



15 En estas realizaciones, R<sub>10</sub> representa uno de los siguientes restos:

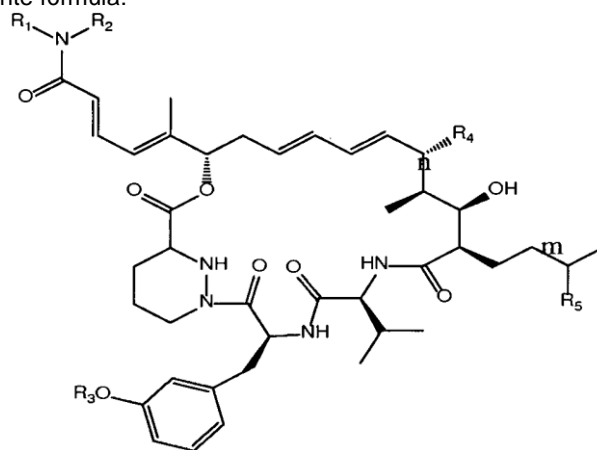






5 En algunas realizaciones, el doble enlace en la posición C26, 27 (haciendo referencia a la estructura de la sangliferina A) puede estar en la forma *cis* en lugar de en la forma *trans*.

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



10 Tales compuestos pueden producirse durante síntesis química.

15 En general, los compuestos de la invención se preparan mediante derivatización semisintética de una sangliferina. Las sangliferinas pueden usarse usando métodos descritos en los documentos WO97/02285 y WO98/07743. Las sangliferinas también se han producido mediante química de síntesis total compleja que puede producir pequeñas cantidades de material tras un amplio trabajo de laboratorio. 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.

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

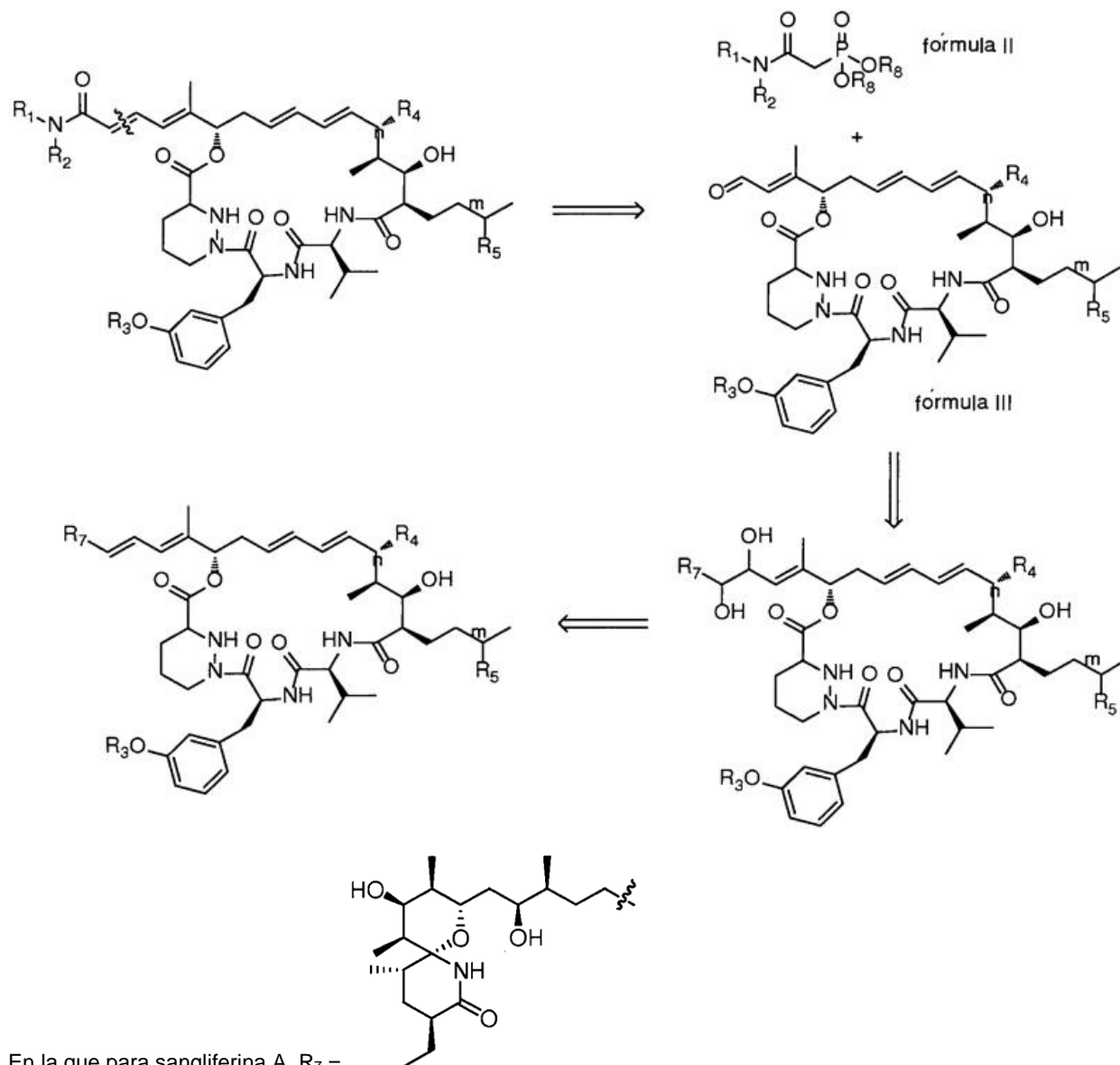
25 (a) dihidroxilación de sangliferina A o u otro análogo de sangliferina que se produce de manera natural (por ejemplo, sangliferina B) o un análogo de la misma que tiene variación en las posiciones indicadas por las variables R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, n y m;

(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 II.

5

Esto se muestra de manera retrosintética a continuación:



10 En la que para sangliferrina A, R<sub>7</sub> =

Los grupos R<sub>8</sub>, que pueden ser iguales o diferentes, representan independientemente alquilo (por ejemplo alquilo C<sub>1-4</sub>) o bencilo.

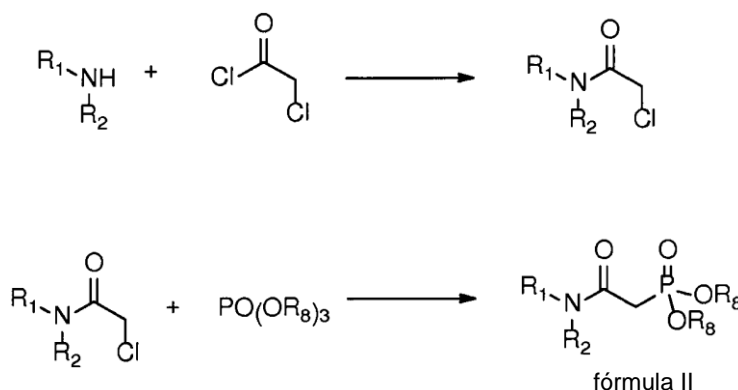
15 Por tanto, un procedimiento para preparar compuestos de la invención comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula II con un macrociclo aldehídico (compuesto de fórmula III).

La preparación de compuestos de fórmula III se ha descrito anteriormente (Metternich *et al.* 1999). Brevemente, una sangliferrina, tal como SfA, 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 III resultante como sustrato para derivatización a una amida homologada. Normalmente, se disuelve un compuesto de fórmula II 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 III y se 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.).

25

Pueden llevarse a cabo derivatizaciones para introducir cambios en grupos  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $n$  y  $m$  antes de la generación del compuesto de fórmula III o tras la reacción para formar la amida homologada. Brevemente, puede eliminarse el hidroxilo en  $R_4$  mediante el tratamiento de un sustrato adecuado en condiciones ácidas con el fin de generar un trieno. Puede reducirse la cetona en  $R_5$  para dar un grupo hidroxilo mediante el tratamiento con un agente reductor adecuado, tal como borohidruro de sodio. El grupo hidroxilo puede convertirse en yodo y luego eliminarse mediante tratamiento una base adecuada, tal como DBU.

Los compuestos de fórmula II pueden conocerse o pueden sintetizarse fácilmente a partir de aminas disponibles ( $R_1R_2NH$ ). Tal como se muestra en el esquema 1 (a continuación) puede usarse la amina 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 II. Otras rutas para los compuestos de fórmula II resultarán evidentes para un experto en la técnica.



Esquema 1

Si se desea o es necesario, pueden emplearse grupos protectores para proteger la funcionalidad en el macrociclo aldehídico, macrociclo ácido o la amida, o en compuestos de fórmula (II) tal como se describe en T. W. Green, P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience, Nueva York, 1999, 49-54, 708-711.

El aducto de metanol puede prepararse mediante fermentación y aislamiento de caldo, o puede prepararse a partir de sangliferina A (documento WO97/02285).

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).

También se han descrito métodos de ingeniería de biosíntesis de policétidos para permitir la generación de compuestos de fórmula (I) en la que  $R_4 = H$  y  $n =$  enlace (véanse los compuestos de fórmula (III) y (IV) ilustrados anteriormente). Esto implica reemplazar el bucle reductor del módulo 12 de sangliferina (véanse el documento WO2010/034243 y Qu *et al.*, 2011), con un bucle reductor que confiere dominios activos de deshidratasa (DH), enoílo reductasa (ER) y cetereductasa (KR) (por ejemplo, los bucles reductores de los módulos 13, 7 ó 1 de rapamicina (Aparicio *et al.*, 1996), el módulo 4 de eritromicina (Bevitt *et al.*, 1992) o el módulo 6 de sangliferina (Qu *et al.*, 2011)). Un experto en la técnica apreciará que podría identificarse un bucle reductor adecuado en un módulo de policétido sintasa de tipo I basándose en la homología con secuencias publicadas (por ejemplo, Aparicio *et al.* 1996), y en consecuencia que este cambio podría llevarse a cabo mediante la introducción de cualquiera de tales bucles que contiene los tres dominios activos, DH, ER y KR. Los métodos para la ingeniería de biosíntesis de policétidos y el concepto de un bucle reductor se describen en los documentos WO98/01546 y WO00/01827. Resulta obvio para algunos expertos en la técnica que estos compuestos pueden sintetizarse *de novo* a partir de compuestos disponibles comercialmente, es decir síntesis total. Se ha descrito la síntesis del tripéptido y la posterior formación del macrocilo (Cabrejas *et al.* 1999). Un procedimiento tal como este podría modificarse para generar los compuestos de la invención.

Otros compuestos de la invención pueden prepararse mediante métodos conocidos *per se* o mediante métodos análogos a los descritos anteriormente.

Un macrociclo de sangliferina de la invención puede permitir su administración solo o en combinación con otros agentes terapéuticos. La coadministración de dos (o más) agentes permite 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.

Por tanto, el macrociclo de sangliferina de la invención permite la coadministración 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 $\alpha$  y/o ribavirina).

5 En una alternativa, un macrociclo de sangliferina de la invención permite la coadministración con uno o más agentes antivirales distintos, tales como un STAT-C (agente dirigido específicamente para el tratamiento de VHC), 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).

20 En otra alternativa, un macrociclo de sangliferina de la invención permite la coadministración 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 eltiegravir).

25 Aún en una alternativa adicional, un macrociclo de sangliferina de la invención permite la coadministración 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).

30 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.

35 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 tóxica, 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.

40 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.

45 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 arábica. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

50 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.

55 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 tensioactivo 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.

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.

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.

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.

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.

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:

- un compuesto según la invención para su uso como producto farmacéutico;
- 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, VHB o VIH;
- una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la invención junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable;
- 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, VHB o VIH, o distrofia muscular, distrofia muscular congénita de Ullrich, miopatía de Betlem, esclerosis múltiple, diabetes, esclerosis lateral amiotrófica, trastorno bipolar, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, infarto de miocardio o consumo de alcohol crónico;
- uso de un compuesto según la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones virales tales como infección por VHC, VHB o VIH.

En una realización, los estados mencionados anteriormente se seleccionan de VHC, VIH. En otra realización, el estado mencionado anteriormente es infección por VHB.

*Métodos generales*

Materiales y métodos

*Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento*

## ES 2 541 853 T3

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

- 5 Se hizo crecer *Streptomyces sp.* A92-308110 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.

### Fórmulas de medios

- 15 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

Componente (y proveedor)	Fórmula	
Glucosa (Sigma, G7021)	7,50	g
Glicerol (Fisher scientific, G/0650/25)	7,50	g
extracto de levadura (Beckton Dickinson, 212770)	1,35	g
extracto de malta (Beckton 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 <sub>3</sub> (Calcitec, V/40S)	0,05	g
NaCl (Fisher scientific, S/3160/65)	0,05	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, P3786)	0,25	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P5379)	0,50	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 frascos de siembra

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

20

#### Disolución de oligoelementos B

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

25

#### 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

## ES 2 541 853 T3

tampón MES (Acros, 172595000)	19,52	g
Antiespumante SAG471 (GE Silicones, SAG471)	*0,20	ml
H <sub>2</sub> 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 frascos

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

5 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:

10 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)

Temperatura de la columna a 50°C

15 Velocidad de flujo 1 ml/min

Monitorizar UV a 240 nm

20 Inyectar alícuota de 20 ul

Gradiente de disolventes:

25 0 min: 55% de B

1,0 min: 55% de B

6,5 min: 100% de B

30 10,0 min: 100% de B

10,05 min: 55% de B

35 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%

40 En estas condiciones SfA eluye a los 5,5 min

En estas condiciones SfB eluye a los 6,5 min

45 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.

### Síntesis

50 Se realizan todas las reacciones en condiciones anhidras a menos que se establezca otra cosa, en material de vidrio secado en horno que se enfría a vacío, usando disolventes secos. Se monitorizan las reacciones mediante CL-UV-EM, usando un método apropiado, por ejemplo el método descrito anteriormente para monitorizar los caldos de cultivo.

55 Método de QC CL-EM

## ES 2 541 853 T3

Condiciones de HPLC:

Columna C18 Hiperclone BDS C18 3u, 4,6 mm x 150 mm

5 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

10 Monitorizar UV a 210, 240 y 254 nm

Gradiente de disolventes:

15 0 min: 10% de B

2,0 min: 10% de B

15 min: 100% de B

20 17 min: 100% de B

17,05 min: 10% de B

25 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%

30 Condiciones de EM

La EM funciona en modo de intercalación (intercalando entre positivo y negativo), explorando desde 150 hasta 1500 uma.

35 Método de CL-EM de análisis *in vitro* (por ejemplo para la evaluación de la solubilidad)

Usando un instrumento API-4000

40 Condiciones de HPLC:

Ultimate AQ-C18 (2,1x50 mm, 3 µM)

Temperatura de la columna a XX°C

45 Velocidad de flujo 0,4 ml/min

Gradiente de disolventes A1 (por ejemplo para los comp. 1 y 13):

50 0,2 min: 10% de B

0,7 min: 60% de B

1,1 min: 60% de B

55 1,4 min: 98% de B

2,3 min: 98% de B

60 2,4 min: 10% de B

3,5 min: detención

Gradiente de disolventes A2 (por ejemplo para los comp. 5 y 10):

65 0,3 min: 10% de B

0,9 min: 95% de B

1,9 min: 95% de B

5

2,0 min: 10% de B

3,0 min: detención

10 El disolvente A es H<sub>2</sub>O-FA al 0,025%-NH<sub>4</sub>OAC 1 mM

El disolvente B es MeOH-FA al 0,025%-NH<sub>4</sub>OAC 1 mM

Modo de exploración negativo

15

*Configuración de MRM:*

		transiciones [Da]
20	hidroximacrociclo, 6 (IS):	741,5 → 294,3
	1	602,2 → 156,0

Modo de exploración positivo,

25

*Configuración de MRM:*

		transiciones [Da]
	5	1088,8 → 503,2
	7	1070,9 → 503,2
	10	822,6 → 503,2
30	13	836,6 → 294,0

*Ensayo de replicación in vitro para la evaluación de la actividad antiviral contra VHC*

35 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 se subcultivaron en medio de crecimiento de células [DMEM (n.º de catálogo 41965039) complementado con FCS al 10%, aminoácidos no esenciales al 1% (11140035), penicilina/estreptomicina al 1% (15140148) y geneticina al 2% (10131027); Invitrogen] a una razón de 1,3-1,4 y se hicieron crecer durante 3-4 días en frascos de cultivo tisular de 75 cm<sup>2</sup> (Techno Plastic Products), se recogieron y se sembraron en medio de ensayo (DMEM, FCS al 10%, aminoácidos no esenciales al 1%, penicilina/estreptomicina al 1%) a una densidad de 6500 células/pocillo (100 µl/pocillo) en placas de microtitulación de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon, Beckton 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, humedad relativa del 95-99%).

50 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 CO<sub>2</sub>, humedad relativa del 95-99%). Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 498 nm (Safire<sup>2</sup>, Tecan) y las densidades ópticas (valores de DO) se convierten en porcentajes de los controles no tratados.

55 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, Safire<sup>2</sup>, Tecan). Se convierten las unidades de luminiscencia relativa en porcentajes de los controles no tratados.

60 Las CE<sub>50</sub> y CE<sub>90</sub> (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 CC<sub>50</sub> (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 CC<sub>50</sub>/CE<sub>50</sub>.

65 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-replicón está por encima del 70% del umbral y no se observa una reducción de más del 30% en la actividad metabólica.

#### Evaluación de la solubilidad en agua

5 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 10 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.

15 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  $\mu$ M, 16  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 1,6  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 0,16  $\mu$ M, 0,04  $\mu$ M y 0,002  $\mu$ M, con MeOH al 50% en H<sub>2</sub>O. 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 (hidroximacrocielo, 6). Se centrifugan las muestras (5 min, 12000 rpm), luego se analizan 20 mediante CL/EM.

	Disolución ( $\mu$ l)	MeHO/H <sub>2</sub> O (1:1) ( $\mu$ l)		Disolución de trabajo ( $\mu$ M)	Disolución ( $\mu$ l)	MeOH/Tampón (1:1) ( $\mu$ l)		Disolución final (nM)
10 mM	10	240	→	400				
400 $\mu$ M	50	450	→	40	20	380	→	2000
	20	480	→	16	20	380	→	800
40 $\mu$ M	50	450	→	4	20	380	→	200
16 $\mu$ M	50	450	→	1,6	20	380	→	80
4 $\mu$ M	50	450	→	0,4	20	380	→	20
1,6 $\mu$ M	50	450	→	0,16	20	380	→	8
0,4 $\mu$ M	50	450	→	0,04	20	380	→	2
0,04 $\mu$ M	50	950	→	0,002	20	380	→	1

25 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  $\mu$ M con una concentración de DMSO final del 1% (por ejemplo 4  $\mu$ l de disolución madre de DMSO 10 mM en 396  $\mu$ 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. 30 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 (hidroximacrocielo, 6) para análisis de CL-EM/EM.

#### Evaluación de la permeabilidad celular

35 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  $\mu$ 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 40 compuestos de prueba como control patrón (tales como propanolol y acebutolol).

#### Evaluación *in vivo* de la farmacocinética

45 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 50 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 el % 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 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  $\mu$ M) 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.

#### *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-Hipaque (30 min, 800 g, 25°C). Se purificaron células T CD4+ humanas primarias 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), estreptomycinina (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 CO<sub>2</sub>. 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.

Se incubaron células HeLa CD4+, células Jurkat, linfocitos T de sangre periférica CD4+ activados y macrófagos (500.000 células/100  $\mu$ 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 CE<sub>50</sub>.

#### *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 (CI<sub>50</sub>). Entonces se emplea un ensayo de captación de colorante para medir la viabilidad celular, que se usa para calcular la toxicidad (CT<sub>50</sub>). Se calcula el índice terapéutico (IT) como CT<sub>50</sub>/CI<sub>50</sub>.

#### *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  $1 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 96 pocillos en medios RPMI, con complementos y suero AB humano al 2%.

Las condiciones de cultivo incluyeron: poblaciones de células A y B solas y una 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  $10 \mu\text{M}$  y  $0,0001 \mu\text{M}$  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  $37^\circ\text{C}$  en el 5% de  $\text{CO}_2$  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.

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  $\text{CI}_{50}$  (concentración de compuesto de prueba que dio como resultado una reducción del 50% de los recuentos por minuto). Con el fin de calcular la  $\text{CI}_{50}$ , 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.

#### *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  $4^\circ\text{C}$  y se bloquearon. Se añadió NS5A-His recombinante ( $1 \text{ ng/ml}$ ) a los pocillos en  $50 \mu\text{l}$  de tampón de unión (Tris  $20 \text{ mM}$ , pH 7,9, NaCl  $0,5 \text{ M}$ , glicerol al 10%, DTT  $10 \text{ mM}$  y NP-40 al 1%) durante 16 h a  $4^\circ\text{C}$ . Se detectó posteriormente NS5A-His capturada usando anticuerpos de ratón anti-His ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) (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.

#### *Análisis anti-PPIasa de la inhibición de ciclofilina*

Se describe una metodología alternativa para analizar la interacción con ciclofilinas tal como sigue: Se determinó la actividad PPIasa de CypD recombinante, producida por la escisión por trombina de GST-CypD, 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  $470 \text{ mM}$ , está limitada por la tasa de isomerización cis-trans. Se equilibró CypD durante 1 h a  $5^\circ\text{C}$  con el artículo de prueba seleccionado usando una concentración de fármaco que oscila entre  $0,1$  y  $20 \text{ nM}$ . La reacción comenzó mediante la adición del péptido, y se monitorizó el cambio en la absorbancia espectrofotométricamente a 10 puntos de datos por segundo. Se restaron las tasas de hidrólisis del blanco (en ausencia de CypD) de las tasas en presencia de CypD. 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 - Producción de sangliferina A y sus congéneres naturales en biorreactores con agitación de 15 l con siembra secundaria

Se prepararon cultivos vegetativos inoculando  $0,2 \text{ ml}$  de una reserva de esporas de *Streptomyces* sp. A92-308110 en  $400 \text{ ml}$  de medio de siembra SGS en frascos Erlenmeyer de  $2 \text{ l}$  con tapones de espuma.

Se incubaron los frascos de cultivo a  $27^\circ\text{C}$ ,  $250 \text{ rpm}$  (desplazamiento vertical de  $2,5 \text{ cm}$ ) durante  $24 \text{ h}$ . A partir del cultivo de siembra, se transfirieron  $300 \text{ ml}$  a  $15 \text{ litros}$  de medio de siembra primario SGS que contenía el  $0,02\%$  de antiespumante SAG 471, en un fermentador Braun de  $15 \text{ l}$ . Se llevó a cabo la fermentación durante  $24 \text{ horas}$  a  $27^\circ\text{C}$ , con la agitación de partida fijada a  $\geq 300 \text{ rpm}$ , la tasa de aireación a  $0,5 \text{ V/V/M}$  y un nivel de oxígeno disuelto (OD) controlado con la cascada de agitación a  $\geq 30\%$  de saturación de aire. A partir del cultivo de siembra secundario preparado en el fermentador, se tomaron  $600 \text{ ml}$  en condiciones asépticas y se transfirieron a  $15 \text{ litros}$  de medio de producción SGP-2 que contenía el  $0,02\%$  de antiespumante SAG 471, en un fermentador Braun de  $15 \text{ l}$ . Se llevó a cabo la fermentación durante  $5 \text{ días}$  a  $24^\circ\text{C}$ , con la agitación de partida fijada a  $300 \text{ rpm}$ , la tasa de aireación a  $0,5 \text{ V/V/M}$  y un nivel de oxígeno disuelto (OD) controlado con la cascada de agitación a  $\geq 30\%$  de saturación de aire. Se observó que se producía SfA a  $10\text{-}20 \text{ mg/l}$  en caldos de fermentación.

#### Ejemplo 2 - Extracción y purificación de sangliferina A



Se clarificó el caldo completo (30 l) mediante centrifugación. Se extrajo el sedimento celular resultante dos veces con acetato de etilo (2 x 10 l), cada una agitando durante 1 hora con un agitador de paletas superior y dejando sedimentar antes de eliminar por bombeo el disolvente. Entonces se combinaron las fases de acetato de etilo (~20 l) y se eliminó el disolvente a presión reducida a 40°C para obtener un residuo aceitoso. Entonces se suspendió este residuo aceitoso en metanol:agua 80:20 (volumen total de 500 ml), y se extrajo dos veces con hexano (2 x 500 ml). Entonces se secó la fracción de metanol:agua 80:20 a presión reducida para producir un extracto seco en bruto que contenía SfA y SfB. Se disolvió este extracto en metanol (100 ml), se mezcló con 15 g de gel de sílice y se secó para dar un polvo. Se cargó el polvo en una columna de gel de sílice (5 x 20 cm) empaquetada en el 100% de CHCl<sub>3</sub>. Por cada litro de disolvente de elución se aumentó la concentración de metanol gradualmente en un 1% y se recogieron fracciones de 250 ml. Tras tres litros de elución de disolvente se aumentó la concentración de metanol gradualmente en un 2% hasta el 8%. Se combinaron las fracciones que contenían SfA y/o SfB y se redujeron a vacío hasta sequedad y se purificaron SfA y SfB mediante HPLC preparativa. Se logró la HPLC preparativa sobre una columna Xterra Prep MS C18 OBD de 10 mm (19 x 250 mm) de Waters que se procesó con disolvente A (agua) y disolvente B (acetonitrilo) a 20 ml/min con el siguiente programa:

t = 0 min, 55% de B

t = 4 min, 55% de B,

t = 30 min, 100% de B

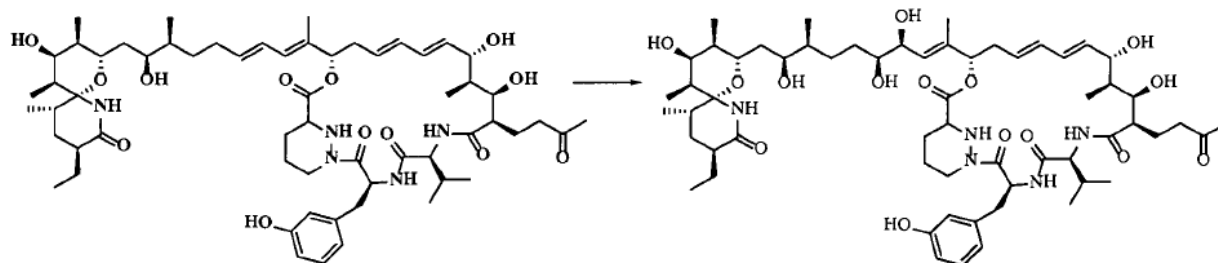
t = 32 min, 100% de B,

t = 36 min, 55% de B.

Se combinaron las fracciones que contenían SfA y se llevaron a sequedad.

Ejemplo 3 - Síntesis de 8 (macrociclo aldehídico)

3.1 La preparación de 26,27-dihidroxisangliferina, 9

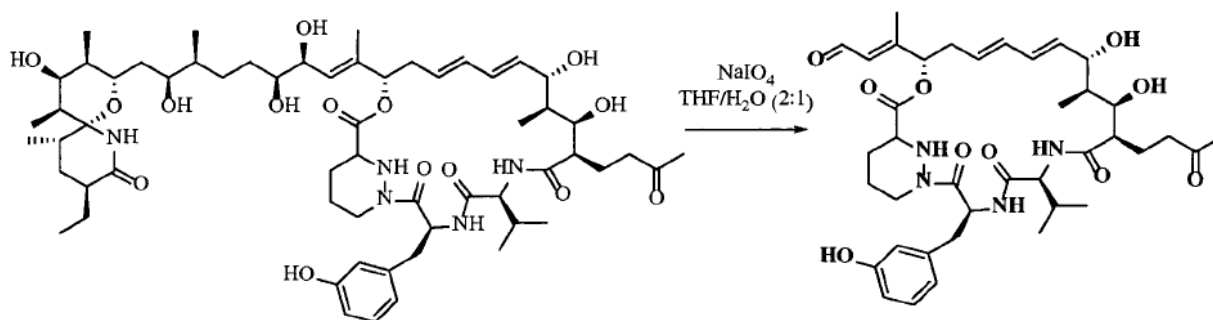


Sangliferina A (SFA), 5

26,27-dihidroxisangliferina, 9

A una disolución con agitación de sangliferina A, 5 (135 mg, 0,1238 mmol), se le añadieron a temperatura ambiente (DHQ)<sub>2</sub>PHAL (5,76 mg, 0,0074 mmol), disolución al 2,5% en peso de tetraóxido de osmio en alcohol terc-butílico (47 µl, 0,0037 mmol) y metanosulfonamida (23,6 mg, 0,2476 mmol) en alcohol terc-butílico (4 ml) junto con una disolución de ferricianuro de potasio (122,3 mg, 0,3714 mmol) y carbonato de potasio (51,3 mg, 0,3714 mmol) en 4 ml de agua. Tras agitar durante 1 h, se añadió una disolución de sulfito de sodio acuoso saturado (187,3 mg, 1,4857 mmol). Se agitó la mezcla resultante durante 30 min y entonces se extrajo con tres porciones de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante Combiflash usando columna de fase inversa (columna C18, A = H<sub>2</sub>O, B = acetonitrilo, t = 2 min, B = 0%; t = 4 min, B = 30%, t = 9 min, B = 35%; t = 12 min, B = 45%; t = 16 min, B = 70%) para proporcionar 26,27-dihidroxisangliferina, 9 (102 mg, 70 %) como un sólido blanco. QC CL-EM, TR = 5,3 min, m/z = 1124,8 [M+H]<sup>+</sup>, 1122,7 [M-H]<sup>-</sup>.

3.2 La preparación del macrociclo aldehídico, 8



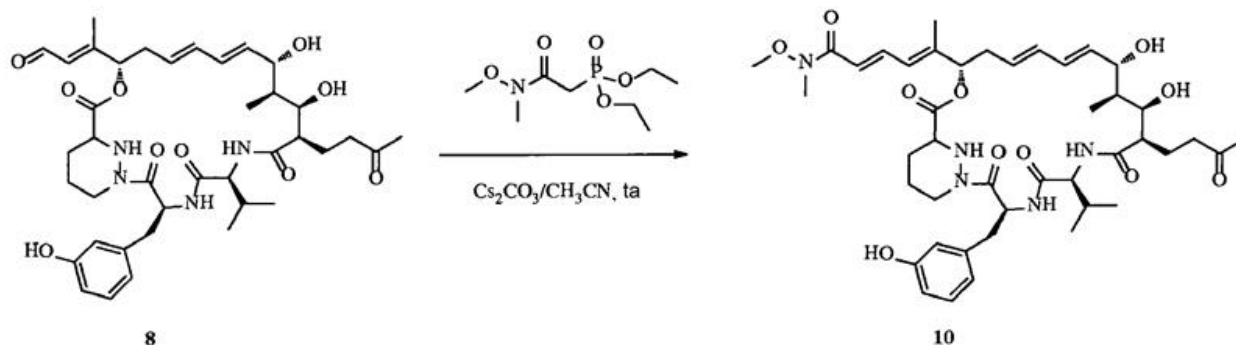
26,27-dihidroxisangliferina, 9

macrociclo aldehídico, 8

5 A una disolución de 26,27-dihidroxisangliferina, 9 (60,0 mg, 0,053 mmol) en THF y agua (2:1, 5 ml) se le añadió peryodato de sodio (22,8 mg, 0,107 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 2 h, y se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se extrajo esta mezcla con tres porciones de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante Combiflash usando columna de fase inversa (columna C18, A = agua, B = CH<sub>3</sub>CN, t = 3 min, B = 0%; t = 12 min, B = 40%; t = 17 min, B = 40%, t = 21 min, B = 70%) para proporcionar el macrociclo aldehídico, 8 (35 mg, 90 %) como un sólido blanco. QC CL-EM, TR = 4,0 min, m/z = 761,4 [M+Na]<sup>+</sup>, 737,3 [M-H]<sup>-</sup>.

#### Ejemplo 4 - Síntesis de 10

15



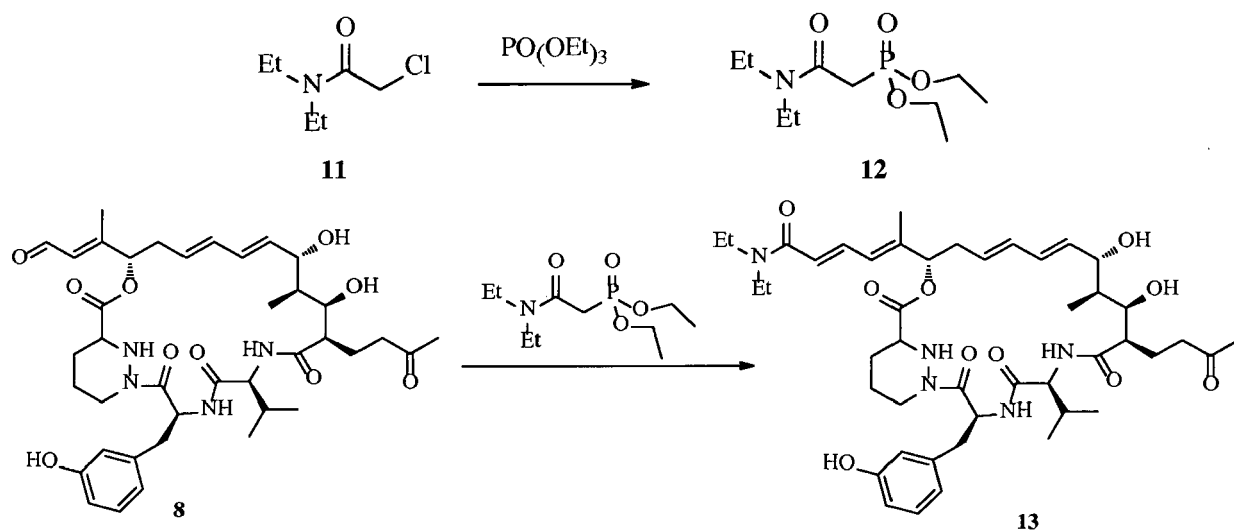
8

10

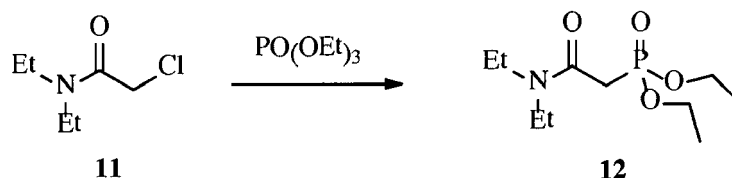
20 A una suspensión de NaH (0,974 mg, 0,041 mmol) en THF anhidro (1,0 ml) se le añadió gota a gota una disolución de 2-(metoxi(metil)amino)-2-oxoetilfosfonato de dietilo (25,8 mg, 0,108 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -3°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Se añadió gota a gota una disolución de 8 (20 mg, 0,027 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se extinguió la mezcla con agua y se eliminó el THF a presión reducida. Se extrajo el residuo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera, luego se secó. Se eliminó el disolvente a presión reducida para proporcionar un residuo de 14 mg. Se cargó el compuesto en bruto (disuelto en acetona) sobre una placa de CCF (1 mm, 20\*20 cm) y se reveló con acetona/éter de petróleo=3:2. Se recogió la banda diana (visualizada mediante UV) y se mezcló con acetona, luego se filtró a través de un lecho de gel de sílice (2-3 cm de altura, enjuagado previamente con acetona para eliminar impurezas). Se concentró la filtración a vacío. Finalmente, añadiendo acetonitrilo y agua a la muestra obtenida, se secó por congelación la disolución para dar el producto deseado como un polvo sólido blanco (8,2 mg, 37%). CL-EM: 824 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 2 para <sup>1</sup>H-RMN.

30

#### Ejemplo 5 - Síntesis de 13



## 5.1 Síntesis del producto intermedio 12

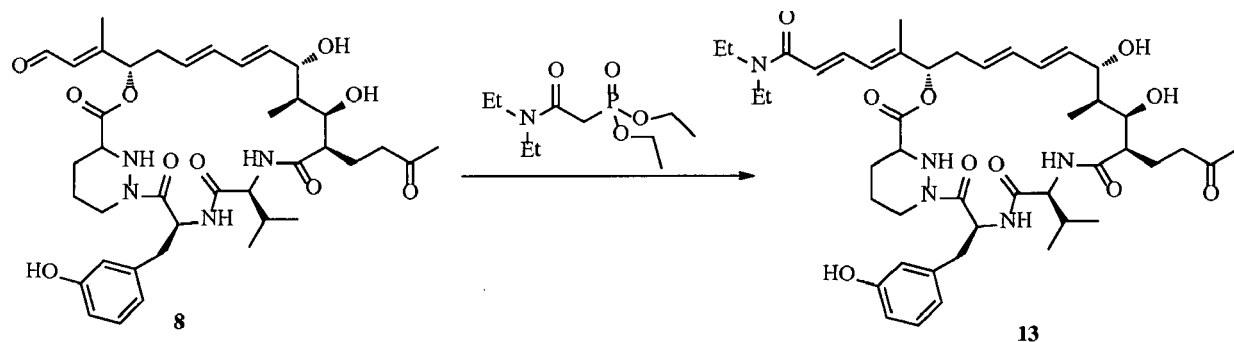


5

Se agitó una mezcla de *N,N*-dietilcloroacetamida (17,5 ml, 0,127 mmol) y fosfito de trietilo (22 ml, 0,1309 mmol) a 180°C durante 8 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se destiló para dar el producto intermedio 12 (15 g, 47%) como un aceite incoloro.

10

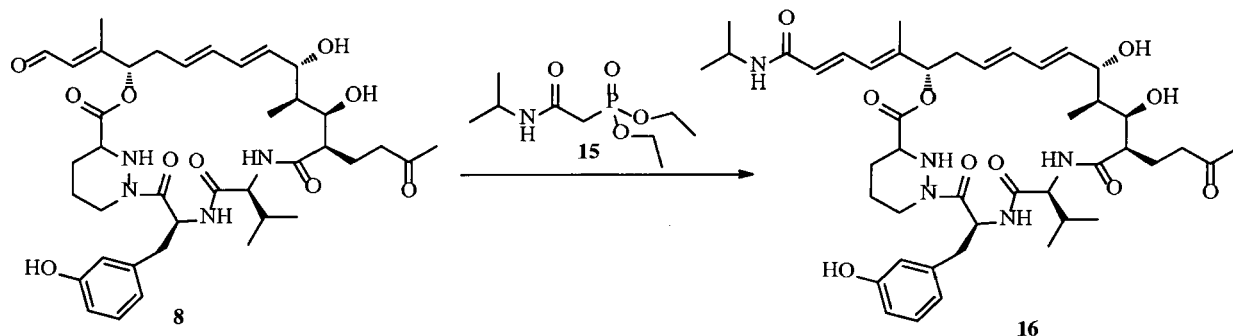
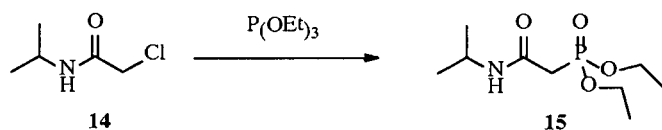
## 5.2 Síntesis de 13



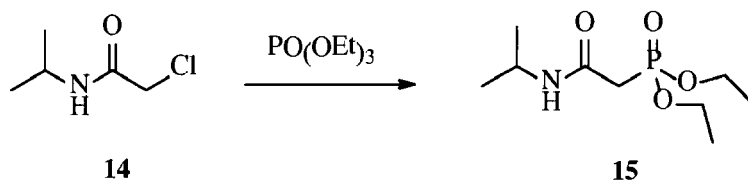
15 A una suspensión de NaH (0,776 mg, 0,0324 mmol) en THF anhidro (1,0 ml) se le añadió gota a gota una disolución de 2-(dietilamino)-2-oxoetilfosfonato de dietilo (28,5 mg, 0,1134 mol) en THF anhidro (0,2 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -3°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Se añadió gota a gota una disolución de 8 (20 mg, 0,027 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 30 min. Se extinguió la mezcla con agua y se evaporó el THF a presión reducida. Se extrajo el residuo con EA. Se lavó la fase orgánica con salmuera, luego se secó. Se eliminó el disolvente por evaporación, dando un residuo de 17 mg que se purificó con CCF prep. Se cargó el compuesto en bruto (disuelto en acetona) sobre una placa de CCF (1 mm, 20\*20 cm) y se reveló con acetona/éter de petróleo=3:2. Se recogió la banda diana (visualizada mediante UV) y se mezcló con acetona, luego se filtró a través de un lecho de gel de sílice (2-3 cm de altura, enjuagado previamente con acetona para eliminar impurezas). Se concentró la filtración a vacío. Se cargó la muestra en un tubo de HPLC (100 Å, 4.6 mm x 150 mm) y se separó por cromatografía de fase inversa (C18) con un gradiente de 0 a 100% de metanol en agua durante 30 min. Finalmente, añadiendo acetonitrilo y agua a la muestra obtenida, se secó por congelación la disolución para dar el producto deseado como un polvo sólido blanco. (9,0 mg, 40%). CL-EM: 836 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 3 para <sup>1</sup>H-RMN.

25

Ejemplo 6 - Síntesis de 16



## 6.1 Síntesis del producto intermedio 15

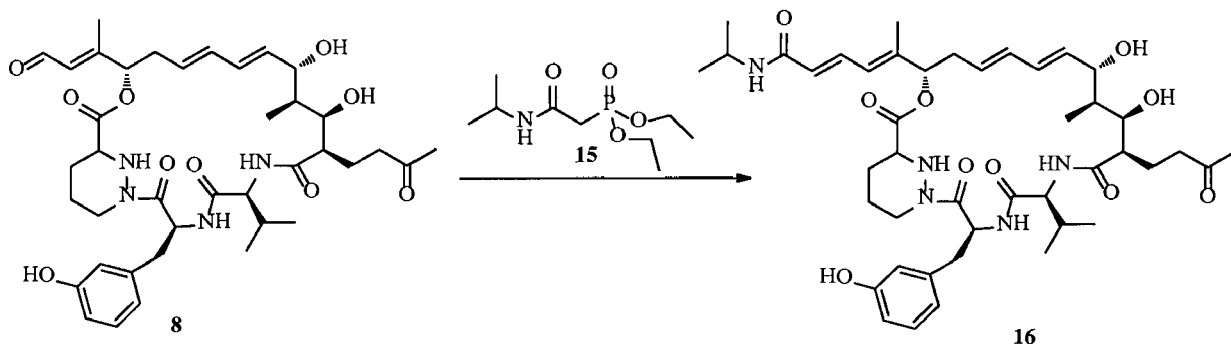


5

Se agitó una mezcla de N,-isopropilcloroacetamida (1 g, 7,41 mmol) y fosfito de trietilo (1,6 ml, 9,09 mmol) a 140°C durante 8 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se usó una muestra de 200 mg para purificarse mediante HPLC prep. para dar el producto intermedio 15 (60 mg, 34%) como un aceite incoloro.

10

## 6.2 Síntesis de 16

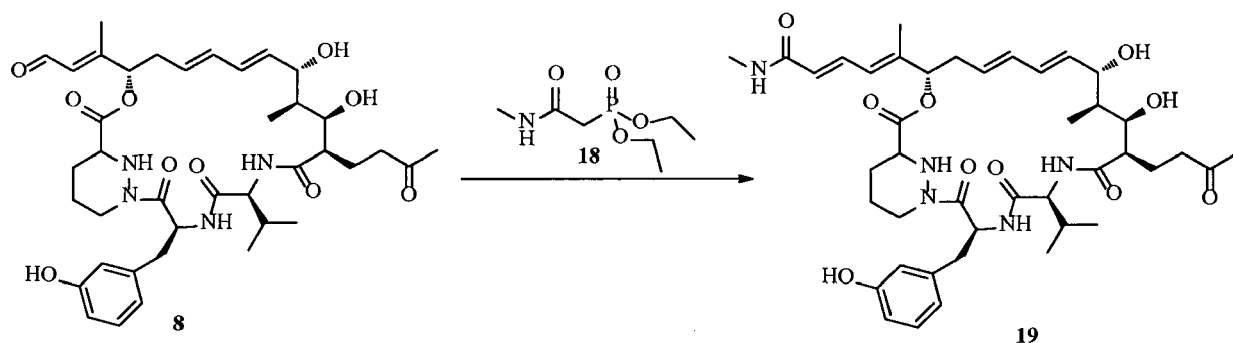
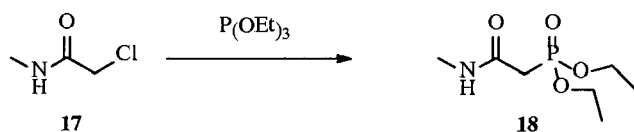


15 A una suspensión de NaH (0,972 mg, 0,0405 mmol) en THF anhidro (1,0 ml) se le añadió gota a gota una disolución de 2-(isopropilamino)-2-oxoetilfosfonato de dietilo (26 mg, 0,108 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -3°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Se añadió gota a gota una disolución de 8 (20 mg, 0,027 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 30 min. Se extinguió la mezcla con agua y se evaporó el THF a presión reducida. Se extrajo el residuo con EA. Se lavó la fase orgánica con salmuera, luego se secó. Se eliminó el disolvente por evaporación, dando un residuo de 18 mg que se purificó con CCF prep. Se cargó el compuesto en bruto (disuelto en acetona) sobre una placa de CCF (1 mm, 20\*20 cm) y se reveló con acetona/éter de petróleo=3:2. Se recogió la banda diana (visualizada mediante UV) y se mezcló con acetona, luego se filtró a través de un lecho de gel de sílice (2-3 cm de altura, enjuagado previamente con acetona para eliminar impurezas). Se concentró la filtración a vacío.

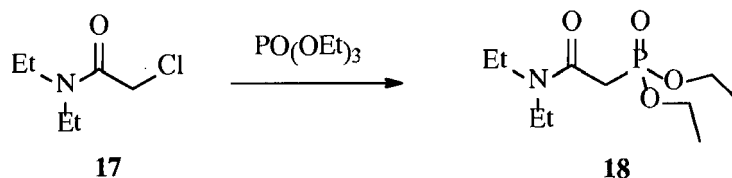
20 Finalmente, añadiendo acetonitrilo y agua a la muestra obtenida, se secó por congelación la disolución para dar el producto deseado como un polvo sólido blanco (8,5 mg, 38%). CL-EM: 822 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 4 para <sup>1</sup>H-RMN.

25

Ejemplo 7 - Síntesis de 19



## 7.1 Síntesis del producto intermedio 18

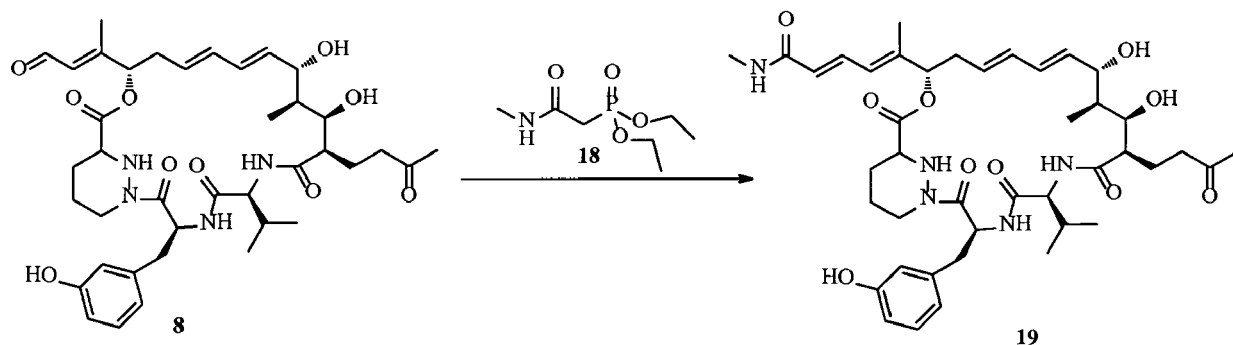


5

Se agitó una mezcla de N-metilcloroacetamida (200 mg, 1,87 mmol) y fosfito de trietilo (0,67 ml, 3,74 mmol) a 130°C durante 8 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante HPLC prep. para dar el producto intermedio 18 (60 mg, 15%) como un aceite incoloro.

10

## 7.2 Síntesis de 19

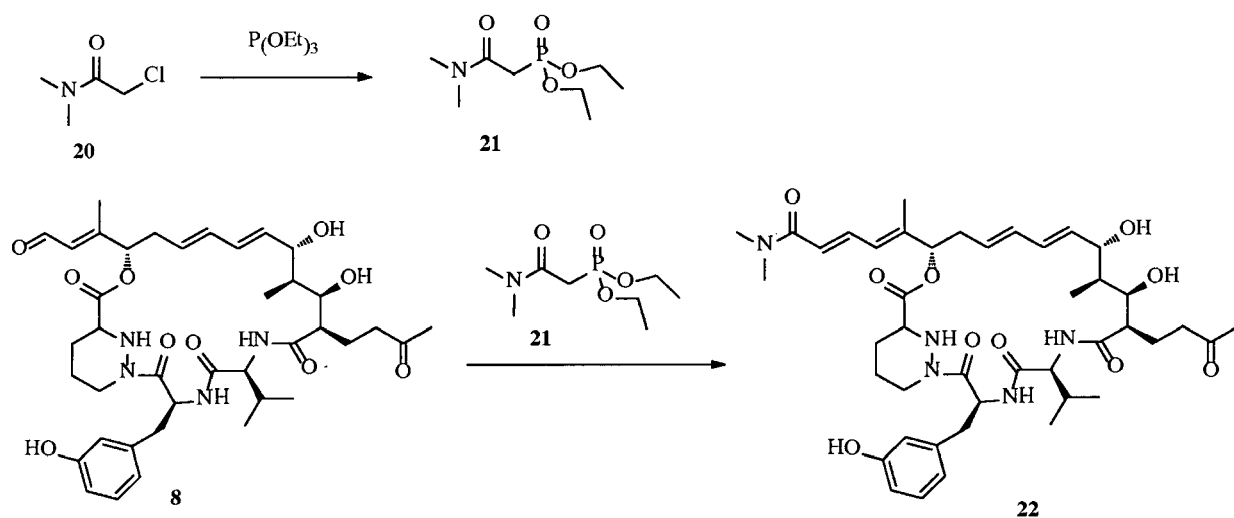


15 A una suspensión de NaH (0,972 mg, 0,0405 mmol) en THF anhidro (1,0 ml) se le añadió gota a gota una disolución de 2-(metilamino)-2-oxoetilfosfonato de dietilo (23 mg, 0,108 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> a -3°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Se añadió gota a gota una disolución de 8 (20 mg, 0,027 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 30 min. Se extinguió la mezcla con agua y se evaporó el THF a presión reducida.

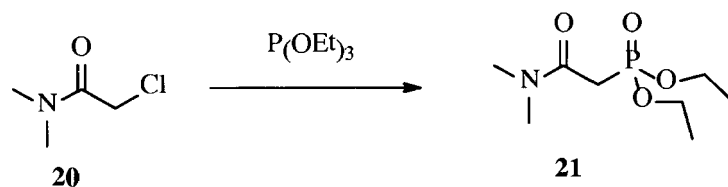
20 Se extrajo el residuo con EA. Se lavó la fase orgánica con salmuera, luego se secó. Se eliminó el disolvente por evaporación, dando un residuo de 14 mg que se purificó con CCF prep. Se cargó el compuesto en bruto (disuelto en acetona) sobre una placa de CCF (1 mm, 20\*20 cm) y se reveló con acetona/éter de petróleo=3:2. Se recogió la banda diana (visualizada mediante UV) y se mezcló con acetona, luego se filtró a través de un lecho de gel de sílice (2-3 cm de altura, enjuagado previamente con acetona para eliminar impurezas). Se concentró la filtración a vacío.

25 Finalmente, añadiendo acetonitrilo y agua a la muestra obtenida, se secó por congelación la disolución para dar el producto deseado como un polvo sólido blanco (7,0 mg, 37%). CL-EM: 794 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 5 para <sup>1</sup>H-RMN.

## Ejemplo 8 - Síntesis de 22



## 8.1 Síntesis del producto intermedio 21

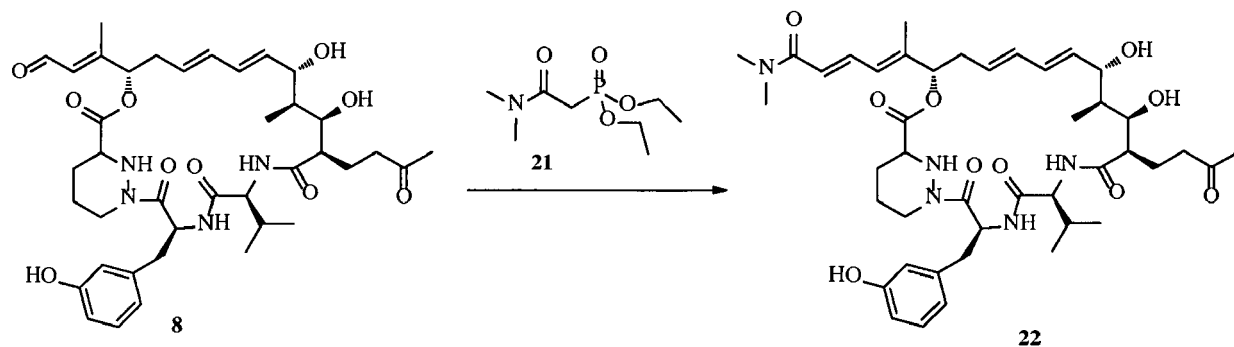


5

Se agitó una mezcla de 2-cloro-N,N-dimetilacetamida (300 mg, 2,47 mmol) y fosfito de trietilo (820 mg, 4,94 mmol) a 150°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante HPLC prep. para dar el producto intermedio 21 (105 mg, 20%).

10

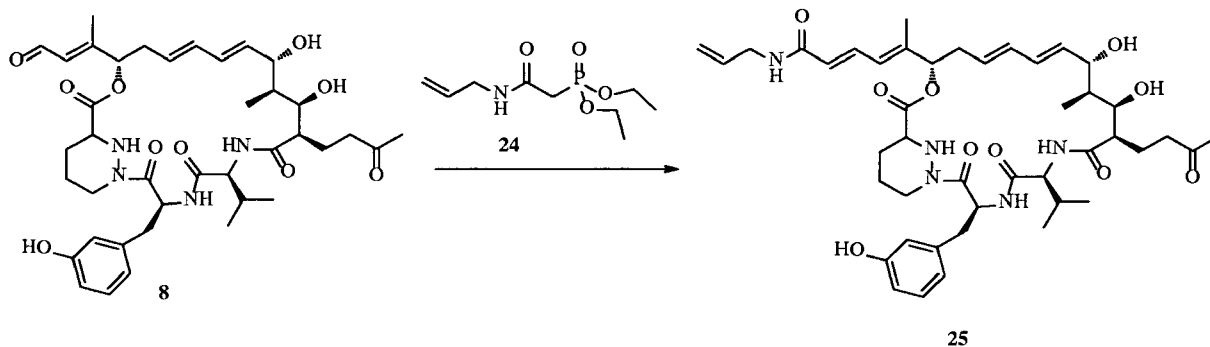
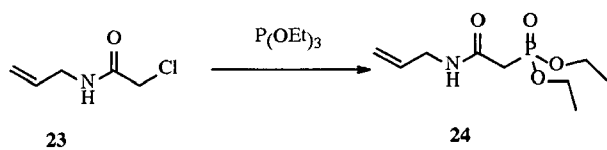
## 8.2 Síntesis de 22



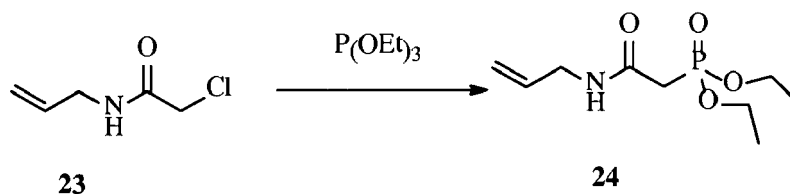
15 A una disolución de 21 (50 mg, 0,224 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,6 mg, 0,068 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 (40 mg, 0,054 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. [Columna: Spring C18 (25\*250 mm, 10 μm), fase móvil: A: H<sub>2</sub>O B: Acetonitrilo, gradiente: B desde el 30% hasta el 40% a lo largo de 10 min] para obtener 22 como un sólido blanco (12,4 mg, 28%). CL-EM: 808 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 6 para <sup>1</sup>H-RMN.

## Ejemplo 9 - Síntesis de 25

25



## 9.1 Síntesis del producto intermedio 24

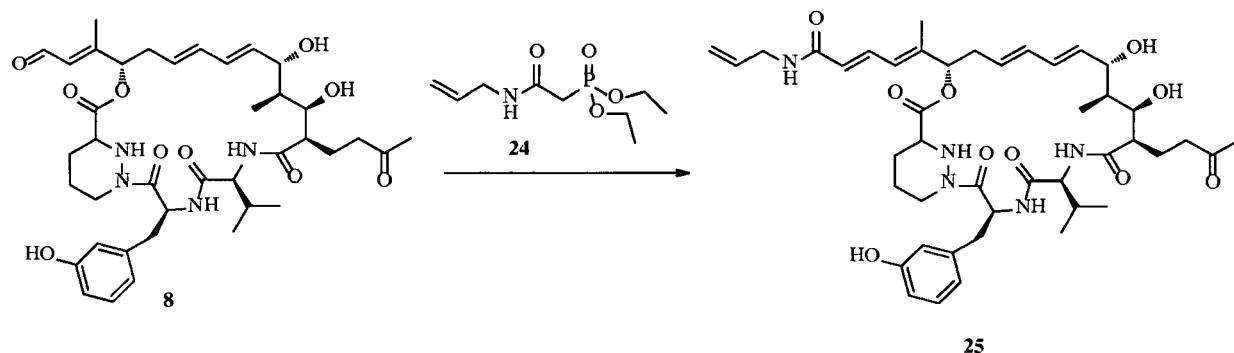


5

Se agitó una mezcla de  $P(OEt)_3$  (0,63 ml, 3,75 mmol) y 23 (500 mg, 3,74 mmol) a  $180^\circ C$  durante 6 h. Se enfrió la reacción y se purificó mediante HPLC prep. para obtener el producto intermedio 24 como un aceite incoloro (100 mg, 11%).

10

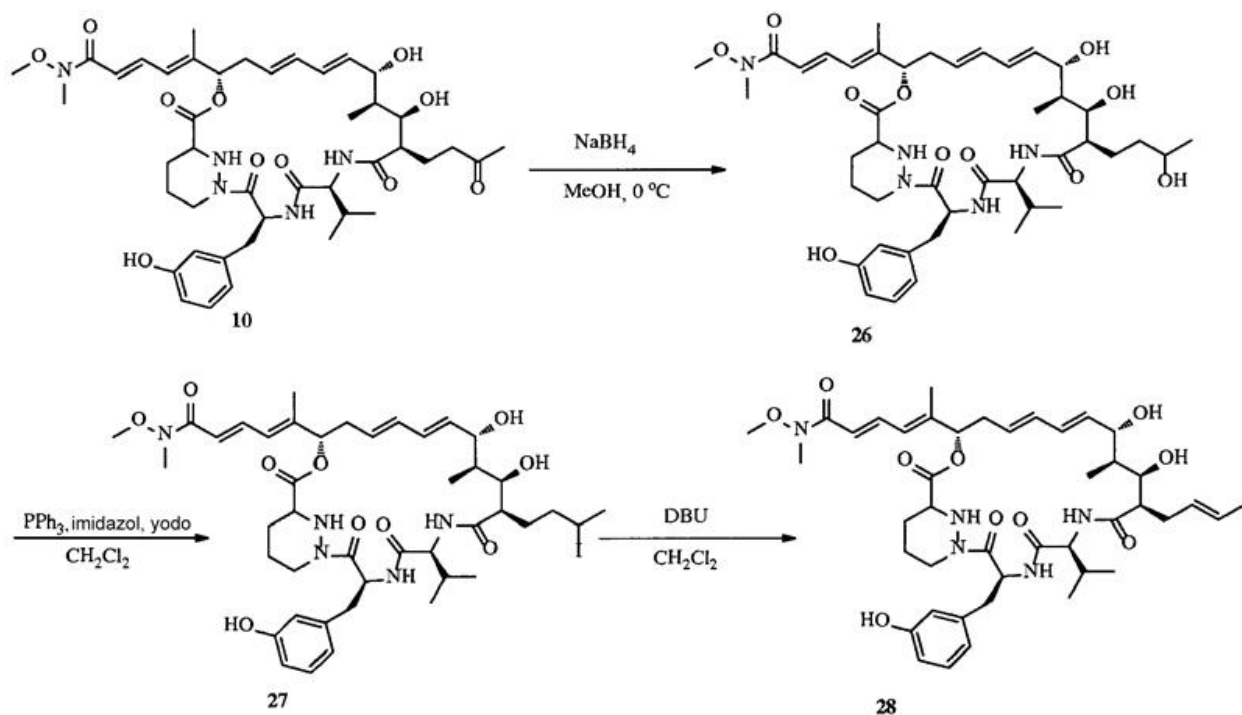
## 9.2 Síntesis de 25



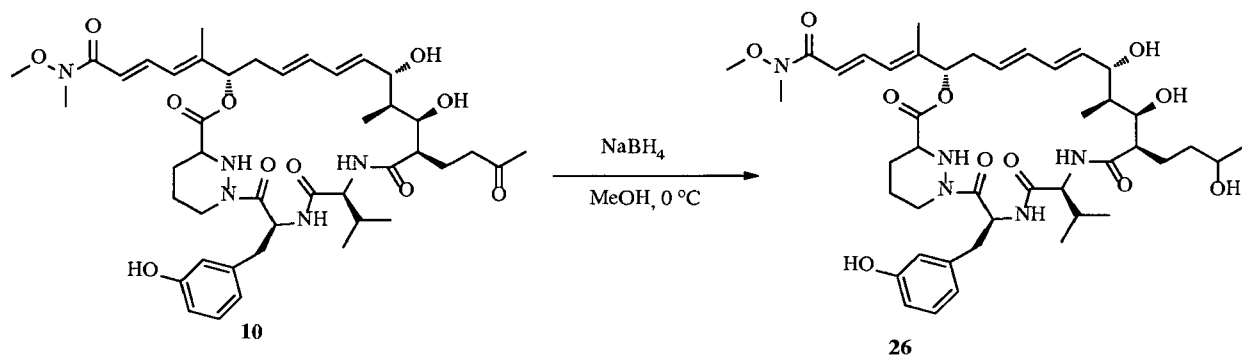
15 A una disolución de 24 (38 mg, 0,1624 mmol) disuelta en THF (1 ml) se le añadió NaH (1,5 mg, 0,0625 mmol) a  $0^\circ C$  y se agitó durante 10 min. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente y se añadió el compuesto 8 (30 mg, 0,0406 mmol). Se agitó la reacción durante 30 min a temperatura ambiente y se extinguió con agua (5 ml). Se extrajo la reacción con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica combinada con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 25 como un sólido blanco (7,4 mg, 22%). Véase la figura 7 para  $^1H$ -RMN.

20

## Ejemplo 10 - Síntesis de 26 y 28



## 10.1 Síntesis de 26

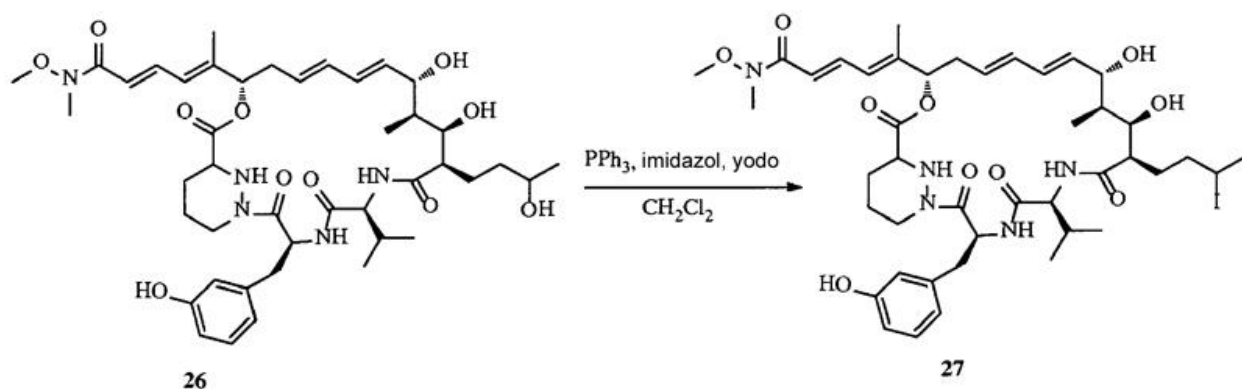


5

A una disolución de 10 (25 mg, 0,0304 mmol, 1 eq.) disuelto en metanol (2 ml) a 0°C se le añadió borohidruro de sodio (2,3 mg, 0,0608 mmol, 2 eq.). Se agitó la mezcla de reacción 3 h a 0°C. A la reacción se le añadió disolución de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se eliminaron a vacío. Se usó el residuo directamente en la siguiente etapa.

10

## 10.2 Síntesis del producto intermedio 27



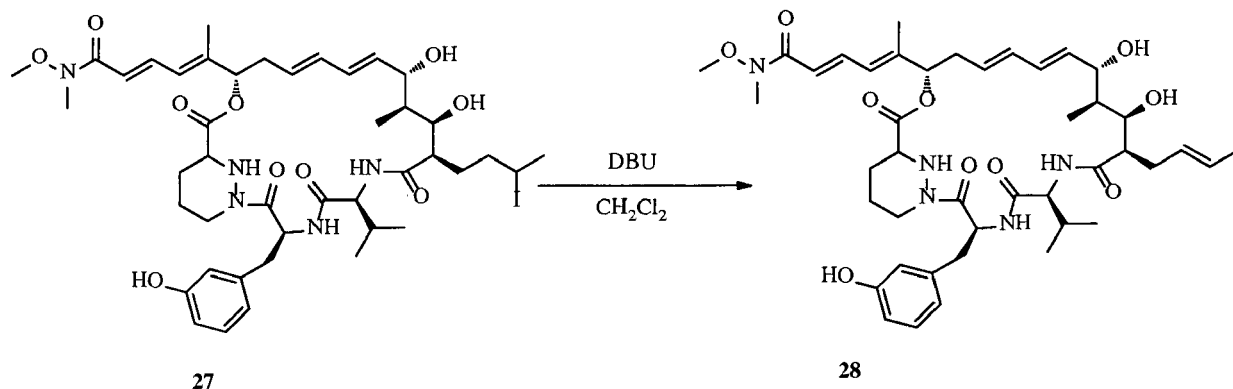
15

A una disolución de trifetilfosfina (24 mg, 0,0915 mmol, 3 eq.) disuelta en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 ml) se le añadieron imidazol



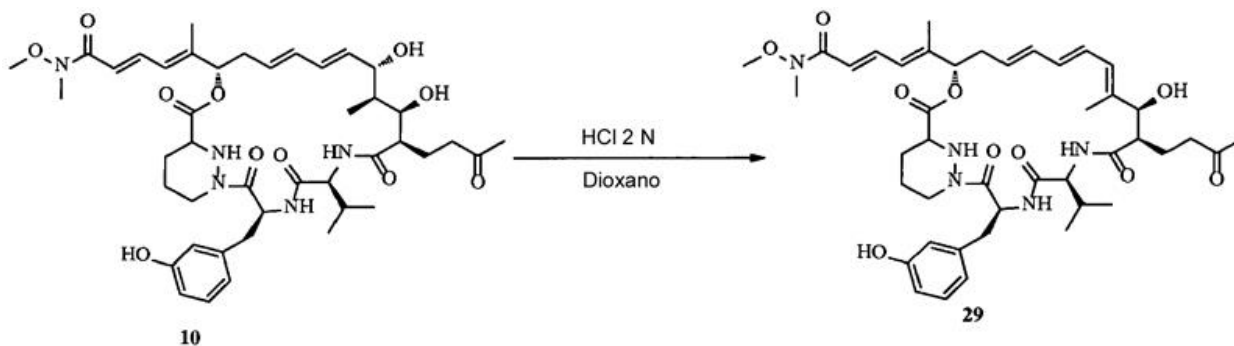
(8,2 mg, 0,1206 mmol, 4 eq.) y yodo (23 mg, 0,0914 mmol, 3 eq.). Se agitó la mezcla de reacción 30 min y se enfrió hasta 0°C. Se añadió el compuesto 27 (en bruto, 25 mg, 0,0303 mmol, 1 eq.) y se agitó la reacción durante 4,5 h a temperatura ambiente. Se extinguió la reacción con disolución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (2 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acuoso saturado (10 ml) y salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron. Se usó el residuo directamente en la siguiente etapa.

## 10.3 Síntesis de 28



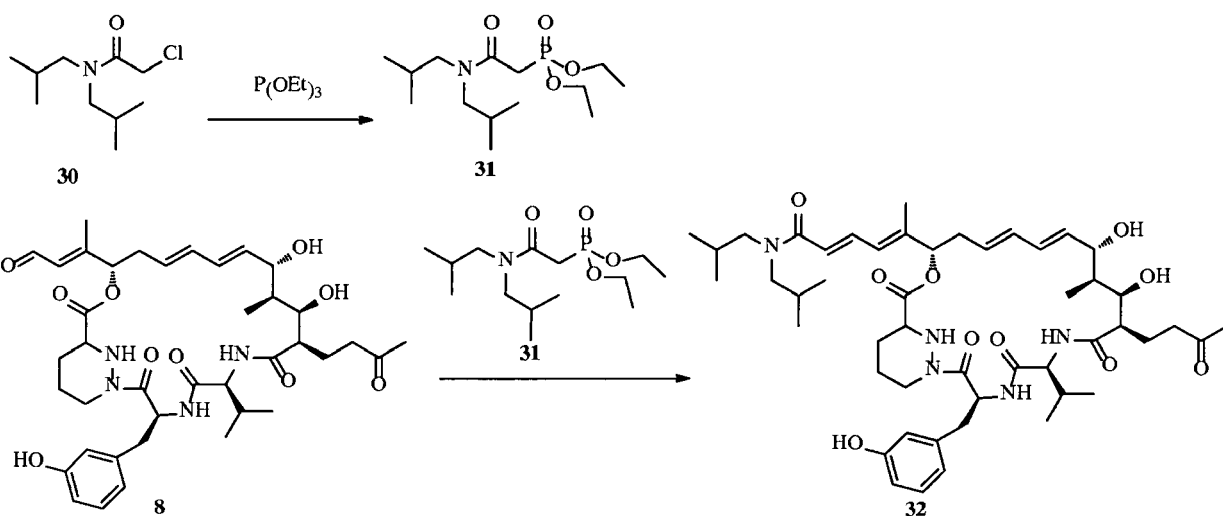
A una disolución de 27 (25 mg, 0,02673 mmol, 1 eq.) disuelto en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1,5 ml) se le añadió DBU (8,2 mg, 0,1206 mmol, 4 eq.) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción 2 h a temperatura ambiente. Se extinguió la reacción con disolución de bicarbonato de sodio acuosa saturada (4 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio y se evaporaron. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para dar 28 como un sólido blanco. (7 mg, 29%). Véase la figura 8 para <sup>1</sup>H-RMN.

## Ejemplo 11 - Síntesis de 29

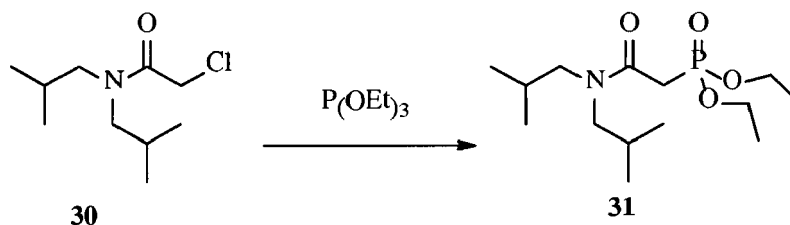


A una disolución de 10 (30 mg, 0,0365 mmol) disuelto en dioxano (2 ml) se le añadió disolución de HCl acuosa (2 M, 0,18 ml, 0,36 mmol). Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 días y se extinguió la reacción con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio y se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para dar 29 como un sólido blanco (11 mg, 38%). Véase la figura 9 para <sup>1</sup>H-RMN.

## Ejemplo 12 - Síntesis de 32



## 12.1 Síntesis del producto intermedio 31

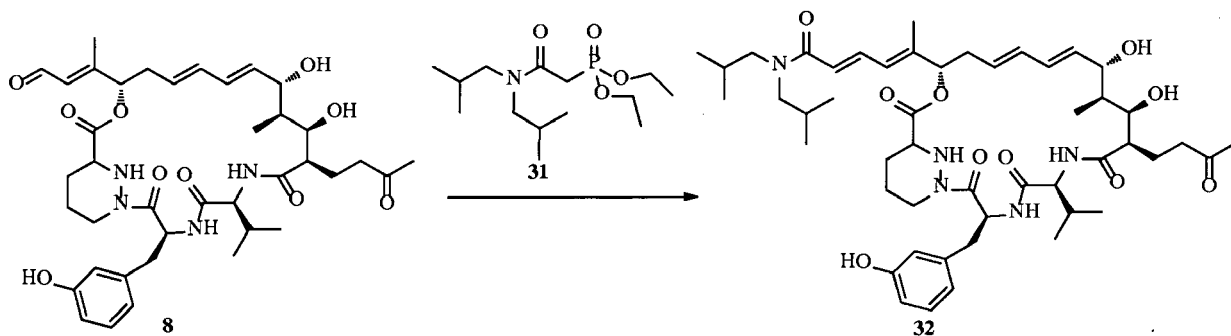


5

Se agitó una mezcla de 2-cloro-N,N-diisobutilacetamida, 31 (206 mg, 1,00 mmol) y fosfito de trietilo (332 mg, 2,00 mmol) a 140°C durante 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 31 (222 mg, 20%).

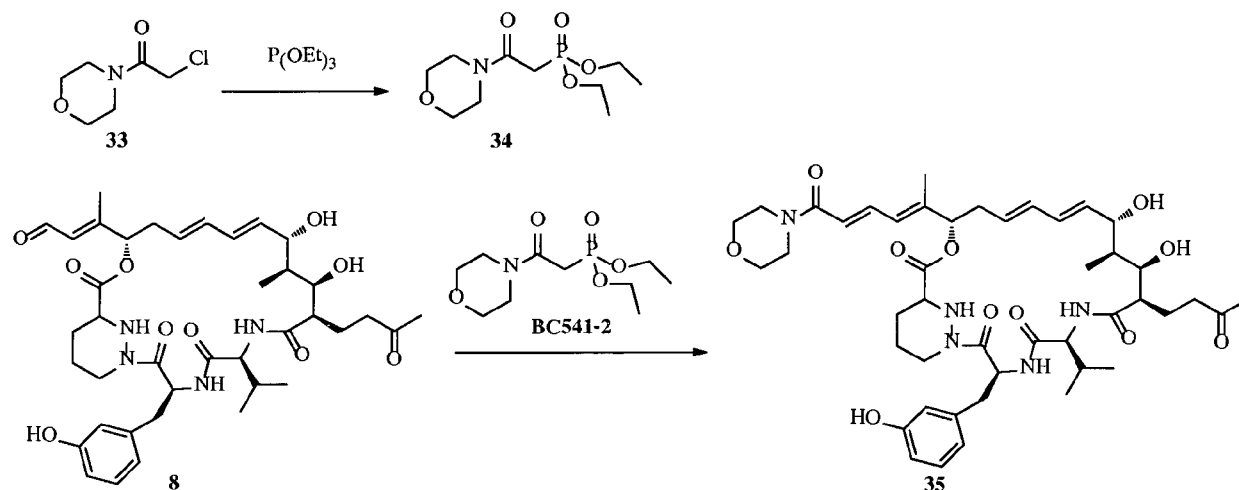
10

## 12.2 Síntesis de 32

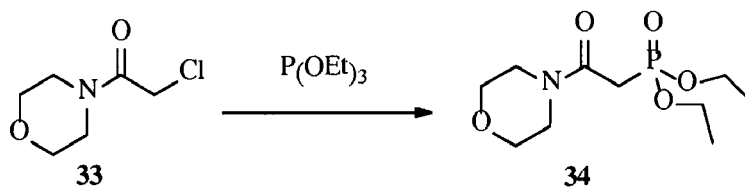


15 A una disolución de 31 (58 mg, 0,188 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,4 mg, 0,0564 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a temperatura ambiente con agitación. Entonces se añadió 8 (35 mg, 0,047 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (3 x 30 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 32 como un sólido blanco (16,2 mg, 38%). CL-EM: 892 [M+1]<sup>+</sup>.  
20 Véase la figura 10 para <sup>1</sup>H-RMN.

Ejemplo 13 - Síntesis de 35



## 13.1 Síntesis del producto intermedio 34

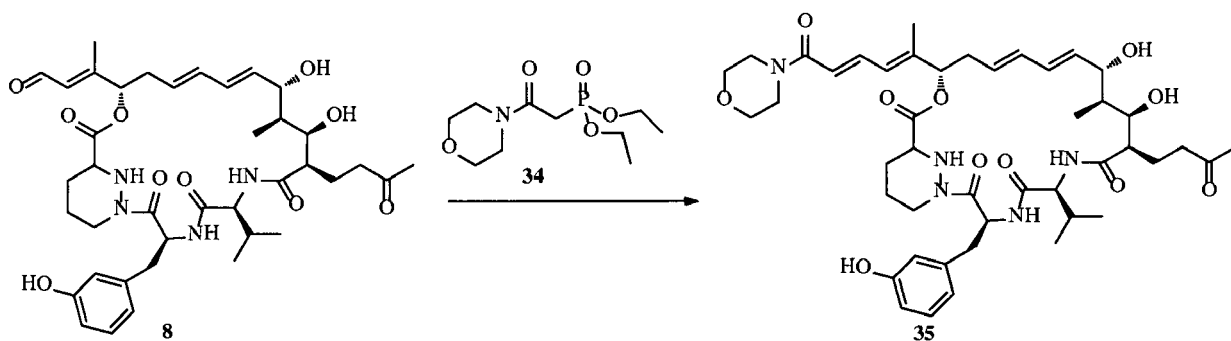


5

Se agitó una mezcla de 2-cloro-1-morfolinoetanona 33 (327 mg, 2 mmol) y fosfito de trietilo (665 mg, 4 mmol) a 140°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 34 como un aceite incoloro (190 mg, 36%).

10

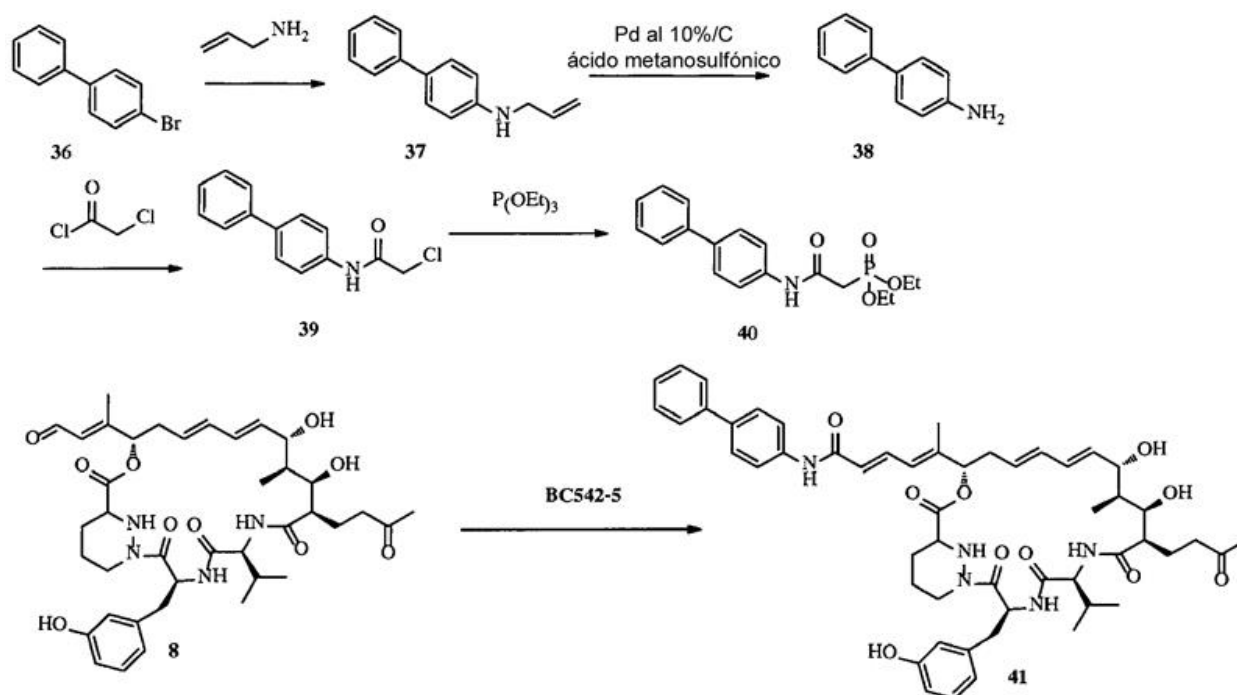
## 13.2 Síntesis de 35



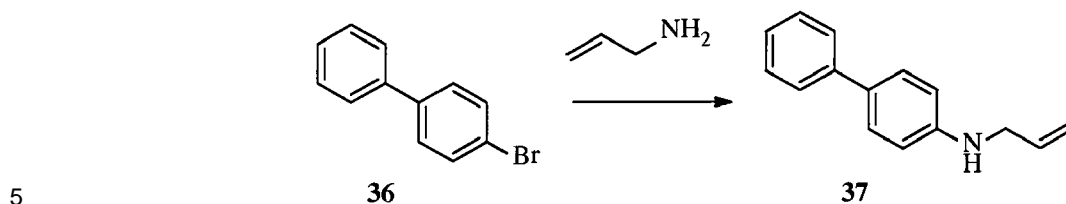
15 A una disolución de 34 (50 mg, 0,188 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,4 mg, 0,056 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 (35 mg, 0,047 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (20 ml\*3). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 14 mg de producto puro 35 como un sólido blanco (rendimiento, 35%). CL-EM: 850 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 11 para <sup>1</sup>H-RMN.

20

## Ejemplo 14 - Síntesis de 41



## 14.1 Síntesis del producto intermedio 37



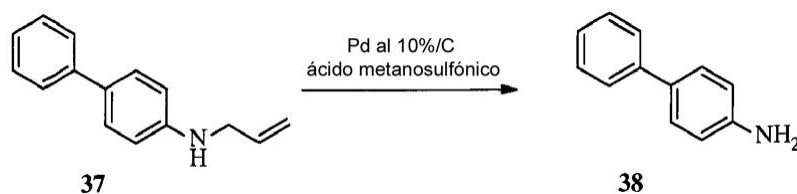
5

10

Se calentó una mezcla de 4-bromobifenilo 36 (5 g, 21,55 mmol), alilamina (2,4 ml, 32,33 mmol), terc-butóxido de sodio (3,11 g, 32,33 mmol), Pd(DPPF)Cl<sub>2</sub> (0,79 g, 1,08 mmol) y DPPF (1,79 g, 3,23 mmol) en 20 ml de THF anhidro hasta 80°C durante 4 h. La CCF indicó la desaparición completa del 4-bromobifenilo de partida. Se filtró la mezcla de reacción de color rojo oscuro a través de Celite y se concentró a vacío dejando un aceite de color oscuro. Se sometió a cromatografía el aceite sobre gel de sílice usando PE/EA (5:1) para dar 37 (3,5 g, rendimiento del 60%) como un sólido amarillo.

15

## 14.2 Síntesis del producto intermedio 38

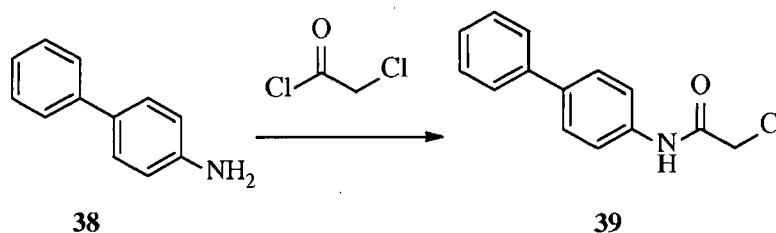


20

Se sometió a reflujo durante 2 h una mezcla de N-alilbifenil-4-amina 37 (3 g, 14,35 mmol), Pd al 10%/C (0,3 g) y ácido metanosulfónico (922 ul, 14,35 mmol, 1 eq.) en 50 ml de etanol absoluto. La CCF indicó la desaparición de la N-alilbifenil-4-amina de partida. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de Celite y se lavó con NaOH ac. (10%), y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró a vacío para dar 1,6 g del producto en bruto 38 que se uso en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

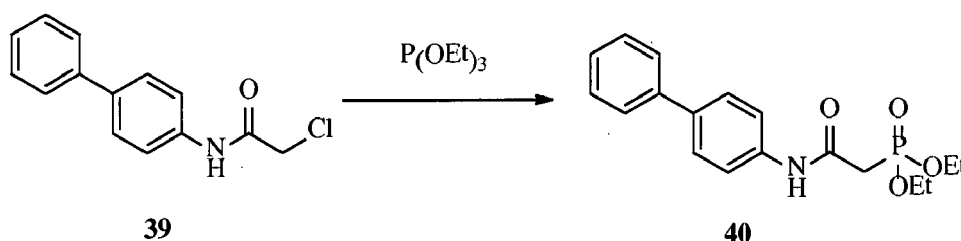
25

## 14.3 Síntesis del producto intermedio 39



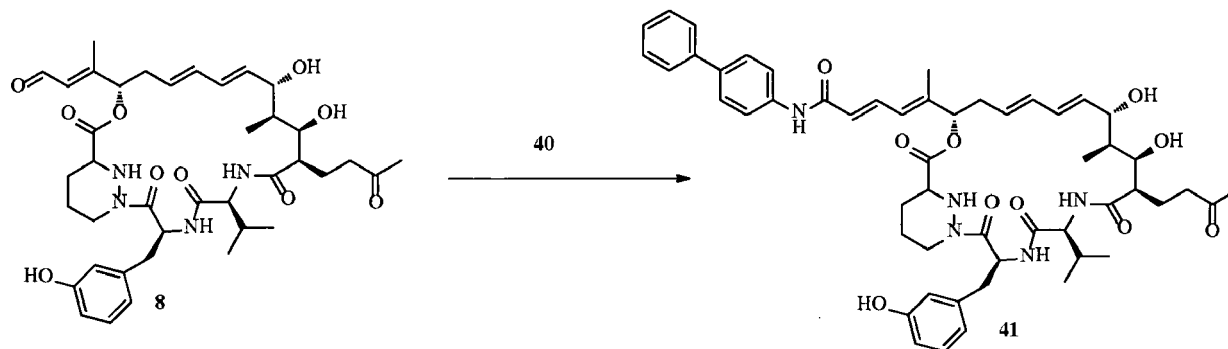
A una disolución de 38 en bruto (1,6 g, 9,462 mmol), Et<sub>3</sub>N (1,052 g, 10,408 mmol) en DCM seco (50 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (1,165 g, 10,408 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 0-10°C durante 3 h, se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró a vacío para dar un sólido de color amarillo claro. Se purificó el sólido mediante CCF prep. con PE/EA (4:1), y dio el compuesto deseado 39 (200 mg, rendimiento del 6% para dos etapas).

#### 14.4 Síntesis del producto intermedio 40



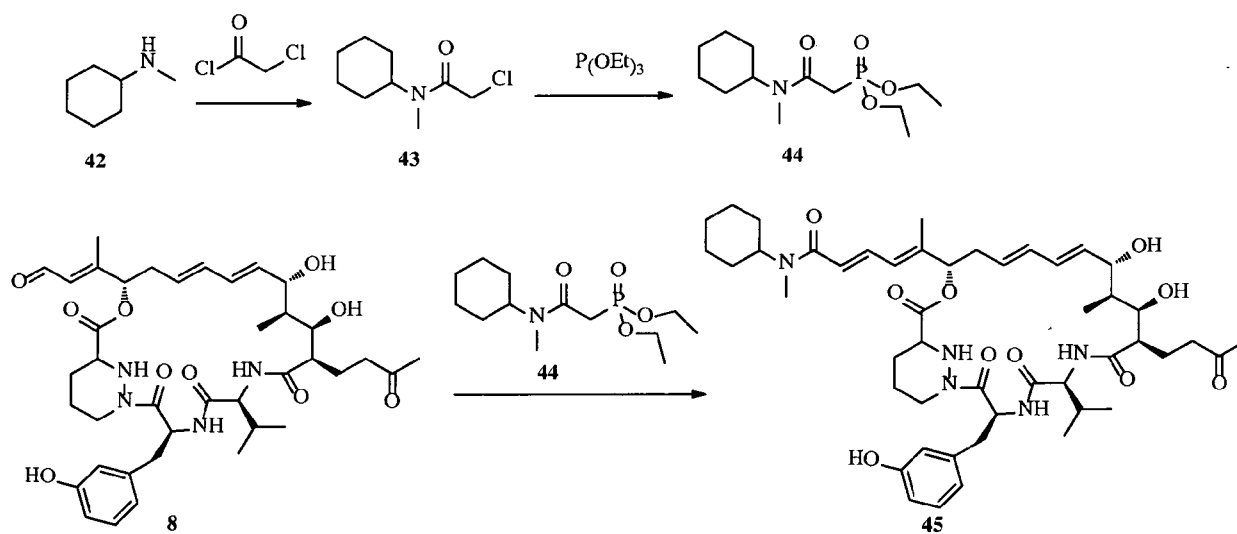
Se agitó una mezcla de N-(bifenil-4-il)-2-cloroacetamida 39 (200 mg, 0,8161 mmol) y fosfito de trietilo 271 mg, 1,6323 mmol) a 140°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 40 (77 mg, 27%) como un sólido de color amarillo claro.

#### 14.5 Síntesis de 41

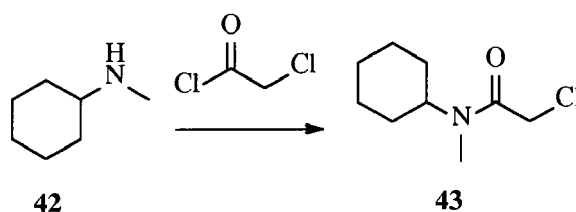


A una disolución de 40 (65 mg, 0,188 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,4 mg, 0,056 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 (35 mg, 0,047 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (20 ml\*3). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 9,4 mg de producto puro 41 como un sólido blanco (rendimiento, 21%). CL-EM: 932 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 12 para <sup>1</sup>H-RMN.

#### Ejemplo 15 - Síntesis de 45



## 15.1 Síntesis del producto intermedio 43

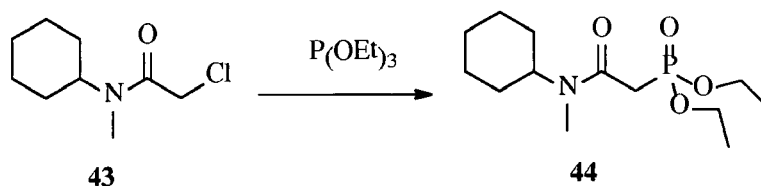


5

A una disolución de 42 (1 g, 8,834 mmol), Et<sub>3</sub>N (0,983 g, 9,724 mmol) en DCM seco (10 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (1,088 g, 9,724 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 0-10°C durante 3 h, se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se concentró a vacío par dar un líquido de color amarillo claro (1,95 g) que se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

10

## 15.2 Síntesis del producto intermedio 44

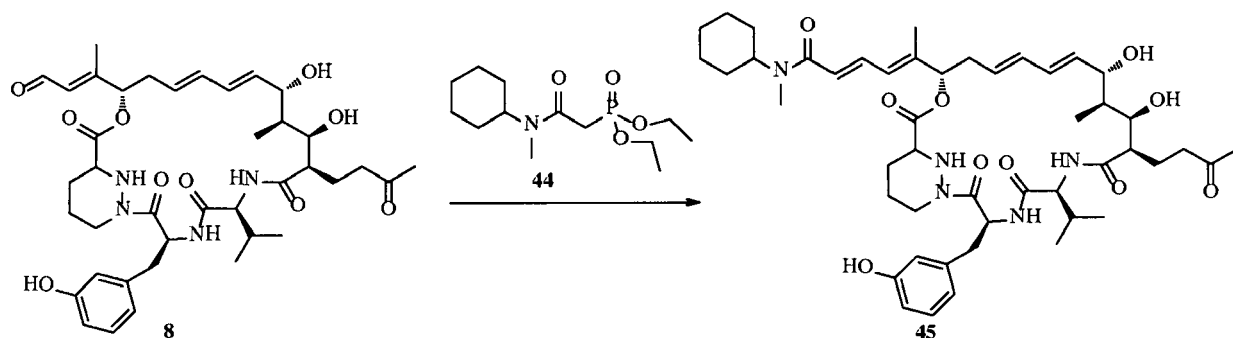


15

Se agitó una mezcla de 43 (en bruto, 400 mg, 2,11 mmol) y fosfito de trietilo (701 mg, 4,22 mmol) a 140°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 44 (265 mg, 43 %) como un líquido de color amarillo claro.

20

## 15.3 Síntesis de 45

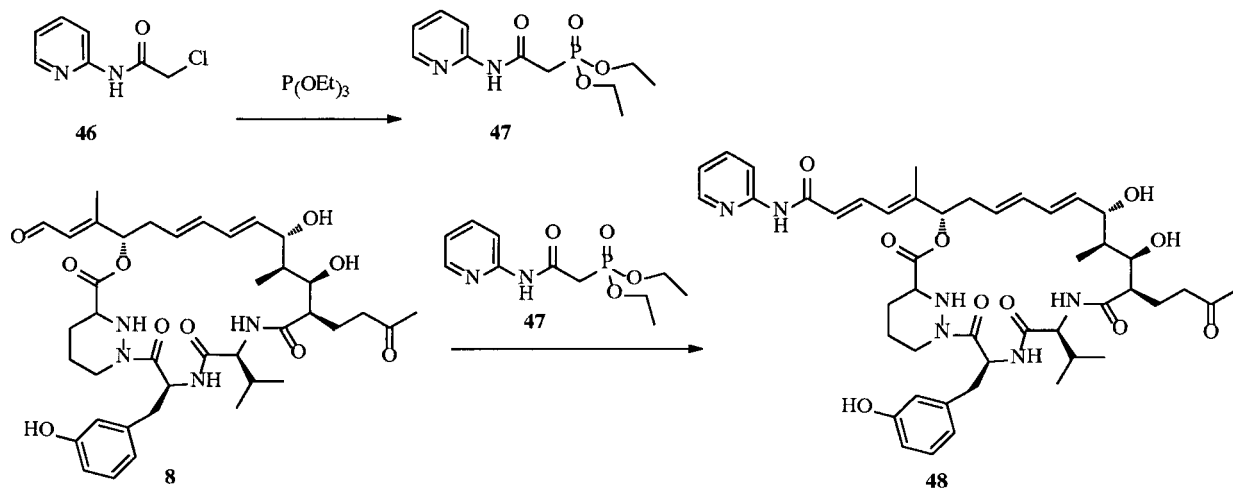


A una disolución de 44 (55 mg, 0,188 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,4 mg, 0,056 mmol) en THF anhidro

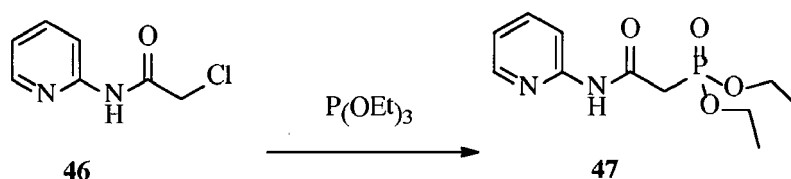
25

(0,2 ml) a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 (35 mg, 0,047 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (20 ml\*3). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 2,5 mg de producto puro 45 como un sólido blanco (rendimiento, 6%). CL-EM: 876 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 13 para <sup>1</sup>H-RMN.

#### Ejemplo 16 - Síntesis de 48

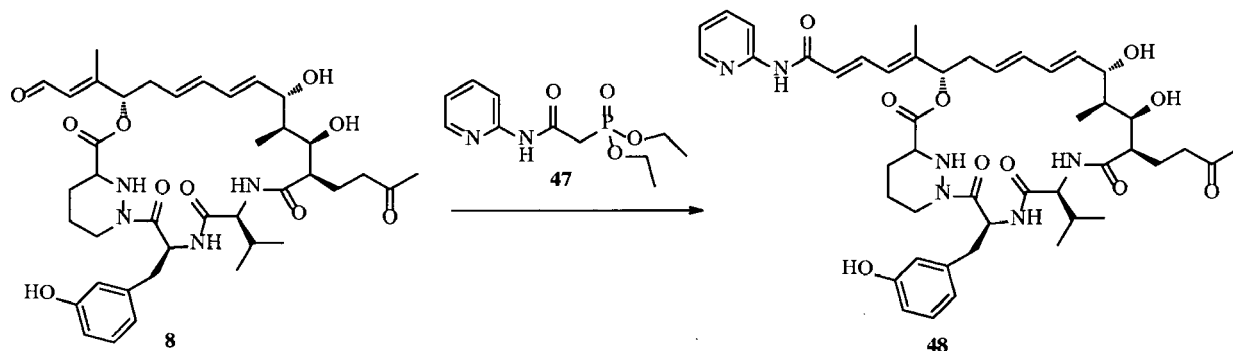


#### 16.1 Síntesis del producto intermedio 47



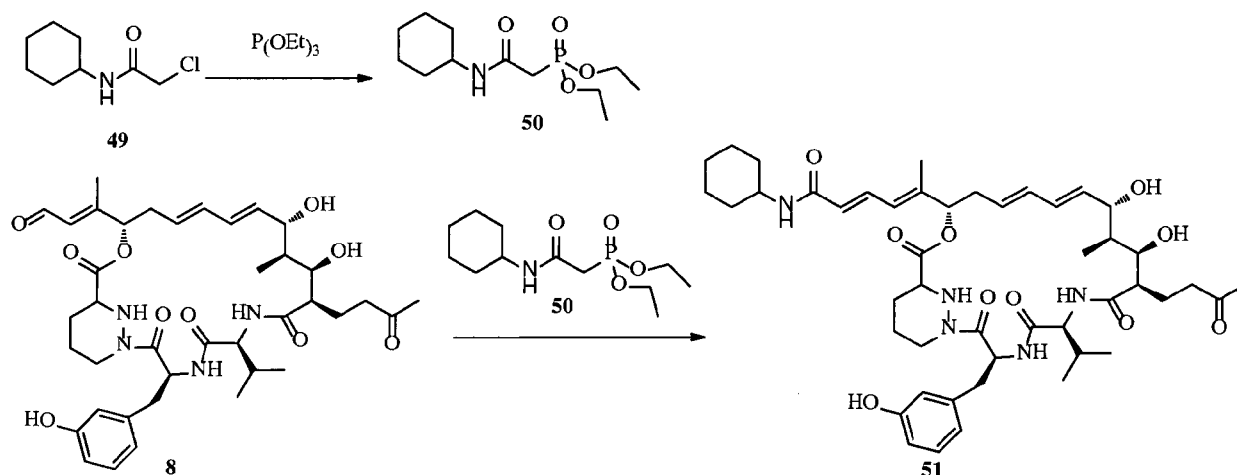
Se agitó una mezcla de 2-cloro-N-(piridin-2-il)acetamida (170 mg, 1,00 mmol) y fosfito de trietilo (332 mg, 2,00 mmol) a 140°C durante 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 47 (48 mg, 18%).

#### 16.2 Síntesis de 48

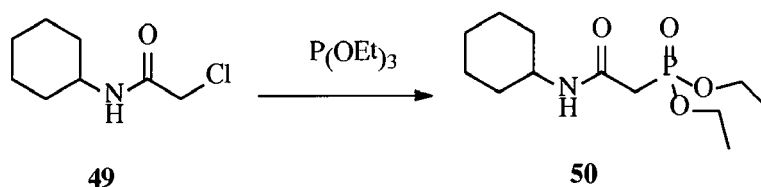


A una disolución de 47 (51 mg, 0,188 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (1,4 mg, 0,0564 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a ta con agitación. Entonces se añadió 8 (35 mg, 0,047 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con EA (30 ml\*3). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 19,7 mg de producto puro 48 como un sólido blanco (rendimiento, 48,5%). CL-EM: 857 [M+1]<sup>+</sup>.

#### Ejemplo 17 - Síntesis de 51



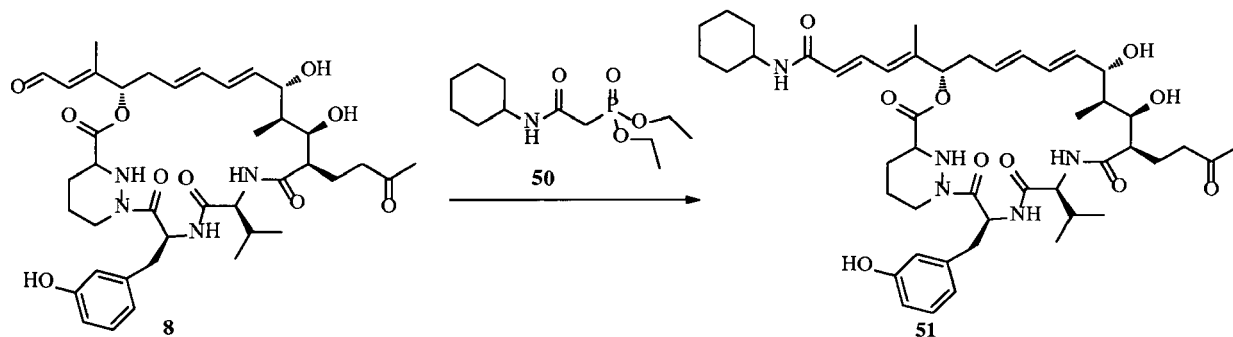
## 17. Síntesis del producto intermedio 49



5

Se agitaron 49 y 2 equivalentes de fosfito de trietilo a 120°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante cristalización para dar el producto intermedio 50.

## 10 17.2 Síntesis de 51



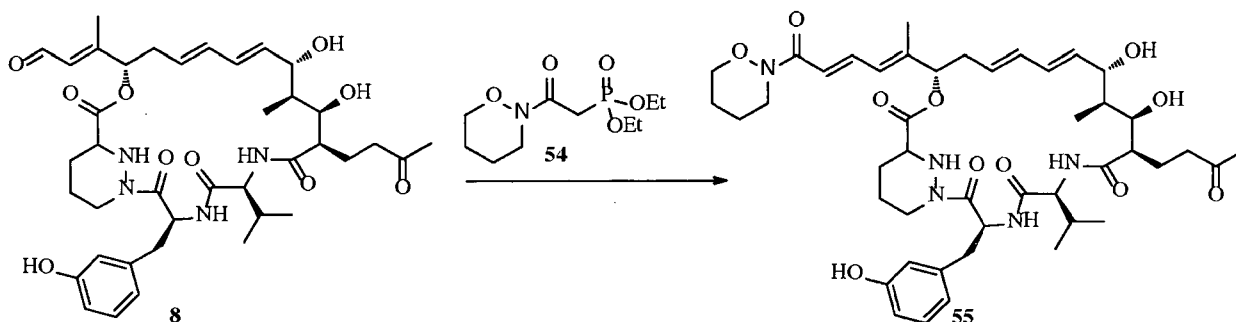
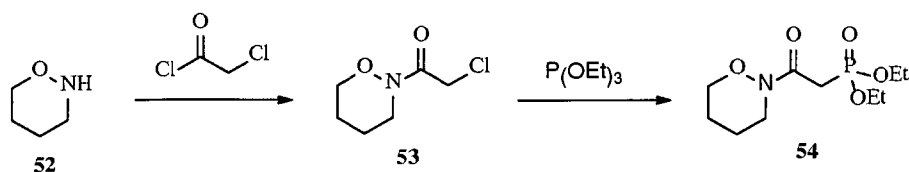
A una disolución de 50 en THF se le añadió NaH en THF anhidro a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 (30 mg) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a ta durante 3 h. Se extinguió la mezcla con agua y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante CCF prep. y HPLC prep. para obtener 2,4 mg de producto puro 51 como un sólido blanco. CL-EM: 862 [M+1]<sup>+</sup>. Véase la figura 14 para <sup>1</sup>H-RMN.

15

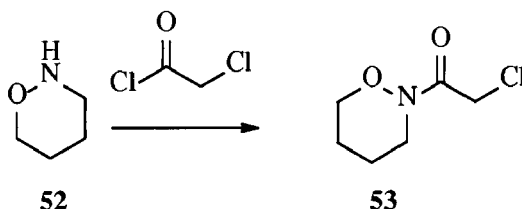
20

Ejemplo 18 - Síntesis de 55





## 18.1 Síntesis del producto intermedio 53

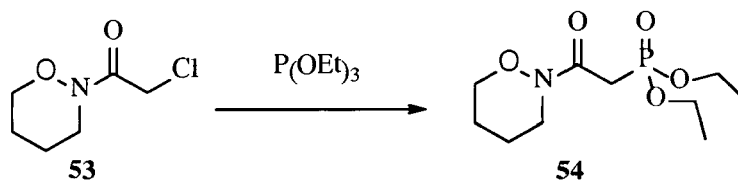


5

A una disolución de 52, Et<sub>3</sub>N en DCM seco se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo. Se agitó la mezcla de reacción a 0-10°C durante 30 minutos, y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica para dar un líquido que se usó en la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional.

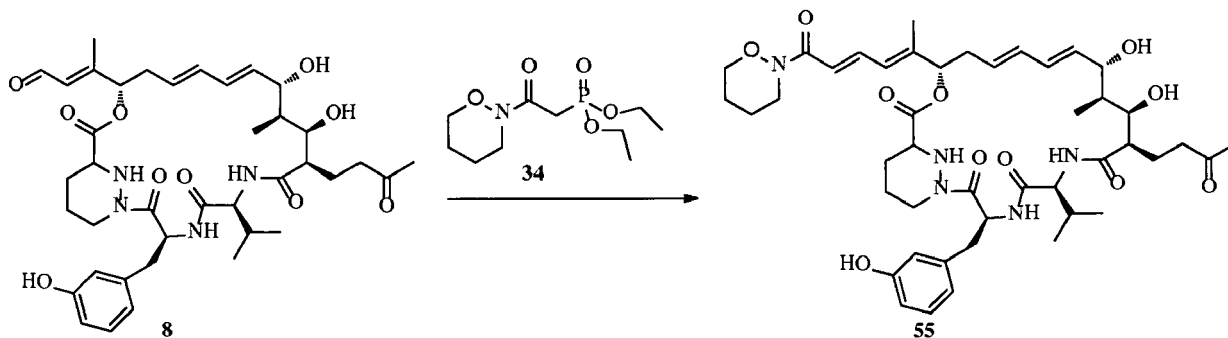
10

## 18.2 Síntesis del producto intermedio 54



Se agitó una mezcla de 53 y fosfito de trietilo a 120°C durante la noche. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante Combiflash para dar el producto intermedio 54.

## 18.3 Síntesis de 55



20

A una disolución de 54 en THF se le añadió NaH en THF anhidro a 0°C con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Entonces se añadió 8 a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente. Se extinguió la mezcla con agua y se extrajo con acetato

de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró, se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC prep. para obtener 55 como un sólido blanco. CL-EM: 850 [M+1]<sup>+</sup>.

Ejemplo 19 - Datos biológicos - Evaluación *in vitro* de la actividad antiviral contra VHC en el sistema de replicón

5 Se analizaron los compuestos en el ensayo de replicón tal como se describe en los métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, sangliferina A, 5 y el hidroximacrocielo, 6 como comparación.

Nombre	CE <sub>50</sub>	CE <sub>90</sub>	CC <sub>50</sub>	Índice de selectividad (CC <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> )
Ciclosporina A, 1	0,2	0,678	4,3	21,5
Sangliferina A, 5	0,318	5,5	9,1	28,7
6	8,4	39,7	83,6	9,9
10	0,162	0,921	>100	>617
13	0,204	1,2	>100	>490
16	0,56	4,6	>100	>179
19	8	60,2	>100	>80
22	0,349	6,2	>100	>287
25	1,6	8,5	48,4	30
28	0,628	4	17,7	28,2
29	0,293	1,5	20,2	68,4
32	0,309	1,1	2,1	6,9
35	1,66	0,737	39,7	238,1
41	0,208	1,1	>100	>481
45	0,148	1,9	66,4	449
48	0,167	0,737	39,7	238,1
51	0,336	4,2	>100	>298
55	0,125	0,691	>100	>800

10 Tal como puede observarse, 10, 13, 16, 22, 28, 29, 32, 41, 45, 48, 51 y 55 son todos muy potentes en el ensayo de replicón Huh5.2 (tal como se muestra por la baja CE<sub>50</sub>), mostrando también la mayoría de ellos baja citotoxicidad contra la línea celular (tal como se muestra por una alta CC<sub>50</sub>). El hidroximacrocielo de sangliferina macrocíclica, 6, descrito anteriormente es menos potente en la inhibición de VHC, y ciclosporina A, 1 y sangliferina A, 5 muestran ambas más citotoxicidad.

15 Ejemplo 20 - Solubilidad en PBS

Se analizó la solubilidad de los compuestos en PBS pH 7,4 tal como se describe en los métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1 y sangliferina A, 5 como comparación.

20

Nombre	Solubilidad (µM)
Ciclosporina A, 1	51,3
Sangliferina A, 5	9,4
10	>100
13	>100
19	>100
22	>100
25	96
28	78
29	66
32	33
48	61
55	>100

Tal como puede observarse, los compuestos de la invención, 10, 13, 19, 22, 25, 28, 29, 48 y 55 tienen todos solubilidad aumentada en comparación con sangliferina A (5) y con respecto a ciclosporina A (1).

25 Ejemplo 21 - Datos biológicos - Actividad contra VIH

Se analizaron los compuestos en un ensayo antiviral contra VIH usando células diana primarias e inmortalizadas tal como se describe en los métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, y sangliferina B, 7, como comparación.

Nombre	Células HeLa	Células T	Linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	Macrófagos
	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Ciclosporina A, 1	5,3	3,5	3,3	9,4
29	0,4	0,2	0,21	0,31
48	0,25	0,11	0,14	0,21
55	0,31	0,22	0,15	0,23

Tal como puede observarse, los compuestos de la invención 29, 48, 55 son todos significativamente más potentes que ciclosporina A, 1 en la inhibición de la infección por VIH de cuatro tipos de células.

5 Ejemplo 22 - Datos biológicos - Actividad contra VHB

Se analizaron los compuestos en el ensayo de replicón tal como se describe en los métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, y sangliferina A, 7, como comparación.

Nombre	VHB CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CT <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	Índice terapéutico (IT <sub>50</sub> )
Ciclosporina A, 1	5,22	7,53	1,44
29	<0,1	>32	>320
48	>32	>32	1

10 Tal como puede observarse, el compuesto de la invención, 29, es notablemente potente en la inhibición de la replicación de VHB, y no muestra citotoxicidad a concentraciones de hasta 32  $\mu$ M, lo que conduce a un índice terapéutico grande.

15 Ejemplo 23 - Datos biológicos - Evaluación de la actividad inmunosupresora en una reacción linfocitaria mixta (MLR)

La actividad inmunosupresora es un efecto secundario no deseado para su uso como terapia antiviral. Por tanto se sometieron a prueba los compuestos en una reacción linfocitaria mixta (MLR) tal como se describe en los métodos generales. Se incluyeron ciclosporina A, 1, y sangliferina A, 5, como comparación.

20

Nombre	MLR humana Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Ciclosporina A, 1	0,003
Sangliferina A, 5	0,215
48	1,06
55	1,45

Tal como puede observarse, los compuestos de la invención, 48 y 55, muestran ambos niveles muy bajos de actividad inmunosupresora, y son todos menos inmunosupresores que CsA, 1, y SfA, 5.

25 Ejemplo 23 - Datos biológicos - Inhibición de ciclofilina D

Para investigar la interacción de los compuestos de prueba con ciclofilina D, se usó el ensayo de alteración de CypD-NS5A, tal como se describe en los métodos generales.

Nombre	Alteración de CypD-NS5A, Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Ciclosporina A, 1	0,91
Sangliferina A, 5	0,37
29	0,25
48	0,38
55	0,23

30 Tal como puede observarse, los compuestos de la invención, 29, 48 y 55, muestran todos una potente alteración del complejo CypD-NS5A, a un nivel más potente que CsA, 1, y SfA, 5. También se confirmó que estos ensayos proporcionaban datos comparables (y órdenes de clasificación similares) a un ensayo de PPIasa que mide la inhibición directa de la actividad CypD isomerasa (datos no mostrados - véanse los métodos generales para detalles de la metodología).

35

Ejemplo 24 - Generación de cepas de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) (BIOT-4370) modificadas por bioingeniería en las que el bucle reductor del módulo 12 de la agrupación biosintética para la biosíntesis de

sangliferina se reemplaza por el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina o el módulo 6 de sangliferina usando una estrategia de cambio de bucle reductor.

5 El bucle reductor del módulo 12 de sangliferina contiene una cetorreductasa que es responsable del grupo hidroxilo en C17 de la molécula de sangliferina. Los bucles reductores tanto del módulo 13 de rapamicina como el módulo 6 de sangliferina contienen todos los dominios funcionales para dar como resultado el procesamiento completo del grupo beta-ceto para dar como resultado un metileno; específicamente contienen una cetorreductasa para reducir el grupo ceto a uno hidroxilo, una deshidratasa para eliminar agua y dar como resultado un doble enlace, y una enoil reductasa para reducir el doble enlace a un metileno. Los vectores pMGo136 y pMGo137 son vectores para  
10 modificar por ingeniería genética el reemplazo del bucle reductor del módulo 12 de la agrupación biosintética para la biosíntesis de sangliferina por el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina o el módulo 6 de sangliferina, respectivamente.

15 Las posiciones de los fragmentos de ADN usados en este ejemplo se facilitan según la secuencia disponible en enero de 2011 pero se notifica como una aproximación debido a que las secuencias de ADN de Genbank pueden actualizarse.

Los vectores se construyen tal como sigue:

20 24.1 El ADN homólogo a la región flanqueante en el sentido de 5' del bucle reductor del módulo 12 de sangliferina.

Este fragmento de ADN de 2072 pb (SEQ ID NO: 1) mostrado en la figura 16 contiene una región de homología en el sentido de 5' del bucle reductor del módulo 12 de sangliferina (aproximadamente desde 86654 pb - 88798 pb en el número de registro de Genbank de secuencia publicada FJ809786.1) junto con secuencias adicionales tanto en 5'  
25 como en 3' para incorporar secuencias de enzimas de restricción para ayudar en la clonación. Se sintetizó este fragmento (SEQ ID NO: 1) por GenScript (860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, EE.UU.) y se dotó, según el protocolo de GenScript de 12 bases flanqueantes protectoras en cada lado que no participan en la clonación más allá de este punto, en pUC57 dando como resultado el plásmido pMGo128.

30 24.2 Clonación de ADN homólogo a la región flanqueante en el sentido de 3' del bucle reductor del módulo 12 de sangliferina.

Se usaron los oligonucleótidos MGo013 (SEQ ID NO: 2) y MGo014 (SEQ ID NO: 3) para amplificar un fragmento de ADN de 1994 pb (SEQ ID NO: 4) en una reacción PCR convencional usando ADN del cósmido pTL3102 (Qu *et al.* 2011) como molde y la ADN polimerasa KOD Hot Start. Se diseñó una extensión en 5' en cada oligonucleótido para introducir sitios de restricción para facilitar la clonación del fragmento amplificado. Alternativamente, podría haberse usado ADN genómico de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) (BIOT-4370) como molde para esta reacción PCR para dar el mismo fragmento de ADN, o el fragmento de ADN podría obtenerse mediante síntesis de ADN por ejemplo usando GenScript (860 Centennial Ave., Piscataway, NJ 08854, EE.UU.). El producto de PCR de 1995 pb  
40 resultante (SEQ ID NO: 4) contiene una región de homología en el sentido de 3' del bucle reductor del módulo 12 de sangliferina (aproximadamente desde 90415 pb - 92381 pb en el número de registro de Genbank de secuencia publicada FJ809786.1) con una inserción no deseada, G en la posición 1978 (véase la figura 17; la G insertada está en negrita y subrayada). Se clonó el producto de PCR de 1995 pb (SEQ ID NO: 4) en pUC19 (New England Biolabs) que se había linealizado con *SmaI* y se desfosforiló, dando como resultado el plásmido pMGo123.

45 MGo013 5' GCTCTCGAGGCGGCTAGCCTCCCTGCCCGAGGCCG  
XhoI NheI  
(SEQ ID NO: 2)

MGo014 5' AGAAAGCTTCGGCCCGGTCGGCGCCCTGGGCC  
HindIII  
(SEQ ID NO: 3)

50 La orientación del producto de PCR de 1995 pb (SEQ ID NO: 4) en pUC19 era tal que el sitio *HindIII* en el inserto estaba adyacente al sitio *HindIII* del poliligador de pUC19. Se confirmó la secuencia del inserto en pMGo123 mediante secuenciación.

55 Con el fin de evitar que la región contenga la base adicional, se seleccionó como diana una región en el sentido de 3' más corta tal como sigue: Se usaron los oligonucleótidos MGo037 (SEQ ID NO: 5) y MGo038 (SEQ ID NO: 6) para amplificar un fragmento de ADN de 1956 pb (SEQ ID NO: 7) en una reacción PCR convencional usando el ADN de plásmido pMGo123 como molde y la ADN polimerasa KOD Hot Start. Se diseñó una extensión en 5' en cada oligonucleótido para introducir sitios de restricción para facilitar la clonación del fragmento amplificado. El producto de PCR de 1956 pb (SEQ ID NO: 7) contiene una región de homología en el sentido de 3' del bucle reductor del  
60 módulo 12 de sangliferina (aproximadamente desde 90415 pb - 92343 pb en el número de registro de Genbank de

## ES 2 541 853 T3

secuencia publicada FJ809786.1). Se clonó el producto de PCR de 1956 pb (SEQ ID NO: 7) en pUC19 (New England Biolabs) que se había linealizado con *Sma*I y se desfosforiló, dando como resultado el plásmido pMGo125.

MGo037      5' GCTCTCGAGGCGGCTAGCCTCCCTG  
                                    *Xho*I      *Nhe*I

(SEQ ID NO: 5)

5

MGo038      5' AAAAAGCTTGC GG GGT CGG GGT GCC GGC GG C GAC  
                                    *Hind*III

(SEQ ID NO: 6)

La orientación del producto de PCR de 1956 pb (SEQ ID NO: 7) en pUC19 era tal que el sitio *Hind*III en el inserto estaba adyacente al sitio *Hind*III del poliligador de pUC19. Se confirmó la secuencia del inserto en pMGo125 mediante secuenciación.

10

24.3 Estrategia de clonación para generar pMGo136 y pMGo137.

Las regiones en el sentido de 5' y en el sentido de 3' de homología del bucle reductor de sangliferina del módulo 12 se clonan juntas tal como sigue: La región en el sentido de 5' de 2065 pb se corta de pMGo128 mediante digestión con *Eco*RI y *Xho*I y la región en el sentido de 3' de 1944 pb se corta de pMGo125 mediante digestión con *Xho*I y *Hind*III. Se clonan ambos fragmentos juntos en el fragmento de estructura principal grande generado cuando se digiere pUC19 (New England Biolabs) con *Eco*RI y *Hind*III en un ligamiento de tres partes. Se identifican plásmidos que contienen ambos insertos correctamente clonados mediante análisis con enzimas de restricción, un plásmido correcto se designa pMGo130.

15

20

Se diseña pMGo130 de manera que un bucle reductor en un fragmento de *Nhe*I/*Bgl*II adecuado pueda clonarse en los sitios *Nhe*I y *Bgl*II para producir una parte de un módulo de PKS de tipo I en el que la secuencia de ADN está en marco y puede traducirse para dar una secuencia de aminoácidos. El posicionamiento exacto de estos sitios en el bucle entrante es crucial en el mantenimiento del marco de la secuencia y su traducción para dar una secuencia de aminoácidos funcional.

25

*Fuente de bucle reductor del módulo 13 de rapamicina:* El bucle reductor del módulo 13 de rapamicina se ha usado previamente como bucle donador en otros sistemas (por ejemplo Gaisser *et al.*, 2003). El bucle del módulo 13 de rapamicina, flanqueado por regiones de homología apropiadas del módulo 2 de avermectina está presente en pPF137 (Gaisser *et al.*, 2003). pPF137 se construye a partir de pJLK137 tal como se describe en Gaisser *et al.* 2003. La descripción completa de la construcción de pJLK137 está contenida dentro de la solicitud de patente internacional WO 00/01827/1998 y referencias en la misma. Sigue un breve resumen: Se aisló el bucle del módulo 13 de rapamicina mediante amplificación por PCR usando los siguientes oligonucleótidos

30

35

5' TAAGATCTTCCGACCTACGCCTTCCAAC  
                                    *Bgl*II

(SEQ ID NO: 8)

5' TAAATGCATCGACCTCGTTGCGTGCCGCGGT  
                                    *Nsi*I

(SEQ ID NO: 9)

que contiene sitios de enzimas de restricción introducidos, y usando el molde cos 31 de rapamicina (Schwecke *et al.* 1995). Se clonó este fragmento en pUC18 digerido previamente con *Sma*I y se desfosforiló para dar pJLK120. Entonces se introdujo este bucle en pJLK133, que se construyó tal como sigue: Se eliminó el ligador de pJLK117 en un fragmento de *Bgl*II/*Nhe*I y se clonó entre 2 regiones de homología al módulo 2 de avermectina para dar pJLK133. Se clonó el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina a partir de pJLK120 como un fragmento de *Bgl*II/*Nsi*I en pJLK133 digerido con *Bgl*II/*Nsi*I.

40

45

pJLK117 (se hace referencia a la solicitud de patente internacional WO 00/01827/1998 y referencias en la misma) es un plásmido de expresión que contiene un gen de PKS que comprende el módulo de carga de eritromicina, los módulos de extensión primero y segundo de la PKS de eritromicina y la tioesterasa de terminación de cadena de eritromicina, excepto porque el segmento de ADN entre el final de la aciltransferasa (AT) y el comienzo de la proteína portadora de acilo (ACP) se ha sustituido por un ligador de oligonucleótido sintético que contiene los sitios de reconocimiento de las siguientes enzimas de restricción; *Avr*II, *Bgl*II, *Sna*BI, *Pst*I, *Spe*I, *Nsi*I, *Bsu*36I y *Nhe*I y se

50

preparó en múltiples etapas tal como se describe en la solicitud de patente. Se seleccionaron estos sitios de enzimas de restricción debido a que pueden incorporarse con alteración mínima en la secuencia de proteína original en el módulo 2 de la PKS de eritromicina. El vector que contiene el primer ligador, pJLK114, contiene el generado por el apareamiento de los oligonucleótidos Plf (SEQ ID NO: 10) y Plb (SEQ ID NO: 11).

5 Plf  
 5' CTAGGCCGGCCGGACTGGTAGATCTGCCTACGTATCCTTTCCAGGGCAAGCGGTTCTGGCTGCAGCC  
 GGACCGCACTAGTCCTCGTGACGAGGGAGATGCATCGAGCCTGAGGGACCGGTT  
 (SEQ ID NO: 10)

Plb  
 5' AACCGGTCCCTCAGGCTCGATGCATCTCCCTCGTCACGAGGACTAGTGCGGTCCGGCTGCAGCCAGAA  
 CCGCTTGCCCTGGAAAGGATACGTAGGCAGATCTACCAGTCCGGCCCGGC  
 (SEQ ID NO: 11)

10 Se construyó el plásmido pJLK117 reemplazando el extremo 5' del ligador de pJLK114 por un fragmento en el que la única diferencia es que el sitio *HpaI*, GTTAAC, se reemplaza por un sitio *NheI*, GCTAGC.

La fuente del bucle reductor del módulo 13 de rapamicina en este ejemplo es pPF137. Un experto en la técnica apreciará que no es necesario seguir esta compleja serie de etapas con el fin de obtener este fragmento. Puede obtenerse el mismo fragmento tal como sigue: En primer lugar, la región de clonación múltiple de pUC18, o pUC19 puede reemplazarse por un ligador sintético que contiene los sitios *BglII*, *NsiI* y *NheI*, por ejemplo esto podría lograrse digiriendo el vector pUC con *EcoRI* y *HindIII* y usando dos oligonucleótidos para preparar un ligador sintético con los sitios enumerados anteriormente, que, cuando se aparean, dejan que las proyecciones apropiadas se ligen en la estructura principal digerida. La incorporación de la secuencia del ligador de pJLK117 entre los sitios *NsiI* y *NheI* proporcionará parte de la secuencia requerida y el resto puede obtenerse mediante amplificación por PCR a partir de un cósmido tal como cos 31 de rapamicina o ADN genómico de *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 y los oligonucleótidos mostrados como SEQ ID NO: 08 y SEQ ID NO: 09. Esto proporciona el bucle del módulo 13 de rapamicina en un fragmento de *BglII/NsiI* que puede clonarse en los sitios *BglII/NsiI* del vector pUC modificado y luego el bucle deseado clonado como un fragmento de *BglII/NheI*.

25 Alternativamente, el bucle del módulo 13 de rapamicina podría amplificarse directamente como un fragmento de *BglII/NheI* por ejemplo usando los oligonucleótidos SEQ ID NO: 8 tal como se mostró anteriormente y SEQ ID NO: 12

30 5'TAGCTAGCCGGGCGCTCAGGGGCTGCGAGCCGACCT  
 (SEQ ID NO: 12)

Se clonó el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina a partir de pPF137 en pKC1139WMB02 como un fragmento de *BglII/NheI* para dar pKC1139WMB02-137. pKC1139WMB02 es un plásmido basado en pKC1139 y contiene un fragmento de ADN de 7,8 kb que contiene el bucle reductor del módulo 11 de rapamicina y regiones flanqueantes. Se ha modificado por ingeniería genética de manera que el bucle reductor puede cortarse como un fragmento de *BglII/NheI* y reemplazarse por otros bucles. Se construyó pKC1139WMB02-137 para efectuar un cambio de bucles en rapamicina y contiene el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina con regiones flanqueantes a partir del módulo 11 de rapamicina. En este ejemplo, se clona el bucle del módulo 13 de rapamicina a partir de pKC1139WMB02-137 como un fragmento de *BglII/NheI*. Este es el fragmento idéntico que puede obtenerse a partir de pPF137, o pJLK120 o llevando a cabo una reacción PCR equivalente usando las secuencias de oligonucleótidos proporcionadas y ADN genómico y clonándolo en un vector adecuado tal como pUC18 o pUC19.

45 El bucle reductor de sangliferina del módulo 6 se obtiene tal como sigue: Se usan los oligonucleótidos MGo019 (SEQ ID NO: 13) y MGo020 (SEQ ID NO: 14) para amplificar un fragmento de ADN de 3176 pb (SEQ ID NO: 15) en una reacción PCR convencional usando ADN polimerasa KOD Hot Start y la fracción de 5 kb - 6 kb de ADN genómico digerido con *AlwNI* de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) (BIOT-4370) como molde. Esta fracción contiene el fragmento de *AlwNI* de 5402 pb de la agrupación génica de sangliferina (aproximadamente desde 56578 pb - 61979 pb en el número de registro de Genbank de secuencia publicada FJ809786.1). Alternativamente, se usa ADN genómico no digerido de *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) (BIOT-4370) como molde. Se obtiene ADN genómico usando el kit de purificación de ADN genómico bacteriano de Edge BioSystems (Edge BioSystems, 201 Perry Parkway, Suite 5, Gaithersburg, MD 20877, EE.UU.). Se diseña una extensión en 5' en cada oligonucleótido para introducir sitios de restricción para facilitar la clonación del fragmento amplificado en marco con las regiones flanqueantes. El producto de PCR de 3176 pb (SEQ ID NO: 15) contiene el bucle reductor del módulo 6 de

sangliflerina (aproximadamente desde 57166 pb - 60326 pb en el número de registro de Genbank de secuencia publicada FJ809786.1). Se clona el producto de PCR de 3176 pb (SEQ ID NO: 15) en pUC19 (New England Biolabs) que se ha linealizado con *Sma*I y desfosforilado, dando como resultado el plásmido pMGo127.

MGo019 5' CCGTAGATCTGCCACCTACGCCTTCCAGCGCG  
BgII

5 (SEQ ID NO: 13)

MGo020 5' TCCGGCTAGCCGTTGGGGCAGCGCGG  
NheI

(SEQ ID NO: 14)

10 pKC1139WMB02-137 y pMGo127 se digieren cada uno con *Nhe*I y *Bg*/II para aislar el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina y el bucle reductor del módulo 6 de sangliflerina. Se clona cada bucle en pMGo130 digerido con *Nhe*I y *Bg*/II. Se analizan los plásmidos que contienen insertos mediante análisis con enzimas de restricción, un plásmido correcto que contiene el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina se designa pMGo132 y un plásmido correcto que contiene el bucle reductor del módulo 6 de sangliflerina se designa pMGo133.

15 pMGo132 y pMGo133 contienen cada uno un inserto de ADN apropiado para efectuar un cambio de bucles reductores en el módulo 12 de sangliflerina mediante recombinación doble. Se clona cada inserto como un fragmento de *Eco*RI/*Hind*III en pKC1139 digerido con *Eco*RI y *Hind*III para proporcionar funciones de plásmido adecuadas para la transformación de *Streptomyces* sp. y la selección de transformantes así como un origen sensible a la temperatura. Se analizan los plásmidos que contienen insertos mediante análisis con enzimas de restricción, un plásmido correcto que contiene el fragmento con el bucle reductor del módulo 13 de rapamicina se designa pMGo136 y un plásmido correcto que contiene el fragmento con el bucle reductor del módulo 6 de sangliflerina se designa pMGo137.

25 23.4 Conjugación de *Streptomyces* sp. A92-308110 (DSM9954) (BIOT-4370) y modificación por ingeniería genética de un cambio de bucles reductores en el módulo 12 de sangliflerina.

Se transforman los plásmidos pMGo136 y pMGo137 en *E. coli* ET12567 pUZ8002 usando técnicas convencionales y se seleccionan en placas con 2TY que contienen apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (12,5 µg/ml). Se usan las cepas resultantes para inocular 3 ml de 2TY líquido que contiene apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (12,5 µg/ml) y se incubaron durante la noche a 37°C, 250 rpm. Se usan 0,8 ml de cada cultivo para inocular 10 ml de 2TY líquido que contiene apramicina (50 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y cloranfenicol (12,5 µg/ml) en un tubo Falcon de 50 ml y se incuba a 37°C, 250 rpm hasta que se alcanza una DO<sub>600 nm</sub> ~0,5. Se centrifugan los cultivos resultantes a 3500 rpm durante 10 min a 4°C, se lavan dos veces con 10 ml de medio 2TY usando centrifugación para sedimentar las células tras cada lavado. Se resuspenden los sedimentos resultantes en 0,5 ml de 2TY y se mantienen en hielo listos para su uso. Este procedimiento se sincroniza para coincidir con la finalización de la preparación de esporas de *Streptomyces* descrita a continuación.

40 Se recogen 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% y dividiendo por igual entre 2 tubos Eppendorf. Alternativamente, se usan ~1,5 ml de una suspensión de esporas crioconservada preparada del mismo modo. Se centrifugan las esporas (6000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) y se lavan dos veces con 1 ml de tampón TES 50 mM antes de resuspender en 0,5 ml de tampón TES 50 mM. Se somete este tubo a choque térmico a 50°C durante 10 min en un baño de agua antes de añadir 0,5 ml de medio TSB e incubar en un termomezclador Eppendorf compacto a 37°C durante 4-5 horas.

45 Se mezclan cada una de las *E. coli* ET12567 pUZ8002 pMGo136 y *E. coli* ET12567 pUZ8002 pMGo137 preparadas con BIOT-4370 a razones 1:1 (100 µl cada cepa) y 1:3 (100 µl de *E. coli* + 300 µl de BIOT-4370) y se extienden inmediatamente sobre placas R6 y se transfieren a un incubador a 37°C. Tras aproximadamente 2 horas de incubación, se recubren estas placas con 2 ml de agua estéril que contiene ácido nalidixico para dar una concentración final en la placa de 50 µg/l. Se devuelven las placas al incubador a 37°C durante la noche antes del recubrimiento con 2 ml de agua estéril que contiene apramicina para dar una concentración final en la placa de 20-25 µg/l. Alternativamente, se incuban inicialmente las placas durante 16-18 horas, luego se recubren con la disolución de ácido nalidixico y se permite que se sequen durante 1-2 horas antes de cubrirse con la disolución de apramicina. Aparecen colonias exconjugantes tras ~4-7 días y se disponen en parches sobre medios ISP4 que contienen apramicina (25 µg/l) y ácido nalidixico (50 mg/l) y se incuban a 37°C. La incubación a 37°C en presencia de apramicina debe garantizar que se produce la integración del plásmido, puesto que el origen sensible a la temperatura no funciona a esta temperatura. La integración debe producirse en una de las regiones flanqueantes en las que hay homología entre el genoma y el inserto de plásmido. Una vez que se observa un crecimiento micelial adecuado, vuelven a disponerse las cepas en parches en medios ISP4 que contienen apramicina (25 µg/l) a 37°C y

se permite que esporulen. Entonces se subcultivan las cepas tres veces (para promover la eliminación del plásmido sensible a la temperatura) disponiendo en parches en ISP4 (sin antibiótico) e incubando a 37°C durante 3-4 días cada vez. Finalmente se disponen en parches las cepas sobre ISP4 y se incuban a 28°C para permitir la esporulación (5-7 días). Se recogen las esporas y se diluyen en serie sobre placas con ISP4 a 28°C para permitir la selección de colonias individuales. Se disponen en parches por duplicado las colonias individuales esporuladas en placas con ISP4 con y sin apramicina (25 µg/l) para identificar colonias que pierden el plásmido y se permite que crezcan ~7 días antes de someterlas a prueba para detectar la producción de sangliferinas y análogos de sangliferina. Las cepas seleccionadas para el análisis son las que no crecen en presencia de apramicina, lo que indica la pérdida del marcador de resistencia de manera deseable mediante recombinación secundaria.

#### 24.5 Examen de cepas para detectar la producción de sangliferinas y análogos de sangliferina en tubos Falcon

Se usa un único tapón de agar de ~7 mm de cada parche bien esporulado para inocular 7 ml de medios SM25-3 estériles y se incuba a 27°C, 200 rpm en un agitador con un desplazamiento vertical de 2 pulgadas. Tras 48 horas de crecimiento, se transfieren 0,7 ml de cada cultivo a un tubo Falcon esterilizado que contiene 7 ml de medios SGP6 (Nutrisoy 30 g/l (harina de soja tostada), glicerol 60 g/l, MOPS 21 g/l; pH 6,8) con resina HP20 al 5%. Se hacen crecer los cultivos a 24°C, 300 rpm en un incubador con agitación con un desplazamiento vertical de 1 pulgada durante 5 días antes de la recogida. Se retiran 0,8 ml de cada cultivo bacteriano y se añaden alícuotas a un tubo Eppendorf de 2 ml asegurándose que se produce la dispersión adecuada de la resina por todo el cultivo antes de añadir las en alícuotas. Se añaden 0,8 ml de acetonitrilo y 15 µl de ácido fórmico y se mezcla el tubo durante 30 min. Se clarifica la mezcla mediante centrifugación y se retiran 150 µl del extracto en un vial de HPLC y se analizan mediante HPLC.

#### 24.6 Análisis de cepas para determinar la reversión al tipo natural o el cambio del bucle del módulo 12.

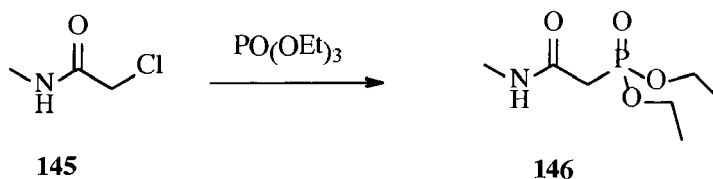
Se analizan los extractos de cepas mediante HPLC. Las cepas que producen sangliferina A y B no se analizan adicionalmente ya que este resultado indica reversión al tipo natural. Se continúa con las cepas que carecen de producción de sangliferina A y B y que muestran picos consecuentes con la producción de 17-desoxi-sangliferina A y 17-desoxi-sangliferina B.

#### Ejemplo 25 - Aislamiento de 17-desoxi-sangliferina A y generación de derivados semisintéticos.

Se hace crecer entonces una cepa que produce 17-desoxi-sangliferina A y/o B usando un método similar al descrito en el ejemplo 1, se aísla el compuesto usando un método similar al descrito en el ejemplo 2, y se genera el aldehído usando un método similar al descrito en el ejemplo 3. Entonces se usa esto como molde para la semisíntesis tal como se describe para generar compuestos de fórmula 1.

#### Ejemplo 26 - Síntesis de 144

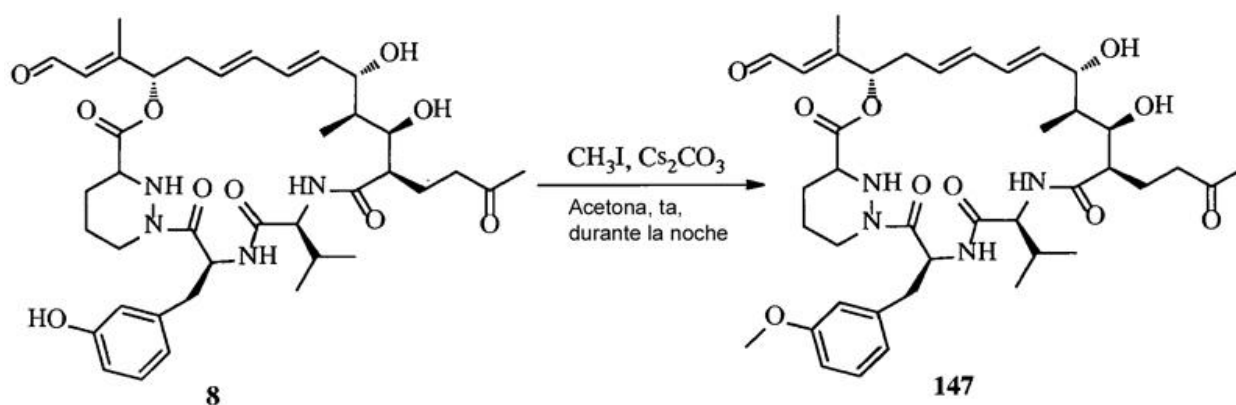
##### Síntesis del producto intermedio 146



Se agitó una mezcla de *N*-metilcloroacetamida (145, 200 mg, 1,87 mmol) y fosfito de trietilo (0,67 ml, 3,74 mmol) a 130°C durante 8 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante HPLC prep. para dar el producto intermedio 146 (60 mg, 15%) como un aceite incoloro.

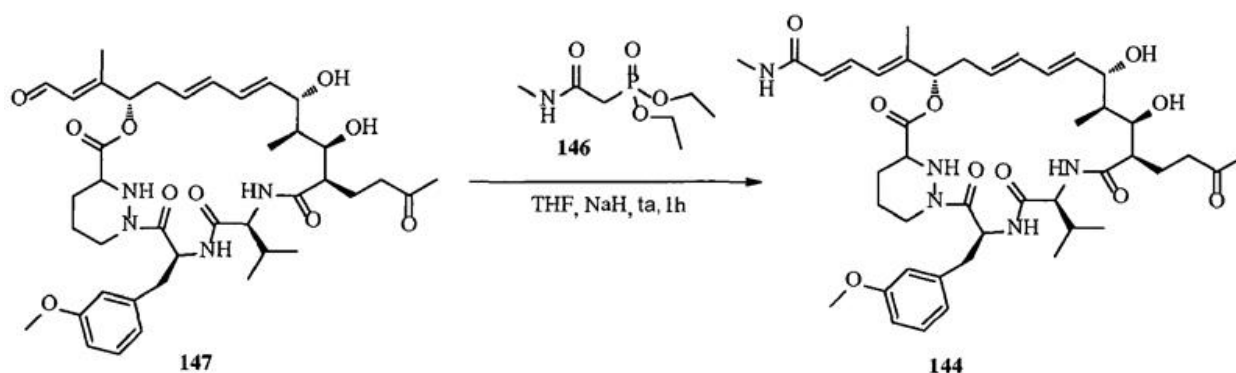
##### Síntesis de 147





Se añadió  $\text{CH}_3\text{I}$  (13,5  $\mu\text{l}$ , 0,203 mmol) a una disolución en acetona (4,0 ml) con agitación de **8** (50 mg, 0,068 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (75 mg, 0,203 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante la noche y se concentró a vacío. Se extrajo el residuo con acetato de etilo y se lavó con agua. Se secaron las fases orgánicas con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se evaporaron, se purificó el residuo mediante CCF prep. (acetona/petróleo=1,2/1) para conseguir 22 mg de **147** (puro al 86%) que se usaron directamente para la siguiente etapa.

Síntesis de **144**



A una suspensión de NaH (1,052 mg, 0,044 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) se le añadió gota a gota una disolución de **146** (24,5 mg, 0,117 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  a  $-3^\circ\text{C}$  con agitación. Entonces se agitó la disolución a temperatura ambiente hasta que se volvió transparente. Se añadió gota a gota una disolución de **147** (22 mg) en THF anhidro (0,6 ml) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se extinguió la mezcla con agua y se evaporó el THF a presión reducida. Se extrajo el residuo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera, luego se secó. Se eliminó el disolvente a vacío y se purificó el residuo mediante CCF preparativa (acetona/petróleo=1,3/1) para obtener 12 mg de **144** en bruto que se purificó de nuevo mediante HPLC preparativa para producir el producto como un sólido blanco (5 mg, 20%). CL-EM: 808  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

### Bibliografía

- Aparicio JF, Molnar, I, *et al.* (1996) "Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase." *Gene* 169:9-16.
- 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.
- Ayoub, W.S. y Keefe, E.B. (2008). "Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B". *Aliment Pharmacol Ther* 28:167-177.
- Banteli, R., J. Wagner, *et al.* (2001). "Synthesis of derivatives of the novel cyclophilin-binding immunosuppressant sanglifehrin A with reduced numbers of polar functions." *Bioorg Med Chem Lett* 11 (12): 1609-12.
- Bevitt, D.J., Cortes, J. *et al.* (1992). "6-deoxyerythronolide D synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme." *J. Biochem.* 204:39-49.

- Bobardt, M.D., Cheng, G. *et al.*, (2008). "Hepatitis C virus NS5A anchor peptide disrupts human immunodeficiency virus". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(14):5525-5530.
- 5 Castro, A.P., Carvalho, T.M., *et al.*, (2003). "Redistribution of cyclophilin A to viral factories during vaccinia virus infection and its incorporation into mature particles." *J. Virol.* 77:9052-9068.
- Chatterji, U., M. Bobardt, *et al.* (2009). "The isomerase active site of cyclophilin A is critical for HCV replication." *J Biol Chem.* 284:16998-17005.
- 10 Chatterji, U., *et al.*, (2010) HCV resistance to cyclosporin A does not correlate with a resistance of the NS5A-cyclophilin A interaction to cyclophilin inhibitors. *J Hepatol.* 53(1): p. 50-6.
- Chen, Z., Mi, L. *et al.*, (2005). "Function of HAb18G/CD147 in invasion of host cells by severe acute respiratory syndrome coronavirus". *J. Infect. Dis.* 191:755-760.
- 15 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.
- 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 Investia Drugs* 18(2): 211-20.
- 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 USA* 94(24): 13093-8.
- 25 Du, H., y Yan, S.S. (2010). "Unlocking the Door to Neuronal Woes in Alzheimer's Disease: A $\beta$  and Mitochondrial Permeability Transition Pore". *Pharmaceuticals* 3:1936-1948.
- 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 Cycophilin Inhibitor Nim811 In Combination With Pegylated Interferon .2a In Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S379.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 Ferir, G., Kaptein, S. *et al.*, (2008). "Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: the past, the present and the future". *Rev. Med. Virol.* 18:19-34.
- Flisiak, R., A. Horban, *et al.* (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfectd with hepatitis C and human immunodeficiency virus." *Hepatology* 47(3): 817-26.
- 45 Forte, M., Gold, B.G. *et al.*, (2007). "Cyclophilin D inactivation protects axons in experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7558-7563.
- Fujimoto, K., Chen, Y. *et al.* (2010). "Targeting cyclophilin D and the mitochondrial permeability transition enhances  $\beta$ -cell survival and prevents diabetes in Pdx1 deficiency". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 10214-10219.
- 50 Furniss, B. S., Furniss, A.I., Vogel, A.I., Ed. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall.
- 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65

- Hanouille, X., Badillo A, Wieruszeski 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.* 284:13589-13601.
- 5 Han, X., Yoon, S.H. *et al.*, "Cyclosporin A and sanglifehrin A enhance chemotherapeutic effect of cisplatin glioma cells" *Oncology Reports* 23:1053-1062.
- 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.
- 10 Herrler, M., H. Bang, *et al.* (1994). "Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporine A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." *Mol Microbiol* 11(6): 1073-83.
- 15 Hite, M., Turner, S., Federici, C. (2003). "Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs". *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer.* Número de verano de 2003.
- Hopkins, S. Gavis, D. *et al.*, (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.
- 20 Inoue, K., K. Sekiyama, *et al.* (2003). "Combined interferon alpha2b and cyclosporine A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial." *J Gastroenterol* 38(6): 567-72.
- 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.
- 25 Ishii, N., K. Watashi, *et al.* (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication." *J Virol* 80(9): 4510-20.
- 30 Ke, J., Rozier, R. *et al.*, (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.
- 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.
- 35 Kaul, A., Stauffer, S. *et al.*, (2009). "Essential Role of Cyclophilin A for Hepatitis C Virus Replication and Virus Production and Possible Link to Polyprotein Cleavage Kinetics". *PLOS Pathogens* 5(8):e1000546.
- 40 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.
- 45 King, A.L., Swain, T.M. *et al.*, (2010) "Chronic ethanol consumption enhances sensitivity to Ca<sup>2+</sup>-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases cyclophilin D in liver" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 299(4):G954-966.
- Kubota, M., Kasahara, T. *et al.*, (2010). "Therapeutic implications of down-regulation of cyclophilin D in bipolar disorder". *International Journal of Neuropsychopharmacology* 13(10):1355-1368.
- 50 Liu, X., Sun, L. *et al.*, (2009). "Cyclophilin A interacts with influenza A virus M1 protein and impairs the early stage of the viral replication". *Cell Microbiol.* 11:730-741.
- 55 Malouitre, S., Dube, H. *et al.*, (2010). "Mitochondrial targeting of cyclosporin A enables selective inhibition of cyclophilin-D and enhanced cytoprotection after glucose and oxygen deprivation" *Biochem. J.* 425:137-148.
- 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.
- 60 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.
- 65 Martin, L.J. (2010). "The mitochondrial permeability transition pore: A molecular target for amyotrophic lateral sclerosis therapy". *Biochimica et Biophysica Acta* 1802:186-197.

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D., y 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.
- 20 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.
- Paeshuyse, J., A. Kaul, *et al.* (2006). "The non-immunosuppressive cyclosporine DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication *in vitro*." *Hepatology* 43(4): 761-70.
- 25 Palma, E., Tiepolo, T. *et al.*, (2009). "Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice" *Human Molecular Genetics* 18:2024-2031.
- Parfieniuk, A., J. Jaroszewicz, *et al.* (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." *World J Gastroenterol* 13(43): 5673-81.
- 30 Pawlotsky, J. M. (2000). "Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy." *Hepatology* 32(5): 889-96.
- Pawlotsky, J. M. (2005). "Current and future concepts in hepatitis C therapy." *Semin Liver Dis* 25(1): 72-83.
- 35 Pawlotsky, J. M. (2006). "Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets." *J Hepatol* 44(1 suppl.): S10-3.
- Pemberton, T. J. y J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporine A." *FEBS Lett* 555(2): 335-40.
- 40 Perry, G.M., Tallaksen-Greene, S. *et al.*, (2010). "Mitochondrial calcium uptake capacity as a therapeutic target in the R6/2 mouse model of Huntington's disease". *Human Molecular Genetics* 19(17):3354-3371.
- Pockros, P. (2008). "Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus." *Gastroenterol and Hepatology* 4(10): 729-734.
- 45 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.
- 50 Qing, M., Yang, F. (2009). "Cyclosporine Inhibits Flavivirus Replication through Blocking the Interaction between Host Cyclophilins and Viral NS5 Protein" *Antimicrob Agents Chemother* 53(8): 3226-3235.
- Qu, X., Jiang, N *et al.*, (2011) "Cloning, sequencing and characterization of the biosynthetic gene cluster of sanglifehrin A, a potent cyclophilin inhibitor". *Molecular Biosystems* DOI: 10.1039/C0MB00234H.
- 55 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.
- 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.
- 60 Schneider, M. D. (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." *Sci STKE* 2005(287): pe26.
- Schopman, N.C.T., ter Brake, O. y Berkhout, B. (2010). "Anticipating and blocking HIV-1 escape by second generation antiviral shRNAs" *Retrovirology* 7:52.
- 65

- 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.
- 5 Shafer, R.W., y Schapiro, J.M. (2008). "HIV-1 Drug Resistance Mutations: an Updated Framework for the Second Decade of HAART". *AIDS Rev.* 10(2):67-84.
- Smith, M. B. a. M., J., Ed. (2001). *March's advanced organic chemistry*, John Wiley and Sons Inc., RU.
- 10 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.
- 15 Steyn, D., Richman, D. *et al.*, (2006). "A double-blind placebo-controlled study in HIV-1-infected subjects on the safety, pharmacokinetics, and antiviral effect of cyclophilin A targeting Debio-025". *Int. Conf. Retroviruses Opportunistic Infec.* 13: Abs 516.
- 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 cyclosporine 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 Watashi, K. (2010). "Alisporivir, a cyclosporine derivative that selectively inhibits cyclophilin, for the treatment of HCV infection". *Curr. Opp. Invest. Drugs* 11(2):213-224.
- Xie, H., Xia, W. *et al.*, (2007). "Evaluation of hepatitis B virus replication and proteomic analysis of HepG2.2.15 cell line after cyclosporine A treatment". *Acta Pharmacol. Sin.* 7:975-984.
- 30 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.
- 35 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.
- Zeuzem, S. y E. Herrmann (2002). "Dynamics of hepatitis C virus infection." *Ann Hepatol* 1(2): 56-63.
- 40 Zhang, L. H. y 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.

#### Lista de secuencias

- 45 <110> Biotica Technology Limited
- <120> COMPUESTOS NOVEDOSOS
- <130> BOA-P1048PCT
- 50 <160> 15
- <170> PatentIn versión 3.3
- 55 <210> 1
- <211> 2072
- <212> ADN
- <213> Artificial
- 60 <220>
- <223> Cebador
- <400> 1

ES 2 541 853 T3

gccgaattcc gctgcaagtc ctactccgcc gaggccgacg gcaccggctg gtccgagggc 60  
 gtcggcatgc tcctcgtcga acggctcggc gacgccgaac ggctcggcca ccccgctctc 120  
 gccgtgctgc gcggctcagc ggtcaaccag gacggtgcca gcagcggcct caccaccccc 180  
 aacgggccgg cccagcagcg cgtcatccgg caggcgctcg ccgacgcccg gctcaccccc 240  
 gccgacctgg acctcgtgga gggccacggc accggcacc cgtcggcga cccgatcgag 300  
 gtgcaggccc tgctcgccac ctacggccag gaccgcggcg aaccgctctg gctgggctcg 360  
 gtgaagtcca acatcgcca caccaggcc gccgccggcg tcgccggagt catcaaggcc 420  
 gtcctggccc tccggcacgg tgtactgccc ggcaccgcc acctgaccga gccgaccccg 480  
 caggtcgact ggaccgccgg cggcgtgga cggctgcggg agacgcgcgc ctggcccag 540  
 accggcaggc cgcgccgcgc ggccgtgtcc tcgttcggca tcagcggcac caacgcccac 600  
 atcgtcctgg aacaggcccc cgcccccgcg gcgccgcagg cggccggagc ccaggcgccc 660  
 gcggcgccgc ggccccgtcgg gaaccaggcc accgccgcgc cgaggtccat ggaggaccgg 720  
 accgccgccc cgcctagcgc cggcggagac ccgaccctca ccgcgccggc cccctccgcg 780  
 ccccgccccg ccccgccgc cctccccgtc ccgctgtccg ccgcgaccga gcccggtgtc 840  
 cgtgccagc cctccggct ggccgccac ctaccgagc acccgaact cgccccgag 900  
 gacatcgctg tcagcgcgc caccacgcgc gccgcgctgg cgtccgggc cgtcgtgctc 960  
 gccgacgacc gggccgggct gctggacgcc ctaccgcgc tggccgaggg acggcccggc 1020  
 cccgccgtcg tcaccggcgc cgccgcggcc ggcgcgcgcc ggatcacctt cgtcttcccc 1080  
 ggccagggcg cccagtggc cggcatggcc gtaccctgc tggagacctc gccggtgttc 1140  
 gcggcgaagt gggccgaatg cgcccgcgtg ctgccccct gggtgactg gtcgcccgac 1200  
 gaggcgctgc gtcaccgca ggcactgga cgggtcgacg tcgtccagcc cgtgctgtgg 1260  
 gccgtcatgg tcagcctcgc cgagctgtgg cgggcggcgg gcgtacggcc cgacgccgta 1320

ES 2 541 853 T3

ctcggccatt cgcagggcga gatcgccgcc gcctgcgtcg ccggcgccct gtccctggag 1380  
gacggcgcca aggtcgtcgc gctgcgcgcc aaggccctgc tcgcgctcgc cggcccgggc 1440  
ggcatgctct ccgtcccgt gcccgaggcg gaggtccgcg cccggctcga cagccggccc 1500  
ggcctcggca tcgccgccgt caacgggccc gccaccgtgg tggctcctcg cgagacggcc 1560  
gcctcgcagc aggccaggc cgctgggag gccgaggcg tccgggtgcg ccgcatcccc 1620  
gtcgactacg cctcccactc cccgcacgtc gccgaggtgc aggaccgct cggcccgac 1680  
ctcgccggca tcgccccgcg cccggccgag gtgaccttc tgtccacgct caccggggaa 1740  
cccttcgaca ccaccggact cgacgccggc tactggtacc gcaacctgcg cgagcaggtc 1800  
cgcttcgagg cggccaccgc gcgcgccctg gagcagggcc accgcgtgtt catcgaggtc 1860  
ggcccgcacc ccgtgctcac gctcggcgtc cagcagaccg ccgaggccat ggacgtgccc 1920  
gccgaggcga tcgccaccct ccgccgcgac cagggcgacc tgctccgctt ccgcaccgcg 1980  
ctcgccgagg ccgccgtcct cggcgcccc gtcgactggg ccgccgaact cgccccgtac 2040  
gcgccccgcc gggtagatct gccctcgagc gc 2072

<210> 2  
<211> 35  
5 <212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
10 <223> Cebador

<400> 2  
**gctctcgagg cggctagcct ccctgcccga ggccg 35**

<210> 3  
15 <211> 32  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
20 <223> Cebador

<400> 3  
**agaaagcttc ggcccggctg gcgcccggg cc 32**

<210> 4  
25 <211> 1995  
<212> ADN  
<213> *Streptomyces sp.*

30 <400> 4  
**gctctcgagg cggctagcct ccctgcccga ggcccggcgc cggcgggccc tcaccgaact 60**  
**ggtccgcgag cacgccgcc cgctcctcgg ccacgactcg cccgccgcgc tccccgccga 120**  
**ccgcgccttc cgggacgtcg gcttcgactc catcaccgcg gtcgagctgc gcaaccggct 180**  
**ccgctcggcc accggcctgg ccctgcccgc caccctcgtc ttcgaccacc cgtcggcccac 240**

ES 2 541 853 T3

cgcgctggcc ggccacctgc tcgcgctcgc cttcgacacc gccgcggcgg acctcgccgc 300  
 gcccgccgcc cgcgcccgcg acgatgacga cgacccgatc gccgtcgtcg gcctcagctg 360  
 ccgctacgcc ggccggcgtcg cctccccgga cgagctgtgg cggctcgtcg tggccggtca 420  
 ggacgcgggtg ggccgccctgc ccaccgaccg tggctgggac ctcgactcgc tctacgactc 480  
 cgacccccgac gcccgcggtc gcagctacgt ccgcccaaggg gccttcctca ccgacccccgc 540  
 cggcttcgac gccgccttct tcggcatcgc cccggcggag gcccgggcca ccgacccgca 600  
 gcagcggctg ctcttggaag ccgcctggga ggcgttcgag cacgccggca tcgacgccac 660  
 cggcctgcgc ggctcgcgcg tcggcgtctt cgcggcgcgc aacgtcggcg actacgcctc 720  
 cagccgcggc cctggcgccg gcggctccga cggacagctg ctaccggca acgtcccag 780  
 tgtgatctcc ggccggatct cctacacctt cggtttcgag gggccggccg tcaccgtgga 840  
 caccgcctgc tcgtccgcc tcggtcgcct ccacctggcc tgccggtcgg tcgcggcgg 900  
 cgagagcgac atggccctgg ccggcggcgt cgcgctcatg tcagcccg cgcacctgat 960  
 cggcttctcc gcgcagcgcg gcctgtccgg cgacggccgc tgcaaggcct tcgccgacgc 1020  
 cgccgacggc accggtctcg ccgagggcgt cggactgctg ctggtggaac gcctctcccg 1080  
 ggccccgcgc cagggccacc gcgtcctcgc cctcgtacgc ggctcggcga tcaaccagga 1140  
 cggcgcctcc aacggactca ccgccccag cggacccgcc cagcagcgcg tcataccgc 1200  
 cgcgctcgcg gacgccgggc tcgggcccgc cgacgtcgac gccgtggagg cccatggcac 1260  
 cggcaccgcg ctccggcgacc cgatcgaggc ccaggccctg ctgccacct acggacagga 1320  
 ccgcgccgaa ccgctctggc tcggctcggg gaagtccaac atcgccact cccaggccgc 1380  
 gtccggcgcg gccggcgtga tcaagaccgt gcaggcgtg cggcacggcc tgctgccgc 1440  
 cacgctccac gtggaccggc ccaccacca ggtcgaactg accgccggcg ccgtcgaggt 1500  
 gctgaccgag gcccgggact ggccggcctg ggaccggcct cggcgggccc ccgtgtcggc 1560  
 gttcggcctg tccggcacca acgcgcacgt gatcctcga caggcccccg ccgaagacgc 1620  
 ccacccggcc cccgaaccgg ccccggcga ggactcccac ccgacccccg aaacggcccc 1680  
 aggcgaggac gccccgcgga ccgcgcccga gcccgcgcg cccgtggtgt ggccggtgca 1740  
 cggccgtacc cgggacgcc tcgcgcccga ggcggcgcgg ctgcgaccc acctggagac 1800  
 ccgccccgac gcccgcccgg ccgacgtcgg ctggaccctc gcggccggtc gggccgtgtt 1860  
 cgaccaccgc gccgtggtgc tcggcgcccga ccgcgccgag ctgctgcgcg gactcgacgc 1920  
 cgtcggccgc ggcacccccg accccgcggt cgcgcacggc gcggcccagg gcgccgagcc 1980  
 gggccgaagc tttct 1995

<210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN



<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

5

<400> 5

**gctctcgagg cggctagcct ccctg** 25

<210> 6

10

<211> 35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15

<223> Cebador

<400> 6

**aaaaagcttg cggggtcggg ggtgccggcg gcgac** 35

<210> 7

20

<211> 1956

<212> ADN

<213> *Streptomyces sp.*

<400> 7

25

ES 2 541 853 T3

gctctcgagg cggctagcct ccctgcccga ggccggccgc cggcgggccc tcaccgaact 60  
 ggtccgcgag cacgccgccg ccgtcctcgg ccacgactcg cccgccgcgc tccccgccga 120  
 ccgcgccttc cgggacgtcg gcttcgactc catcaccgcg gtcgagctgc gcaaccggct 180  
 ccgctcggcc accggcctgg ccctgcccgc caccctcgtc ttcgaccacc cgtcgcgccac 240  
 cgcgctggcc ggccacctgc tcgcgctcgc cttcgacacc gccgcggcgg acctcgcgcg 300  
 gccccgcccc cgcgccgccg acgatgacga cgaccggatc gccgtcgtcg gcctcagctg 360  
 ccgctacgcc ggcggcgtcg cctccccgga cgagctgtgg cggctcgtcg tggccgggtca 420  
 ggacgcggtg ggcgccctgc ccaccgaccg tggctgggac ctcgactcgc tctacgactc 480  
 cgacccccgac gcccgcggtc gcagctacgt ccgccaaggg gccttcctca ccgacccccg 540  
 cggcttcgac gccgccttct tcggcatcgc cccggcggag gcccgggcca ccgacccgca 600  
 gcagcggctg ctccctggaag ccgcctggga ggcgttcgag cacgccggca tcgacgccac 660  
 cggcctgcgc ggctcgcgcg tcggcgtctt cgccggcgcg aacgtcggcg actacgcctc 720  
 cagccgcggc cctggcgccg gcggctccga cggacagctg ctcaccggca acgtccccag 780  
 tgtgatctcc ggccggatct cctacacctt cggtttcgag gggccggccc tcaccgtgga 840  
 caccgcctgc tcgtccgccc tggtcgccct ccacctggcc tgccggtcgg tgcgcggcgg 900  
 cgagagcgac atggccctgg ccggcggcgt cgcgctcatg tccagcccgg ccgcctgat 960  
 cggcttctcc gcgcagcgcg gcctgtccgg cgacggcccgc tgcaaggcct tcgcccagcg 1020  
 cgccgacggc accggtctcg ccgagggcgt cggactgctg ctggtggaac gcctctcccg 1080  
 ggccccgcgc cagggccacc gcgtcctcgc cctcgtacgc ggctcggcga tcaaccagga 1140  
 cggcgcctcc aacggactca ccgccccag cggacccgcc cagcagcgcg tcatcaccgc 1200

ES 2 541 853 T3

cgcgctcgcc gacgcccggc tgcggcccgc cgacgtcgac gccgtggagg cccatggcac 1260  
 cggcaccocgc ctccggcgacc cgatcgaggc ccaggccctg ctccgccacct acggacagga 1320  
 ccgcgccgaa ccgctctggc tcggctcggc gaagtccaac atcggccact cccaggccgc 1380  
 gtccggcgcg gccggcgtga tcaagaccgt gcaggcgctg cggcacggcc tgctgcccgc 1440  
 cacgctccac gtggaccggc ccaccacca ggtcgactgg accgccggcg ccgtcgaggt 1500  
 gctgaccgag gccccgggact ggccggccgt ggaccggcct cggcgggccc ccgtgtcggc 1560  
 gttcggcctg tccggcacca acgcgcacgt gatcctcgaa caggcccccg ccgaagacgc 1620  
 ccaccocggc cccgaaccgg ccccgggcga ggactcccac ccgaccoccg aacggcccc 1680  
 aggcgaggac gccccgcgga ccgcgcccga gcccgcgcg cccgtggtgt ggccggtgca 1740  
 cggccgtacc cgggacgccc tgcgcgccc gccggcgcg ctgcgcaccc acctggagac 1800  
 ccgccccgac gcccgcccgg ccgacgtcgg ctggaccctc gcggccggtc gggccgtgtt 1860  
 cgaccaccgc gccgtggtgc tcggcgccga ccgcgcccag ctgctgcgcg gactcgacgc 1920  
 cgtcgcccgc ggcacccccg accccgcaag cttttt 1956

<210> 8  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cebador

10

<400> 8  
**taagatcttc cgacctacgc ctccaac 28**

<210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Cebador

20

<400> 9  
**taatgcatcg acctcgttgc gtgccgcggt 30**

<210> 10  
 <211> 122  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Cebador

30

<400> 10  
**ctaggccggg ccggactggt agatctgcct acgtatcctt tccagggcaa gcggttctgg 60**

**ctgcagccgg accgcactag tcctcgtgac gagggagatg catcgagcct gagggaccgg 120**  
**tt 122**

35

<210> 11

<211> 118  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador

<400> 11  
**aaccgggtccc tcaggctcga tgcattctccc tcgtcacgag gactagtgcg gtccggctgc 60**  
**agccagaacc gcttgccctg gaaaggatac gtaggcagat ctaccagtcc ggcccggc 118**

10 <210> 12  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Cebador

<400> 12  
**tagctagccc ggcgctcagg ggctgcgagc cgacct 36**

20 <210> 13  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25 <220>  
 <223> Cebador

<400> 13  
**ccgtagatct gcccacctac gccttcagc gcg 33**

35 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Cebador

<400> 14  
**tccggctagc cgttggggca gcgcgg 26**

45 <210> 15  
 <211> 3176  
 <212> ADN  
 <213> *Streptomyces sp.*

<400> 15  
**ccgtagatct gcccacctac gccttcagc gcgagcacta ctggctgccc gtcgactccg 60**  
**gcgcccggcac ggccccggcc gggcaccccc tgetgtccgc cgcggtcgac ctgccggacg 120**  
**gcggcctcgt actcaccggg cggctctcgc ccgcccgcgc cccctggctc gccagcaca 180**

50

ES 2 541 853 T3

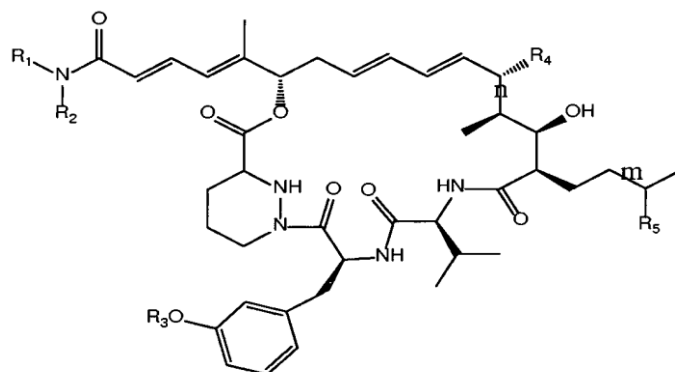
ccgtgcgcgg cagcgcctg ctgcccggca ccgccctgct ggacctggcc ctgcgcgcgg 240  
 ccggccaggc ggccgcgccc ggcgtcgccc aactgatcct cgaagcccc ctcgtgctgc 300  
 ccgccgaggg cgcggtggag gtgcgcgtca ccgtcggcgc cgcggggacc gacggccgcc 360  
 gcgcgatcgc cctgcacacc cgcgcccggc acggcgactg gacccggcac gccaccggag 420  
 ccctgggcga ggtgccggc gagcccacgg ccgccggcgc ctggccgccc ccggatgccc 480  
 gccccgccga cctgcgcgcc ctgtacggcg ggctggccga cgcggcttc ggctacgggc 540  
 ccgcctacca gggcctccgt gccgcctggc ggcgcgccga aggcccgcg gccgaggtgt 600  
 tcgccgaggc cgaactgccc gcggccgtcc ccgacgccga ccgctgcccc gtacaccggg 660  
 cgctgctgga cgcgctcctg cacgccatcg gcgtgggcgg gctgatcacc gacccggcgc 720  
 acggcggact ccggttcgcc tggaccgggg tacgggtctt cgcctccggc gcccgggcgg 780  
 tccgcgcccg gctctcccgg gccggcgccc aaggcgccct cgcctcgac ctgttcgacg 840  
 ccgacgggct gccagtggcc gccatcggct ccctgcggct gcgcccgcc gccgctccc 900  
 cggtgcccga cgcctcttc gagaccgct ggacgcctgt cgagcagggc acggccccgg 960  
 cccgccgcct cgcgctgctc ggcccgaca ccgccctcgc ggccggcctc acccgggccc 1020  
 gcgcgcctt cgcgcagcc acggaccgct ccgccgaggt gctcgtcctg ccgatcgtca 1080  
 ccgacccgg cgcggcccc gtcaaccgaga cccaccgggc gaccgcccgc gtctgacgg 1140  
 ccctccgtga cgtcctggcc gacgaggaga gcaccgccc cctcgcctg gtcaaccgcg 1200  
 gcgcctcgc gctgtccgcc gaggagtccc cggaccggc cgcggcgcc gtctggggtc 1260  
 tggtgcggtc cgcagacc gagcaccgg accggatcgt cctcggcgac ctggacgcc 1320  
 ccgacgcctc ggcccgcgcc ctgcccggc cgctgacctg cggggaaccg cagctcggc 1380  
 tgcggtccgg cgcggtcagc gcaccccggc tcaccgcgc cggcgccgac gcgctggtcc 1440  
 tgcccagcgg cggctggcgc ctgcggccc gcgccaccgg caccgtcgac ggcacgacgg 1500  
 ccgtgccgca ccccgacgc ccgctcggc acggcgaggt acgggtcgc gtccgcgcgg 1560  
 tcggggtcac ctccgggac gtcctcagcg tgctcggcct ctaccgggg gcccccagc 1620  
 cgctcggcat cgaggcggc ggcggtgga ccgggaccgg ccccgcgctg agcgacctc 1680  
 cccccggcga ccgggtgttc ggaactgctc ccggctccat gggctcctc gccgtcggc 1740  
 accggcgcgt gctcgcgcc gtccccgac gctggggctt caccggggc gcctcggtc 1800  
 cctccgcgtt cctcaccgcc tggttcgcgc tcgcgatgt ggccggggtg cgggcgggg 1860  
 agcgggtgct ggtgcacgc gcggccgggt gtgtgggcat ggcccggtg cgggtggcgc 1920  
 ggctgctggg cgcgaggtg tatgcgacgg cgagtcccgg caagcatggg gtgctcggg 1980  
 cggccggctt ggacgagcg cgtgtggcgt cgtcgggga cacggagttc gcgcagcgt 2040  
 tcccggagat ggacgtcgt ctgaactccc tcacgggtga gttcgtggac gcgtcgtgc 2100  
 gactgctccg tcccggcga cggttcgtgg aactcggcaa gaccgacctg cgcaccgaca 2160

ES 2 541 853 T3

ccgccggcat	cacctaccgg	gccgtcgacc	tcgctggacgc	cgcccccgac	cgcatccagg	2220
agatgctcac	cgaactcctg	gaccgcctcg	cgcccggcga	cctcgcccac	ctgcccgtcc	2280
gcagcatgcc	catgggccc	gcccgcgagg	cgttccgctt	catggcccag	gcccggcaca	2340
ccgggaagct	cgtcctcacc	accgccccgt	acggcgacgg	caccgtcctc	gtcaccggcg	2400
gcaccggcgc	cctcggcggc	ctcgtggccc	ggcacctcgt	caccgaacac	ggcatccgcg	2460
acctggtgct	cgtcggacga	cagggcgccg	agccccccgt	caccgccgaa	ctgcgcgccg	2520
ccggcgcccg	ggtccgcgtg	gcggcctcgc	acgtgtccga	ccgggcccgc	ctcgccgcgc	2580
tgctcgcgga	catcgagccg	cccctgaccg	cggtggtgca	cgcgcccggc	gtcctcgacg	2640
acggcacgct	cacctcgtg	acccccgaac	ggctcgcgcg	cgtactgcgc	ccgaaggccg	2700
acgccgcctg	gcacctgcac	gaactcaccg	aggacaggga	cctgtccgcc	ttcgtgctgt	2760
tctcctcggc	ggccggcacg	ttcggcggcc	ccggccaggg	caactacgcc	gccgccaacg	2820
ccgccctgga	cgcgctcgcc	gagcaccgcc	gctcccgcgg	cctgcccgcc	gtctccctcg	2880
cctggggggc	gtgggcccgc	gagagcgcca	tgaccggcgg	cctcagcagc	ggcgaccgcg	2940
ccaggatgac	ccgggcccgc	gtccggcccc	tgcccgccac	cgaggcactc	gccgtgctcg	3000
acgccgcctg	ccgcaccgga	gcccggcggc	tcgccgcgct	ccgtctcgac	accgcggcgc	3060
tcaccgcccg	caccggcgcc	ccgcaccggc	tgctgcgcga	cctggtccgc	cgtccggccc	3120
gccccgcccg	cgacgacgcc	gacaccgagc	ccgcgctgcc	ccaacggcta	gccgga	3176

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto según la fórmula (I) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I)

en la que:

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente alquilo, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenheteroarilo pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

o R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> representa hidrógeno;

y en la que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> que no forman parte de un grupo arilo o heteroarilo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> están reemplazados opcionalmente por carbonilo;

o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se unen para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por carbonilo y pudiendo estar el anillo heterocíclico opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo;

y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más átomos de halógeno;

R<sub>3</sub> representa H o -(CO)<sub>x</sub>-alquilo;

R<sub>4</sub> representa H u OH;

R<sub>5</sub> representa H, OH u =O;

n representa un enlace sencillo o doble con la salvedad de que cuando n representa un doble enlace R<sub>4</sub> representa H;

m representa un enlace sencillo o doble con la salvedad de que cuando m representa un doble enlace R<sub>5</sub> representa H; y

x representa 0 ó 1;

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 cetol mediante la combinación de los grupos ceto en C-53, si está presente, e hidroxilo en C-15 y metanol.

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente alquilo, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenheteroarilo pudiendo estar cualquiera de estos grupos opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

o R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> representa hidrógeno; y en el que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> que no forman

parte de un grupo arilo o heteroarilo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> están reemplazados opcionalmente por carbonilo;

5 o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se unen para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están reemplazados opcionalmente por carbonilo y pudiendo estar el anillo heterocíclico opcionalmente condensado con un anillo de arilo o heteroarilo.

10 3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R<sub>1</sub> representa arilo o heteroarilo sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -CO-alquilo C<sub>1-4</sub> o -alqueno C<sub>2-4</sub>.

15 4. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R<sub>2</sub> representa hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> o alqueno C<sub>1-4</sub>.

20 5. Compuesto según la reivindicación 2, en el que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> junto con el nitrógeno al que están unidos representan un anillo heterocíclico de 5-7 miembros, tal como un anillo de pirrolidina, piperidina, morfolina o piperazina en el que el nitrógeno en 4 de piperazina está opcionalmente sustituido con alquilo C<sub>1-4</sub> y en el que un átomo de carbono adyacente a un átomo de nitrógeno dentro del anillo está opcionalmente reemplazado con carbonilo.

25 6. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que, independientemente o en cualquier combinación:

R<sub>3</sub> representa H o (CO)<sub>x</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, en el que x es tal como se define en la reivindicación 1;

n representa un enlace sencillo;

30 m representa un enlace sencillo;

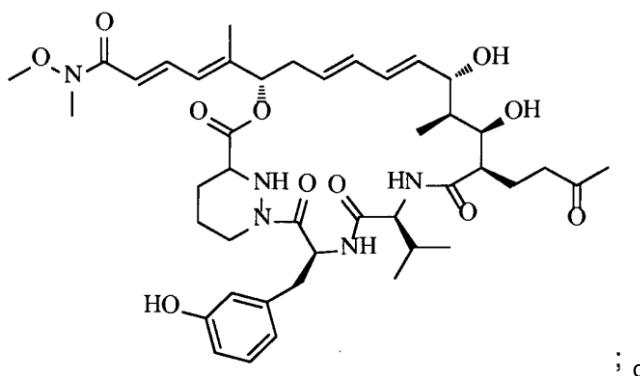
R<sub>4</sub> representa OH; y

R<sub>5</sub> representa =O.

35 7. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que x representa 0.

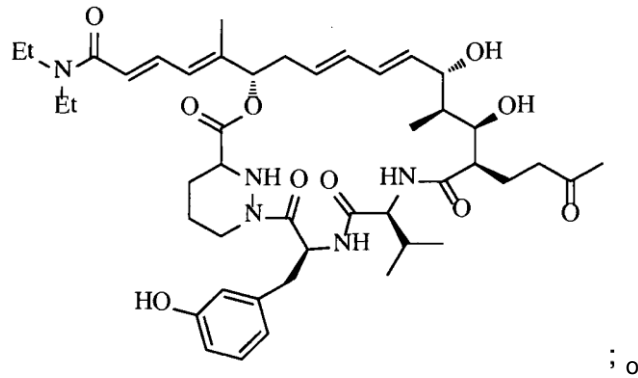
8. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

40 R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



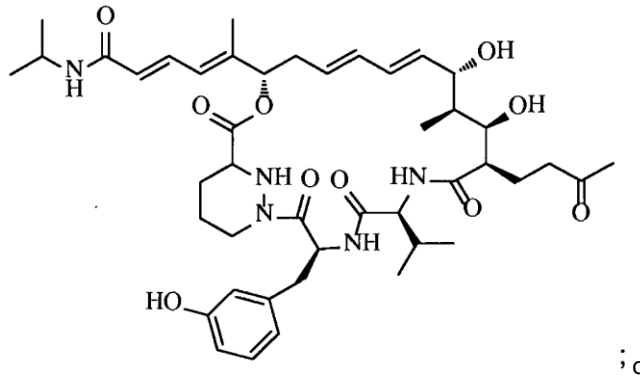
45 R<sub>1</sub> representa etilo, R<sub>2</sub> representa etilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:





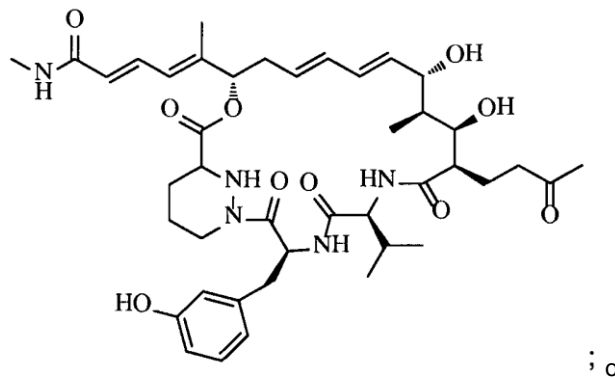
5

R<sub>1</sub> representa -CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



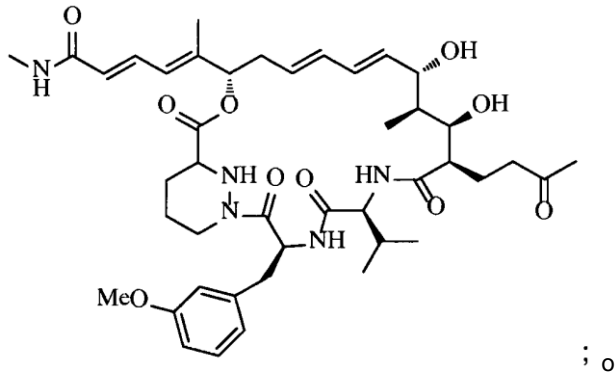
10

R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

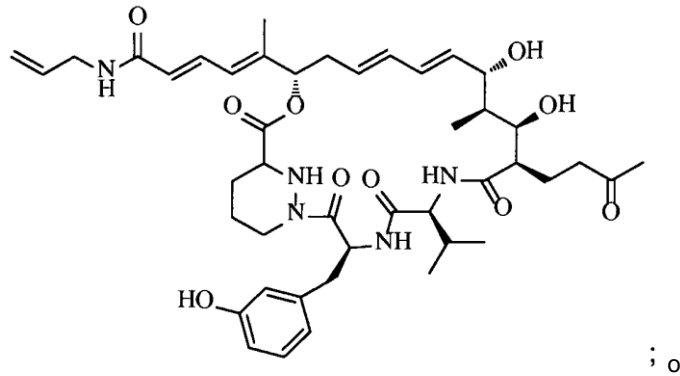


15

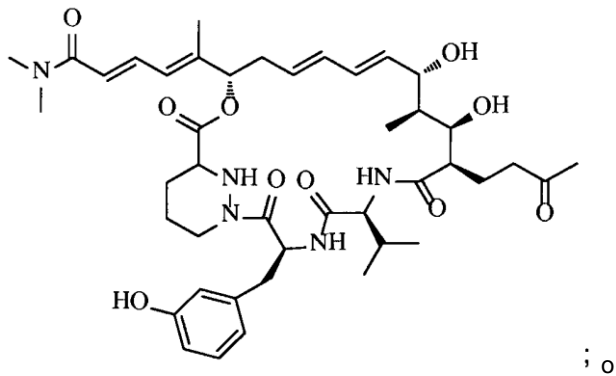
R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa Me, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



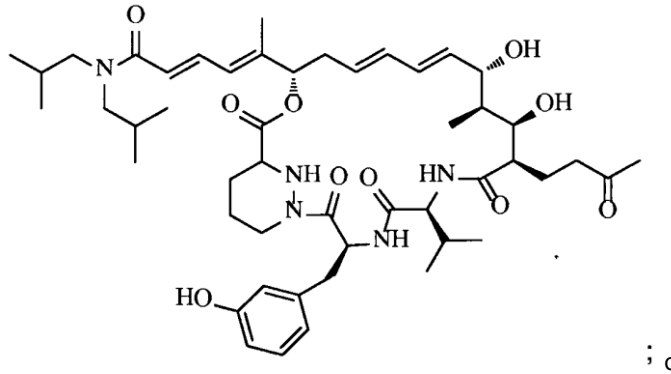
5 R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



10 R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa metilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



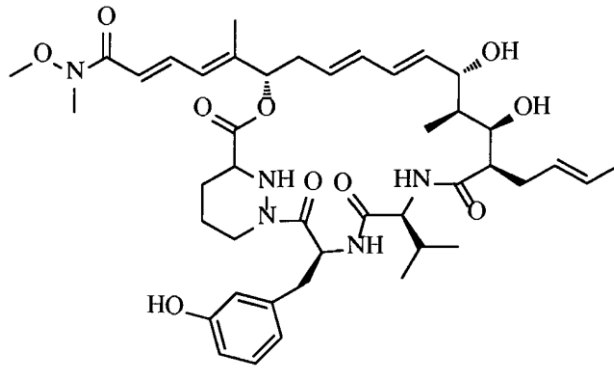
15 R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



; o

R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R<sub>5</sub> representa H tal como se representa mediante la siguiente estructura:

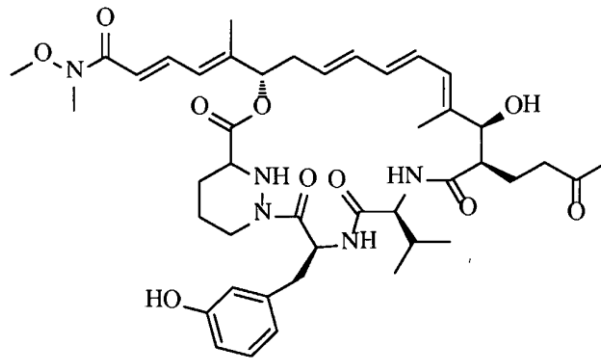
5



; o

R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un doble enlace, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

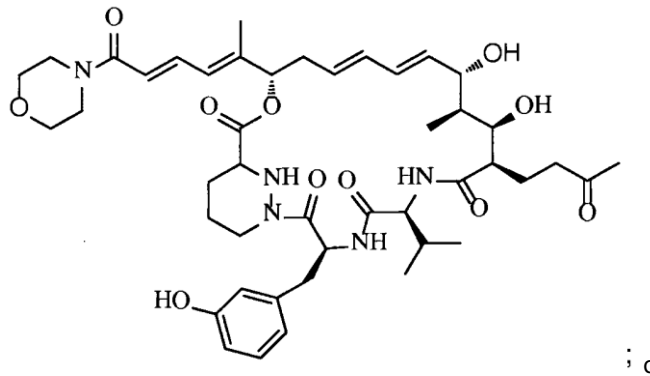
10



; o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> juntos representan -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

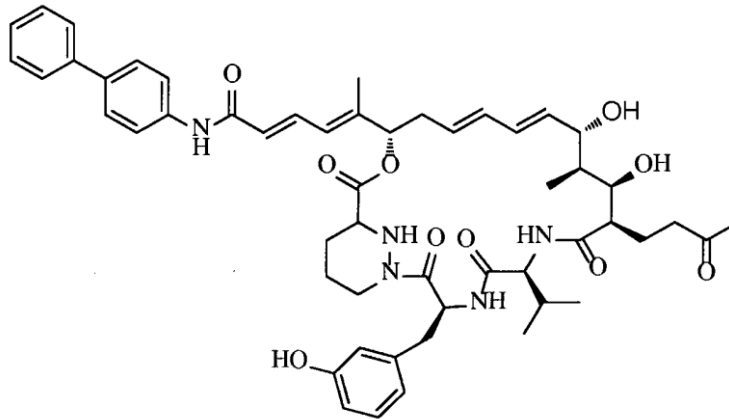
15



; o

R<sub>1</sub> representa 4-bifenililo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

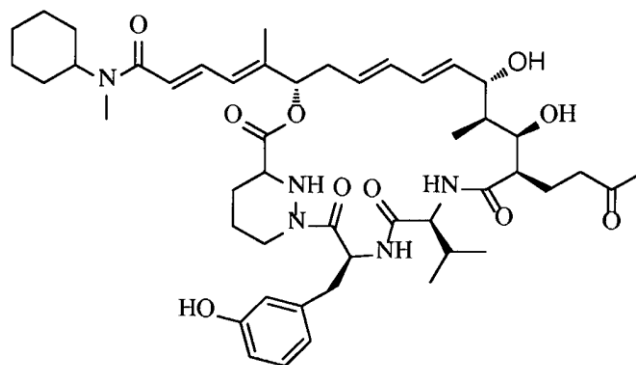
5



; o

R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

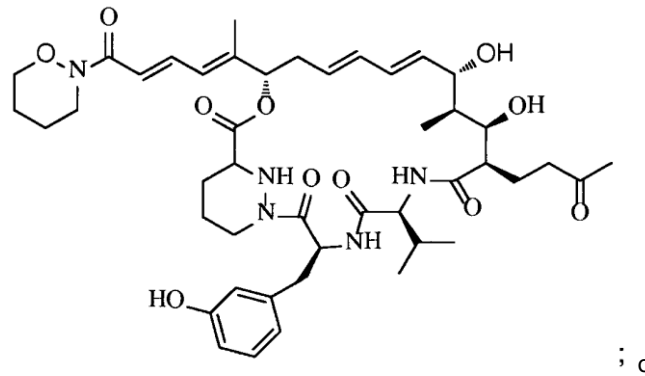
10



; o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> juntos representan -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

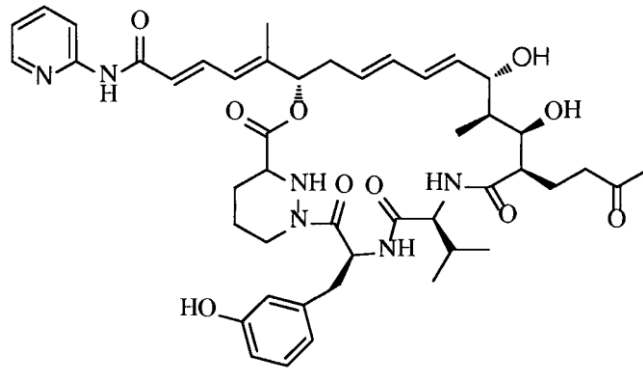
15



; o

5

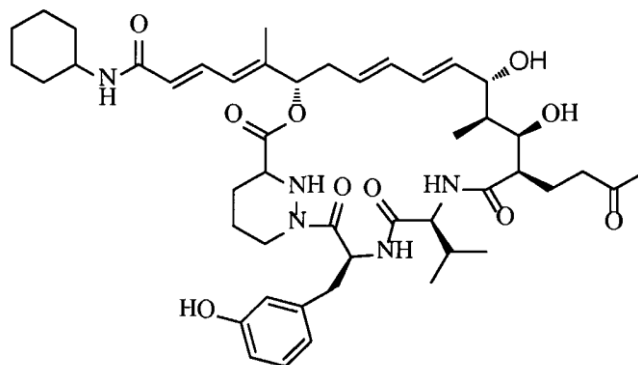
R<sub>1</sub> representa 2-piridinilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



; o

10

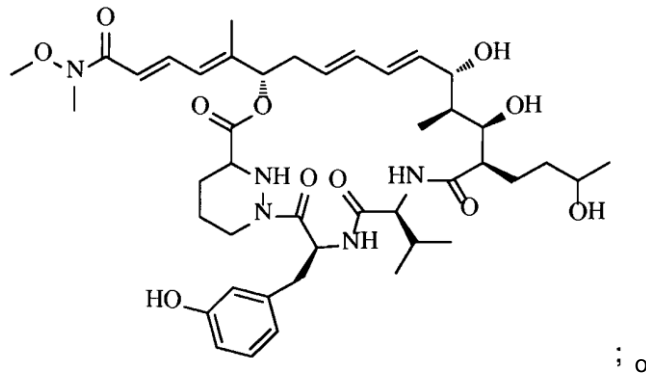
R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



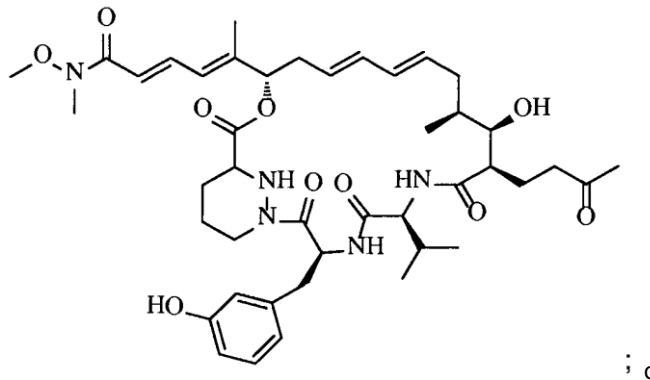
; o

15

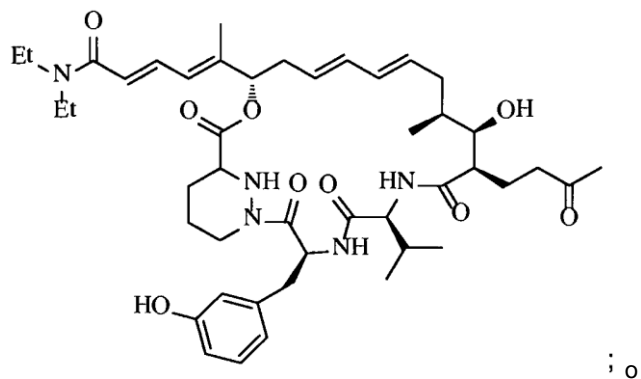
R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa OH tal como se representa mediante la siguiente estructura:



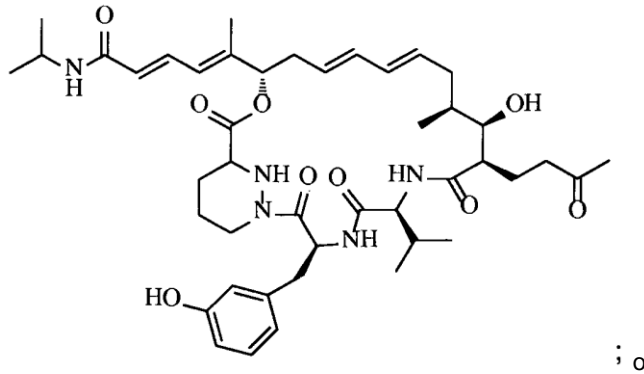
5 R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



10 R<sub>1</sub> representa etilo, R<sub>2</sub> representa etilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

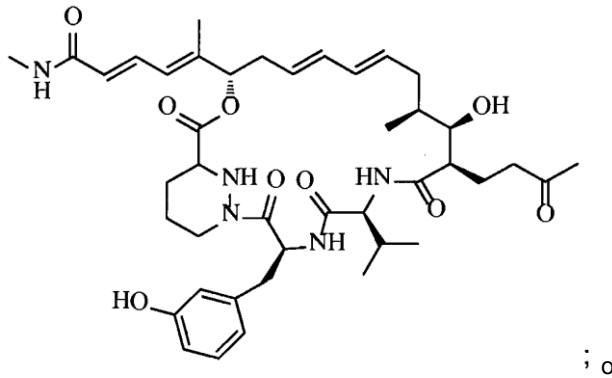


15 R<sub>1</sub> representa -CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



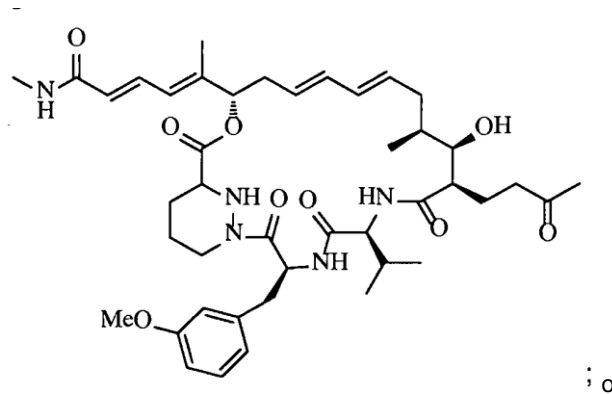
R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

5



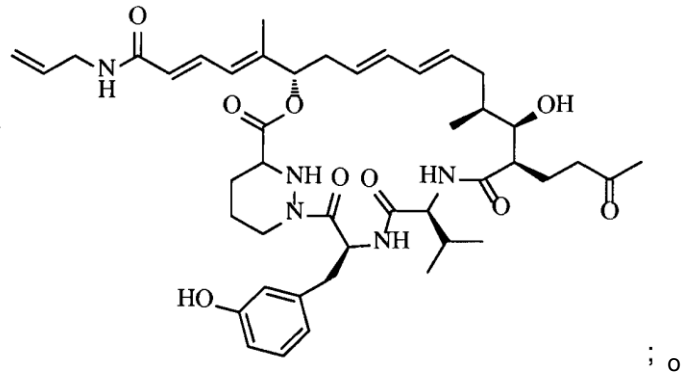
R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa Me, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

10

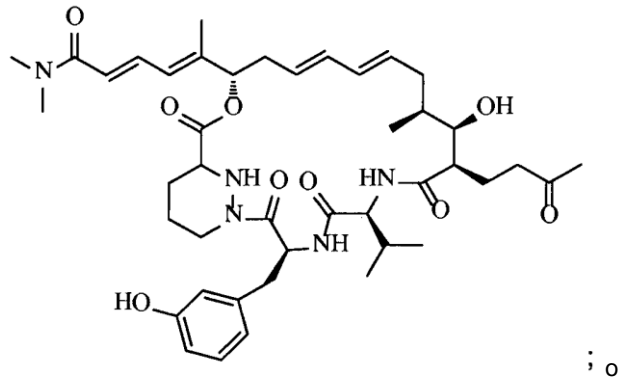


R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

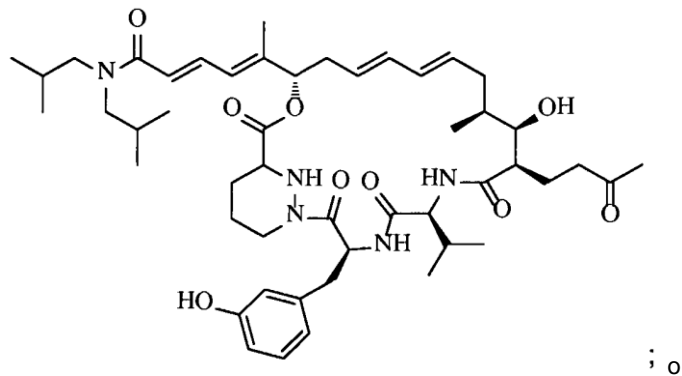
15



5 R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa metilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

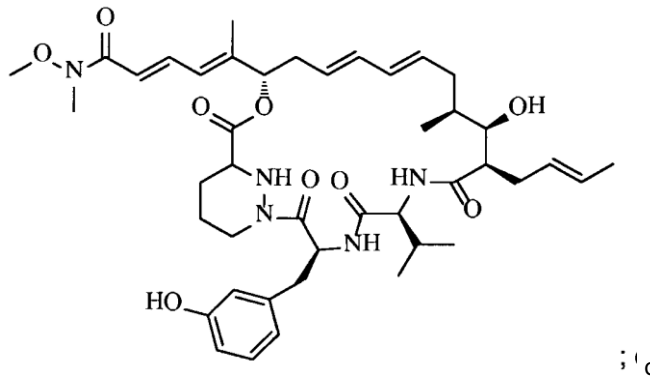


10 R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



15 R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R<sub>5</sub> representa H tal como se representa mediante la siguiente estructura:

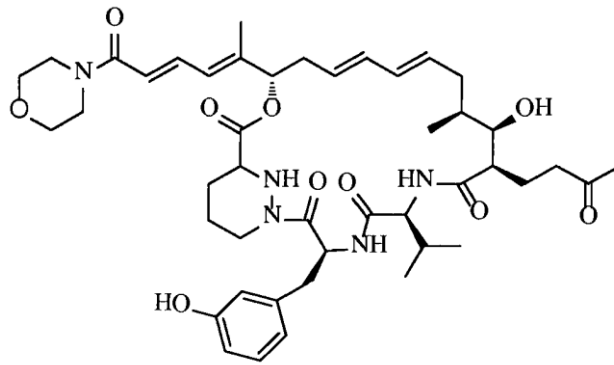




; o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> juntos representan -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

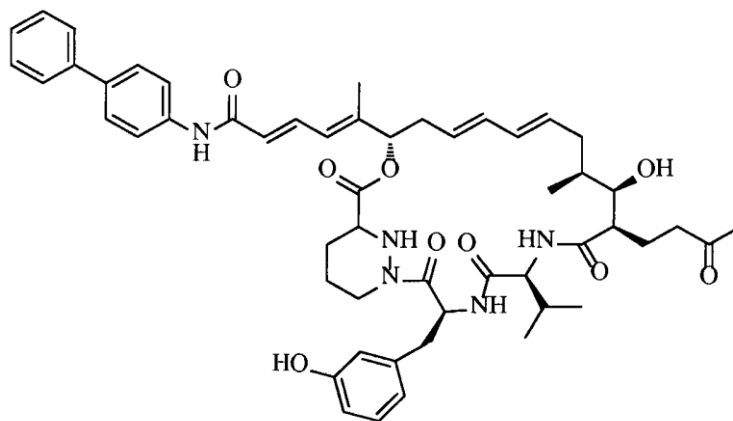
5



; o

R<sub>1</sub> representa 4-bifenililo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:

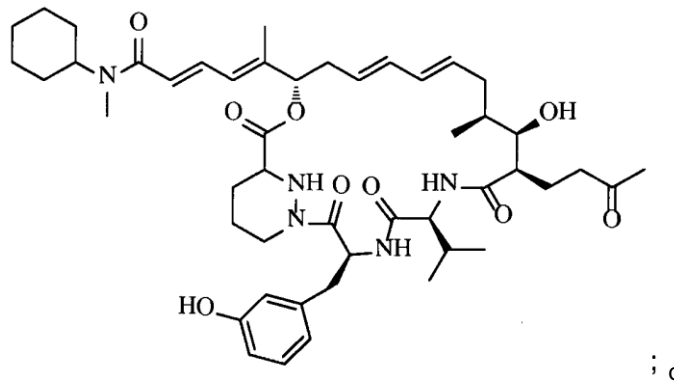
10



; o

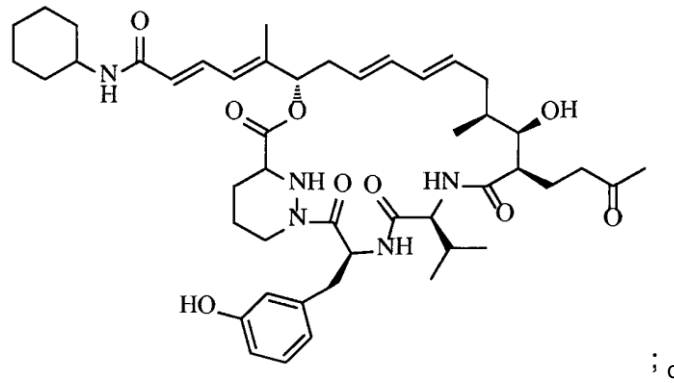
15

R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



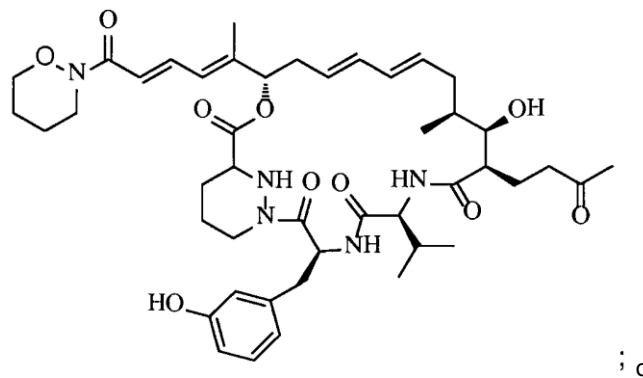
5

R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



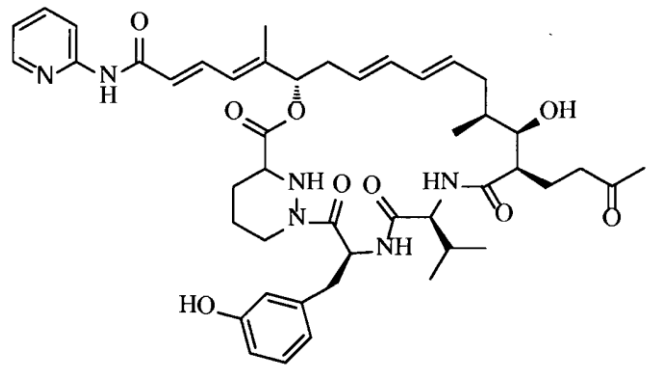
10

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> juntos representan -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- conectado en un heterociclo de 6 miembros, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



15

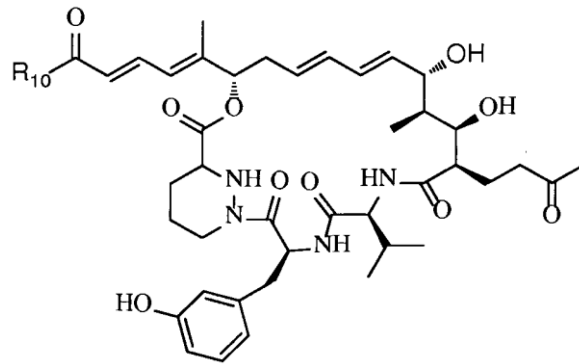
R<sub>1</sub> representa 2-piridinilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



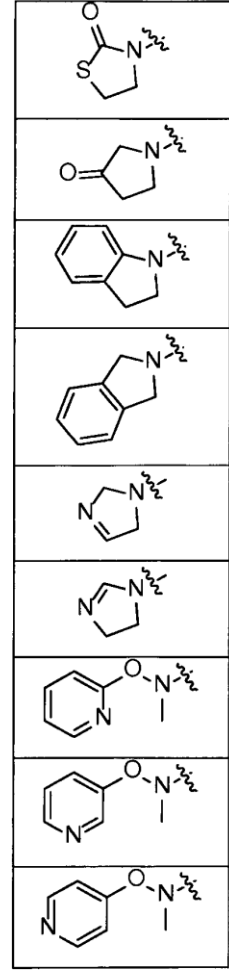
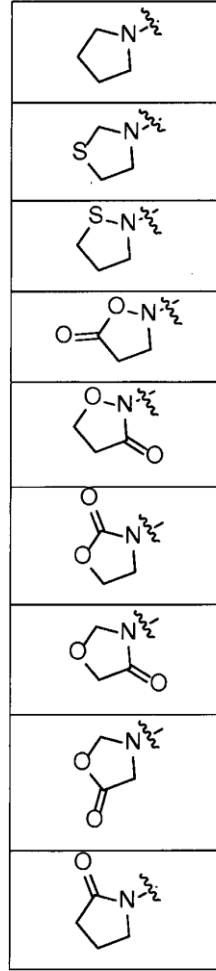
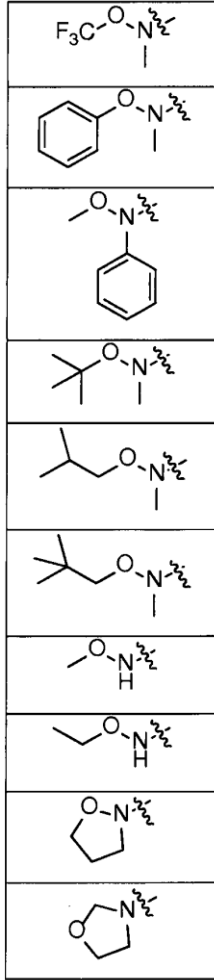
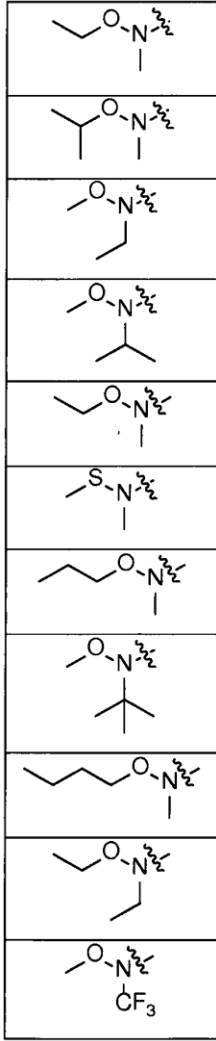
5 o una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los mismos; incluyendo cualquier tautómero de los mismos; o un isómero de los mismos en el que el enlace C=C en C26, 27 mostrado como *trans* es *cis*; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación de los grupos ceto en C-53 (si está presente) e hidroxilo en C-15 y metanol.

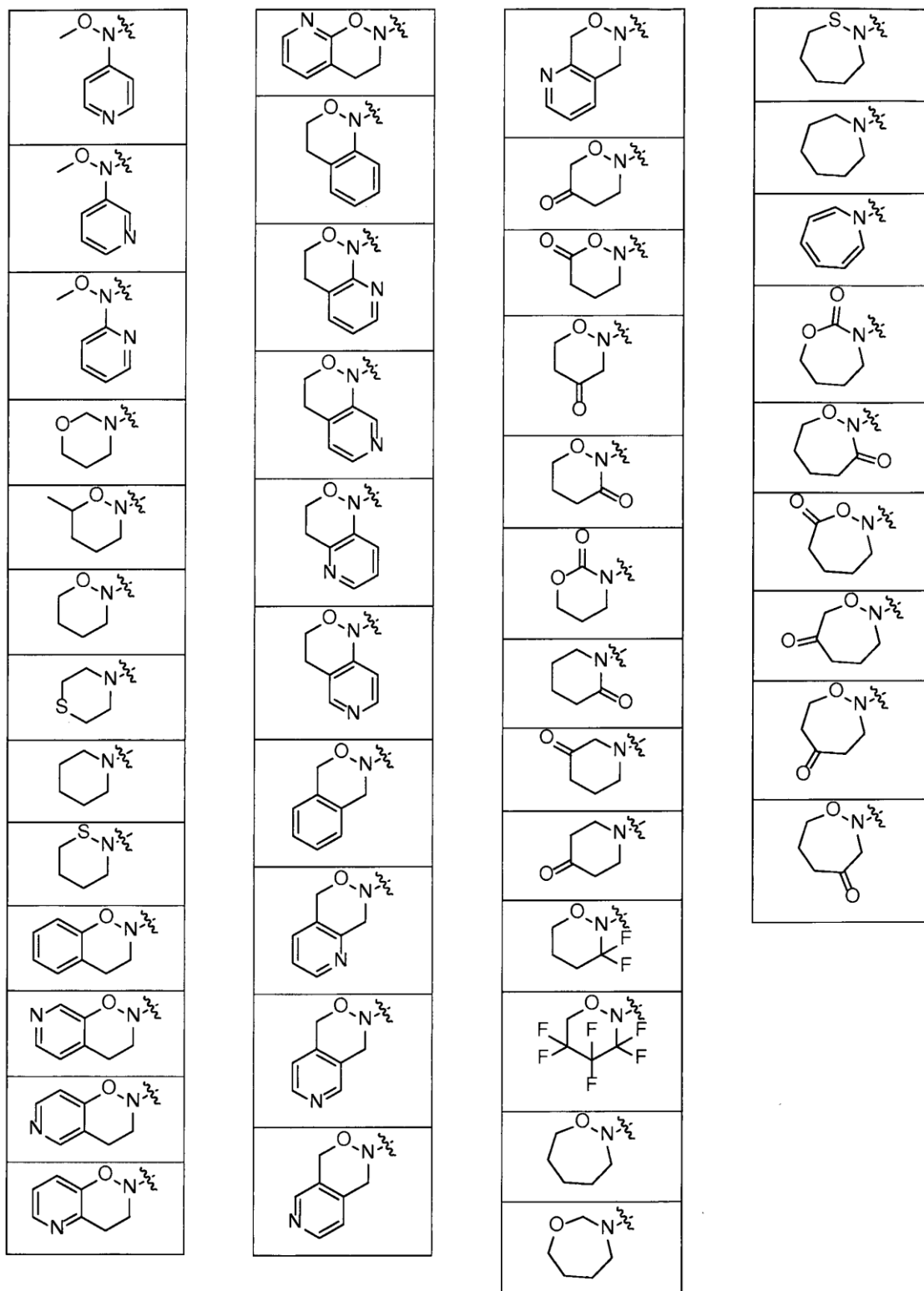
9. Compuesto según la reivindicación 1, en el que:

10 R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa mediante la siguiente estructura:



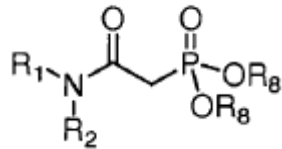
15 en la que R<sub>10</sub> representa un grupo tal como se muestra en la siguiente tabla:





- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los mismos; incluyendo cualquier tautómero de los mismos; o un isómero de los mismos en el que el enlace C=C en C26, 27 mostrado como *trans* es *cis*; e incluyendo un aducto de metanol de los mismos en el que se forma un cetral mediante la combinación de los grupos ceto en C-53, si está presente, e hidroxilo en C-15 y metanol.
10. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como producto farmacéutico.
- 10 11. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, junto con un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

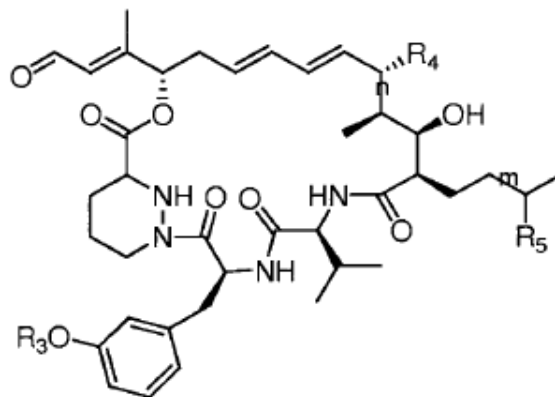
12. Composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 11, que comprende además un segundo principio activo o principio activo posterior.
- 5 13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso en el tratamiento de infecciones virales seleccionadas de VHC, VHB o VIH.
14. Procedimiento para preparar un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende hacer reaccionar un compuesto de fórmula II:
- 10



fórmula II

- 15 en la que  $R_1$  y  $R_2$  son tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y  $R_8$  representa alquilo  $C_{1-4}$  o bencilo;

con un macrociclo aldehídico (compuesto de fórmula III):



fórmula III

20

en la que  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $m$  y  $n$  son tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

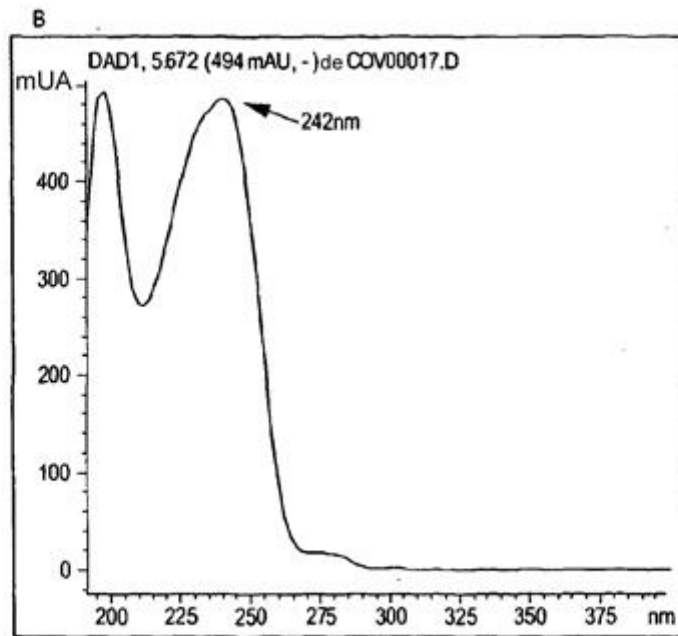
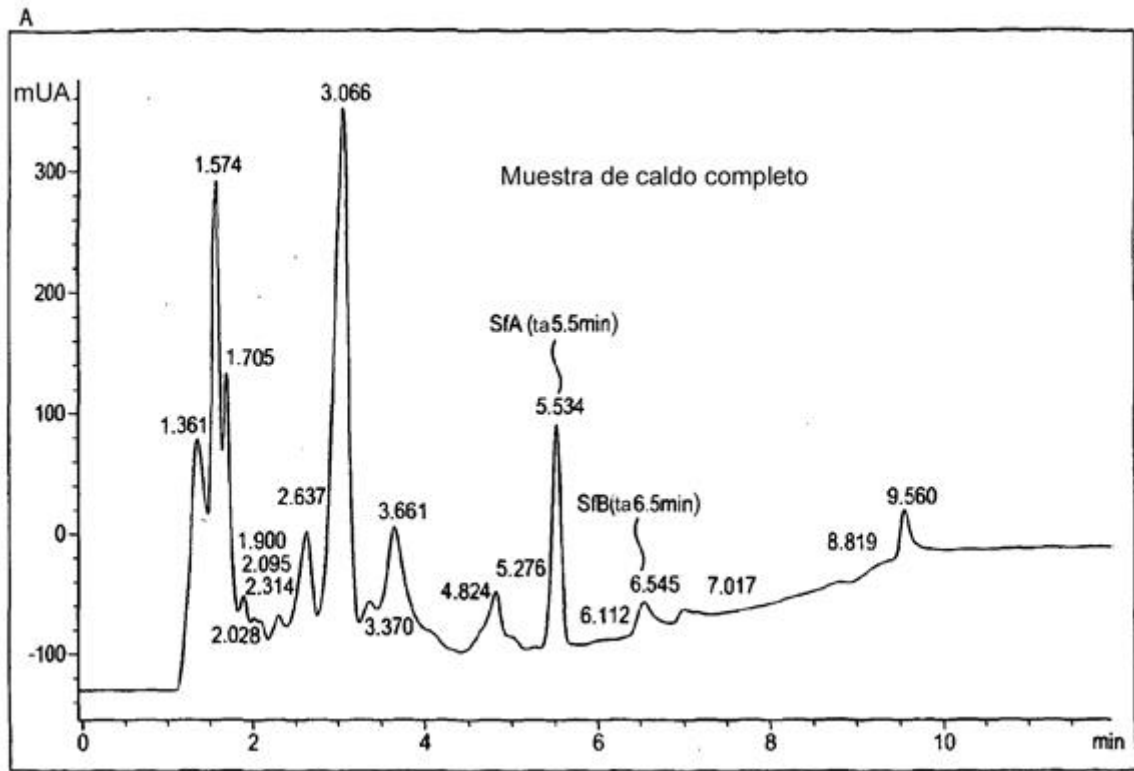


FIG. 1

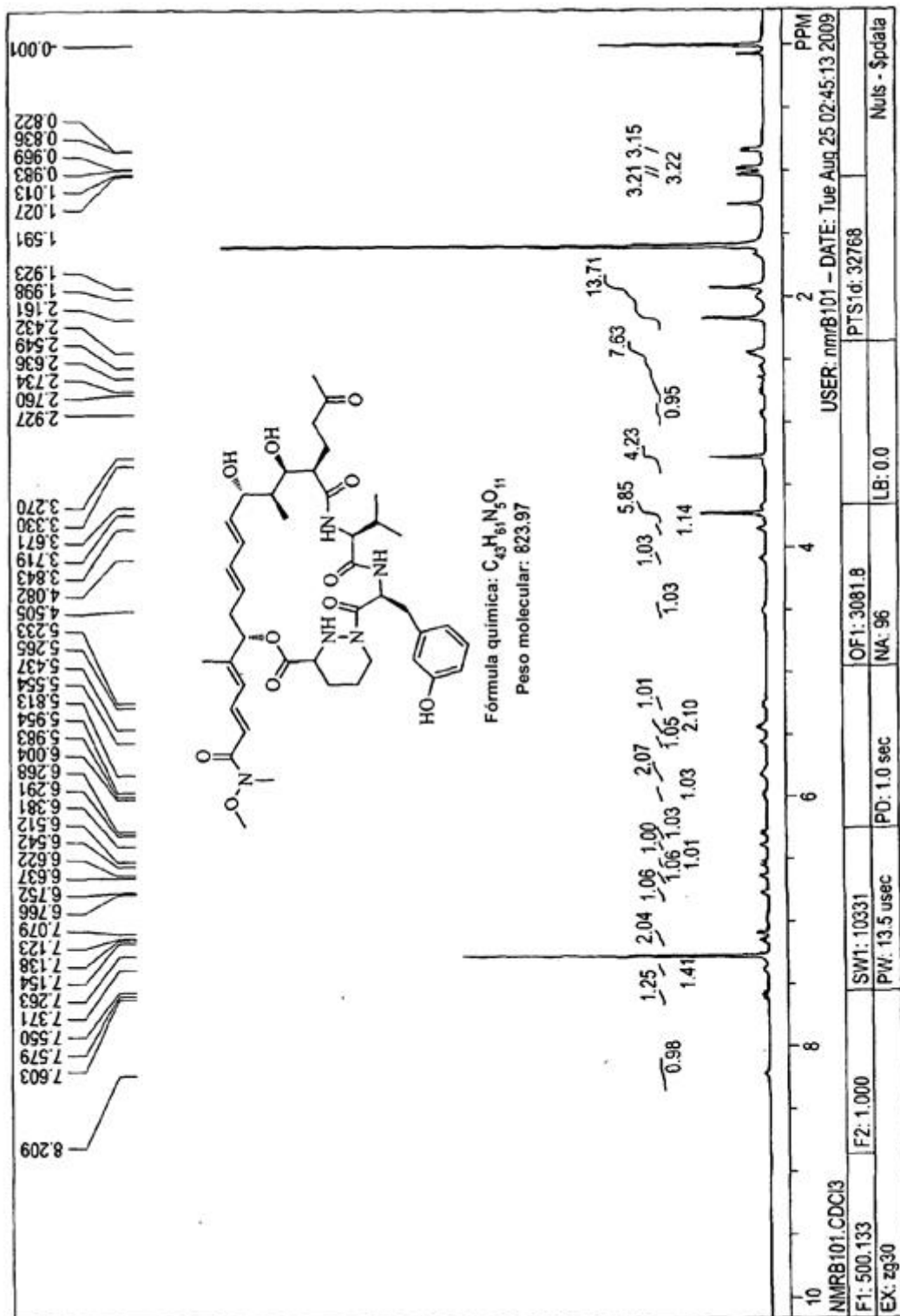


FIG. 2



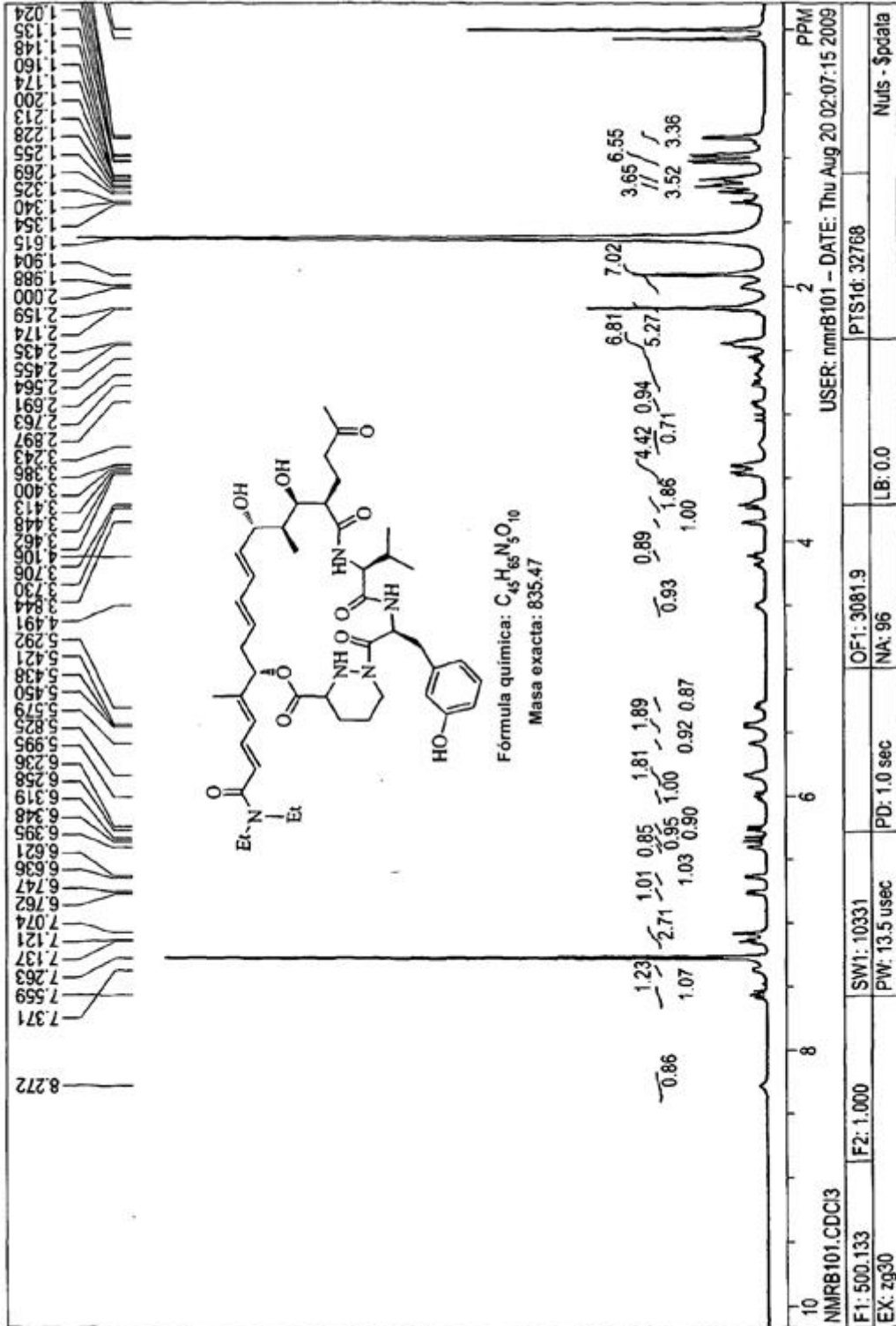


FIG. 3

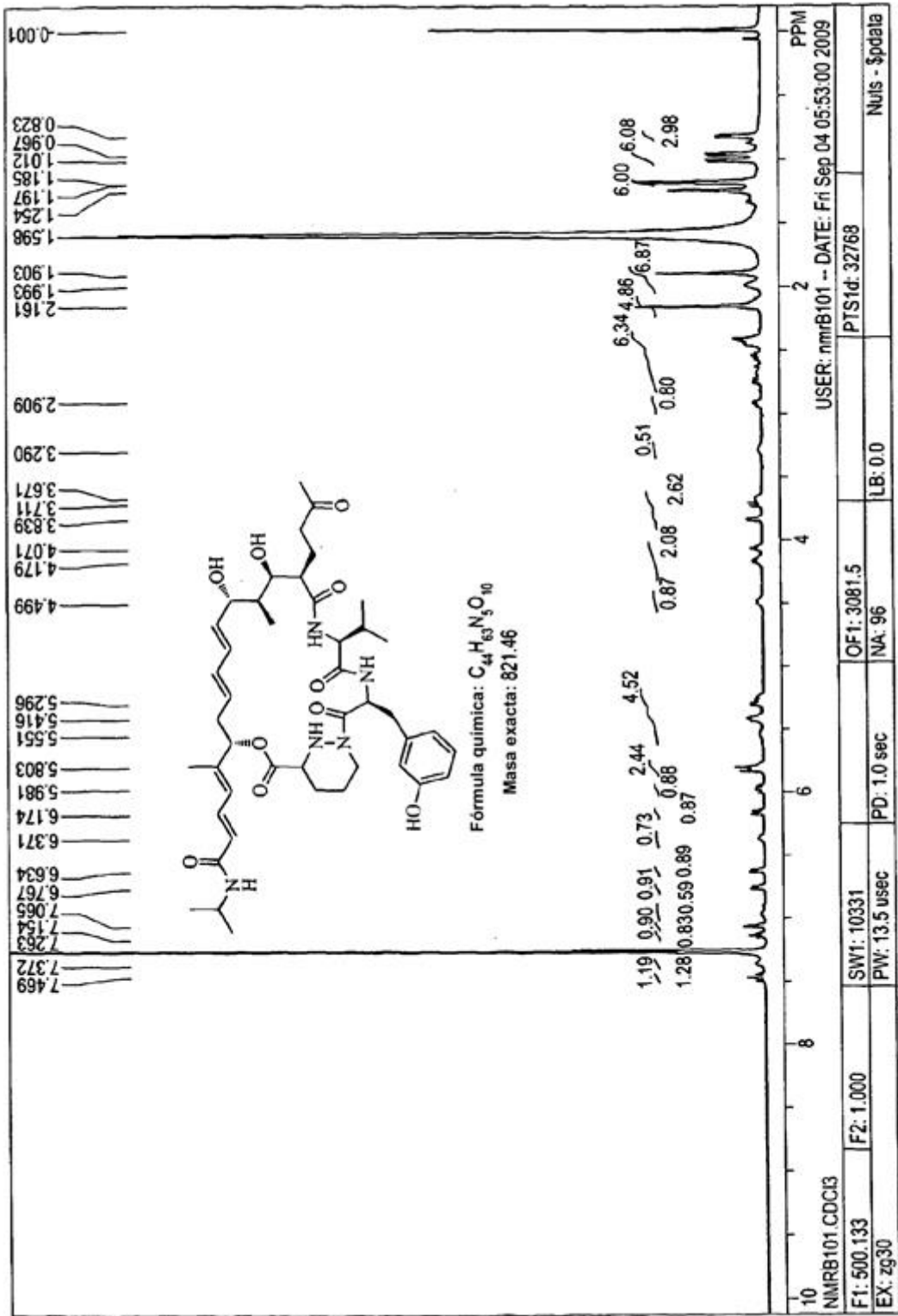


FIG. 4

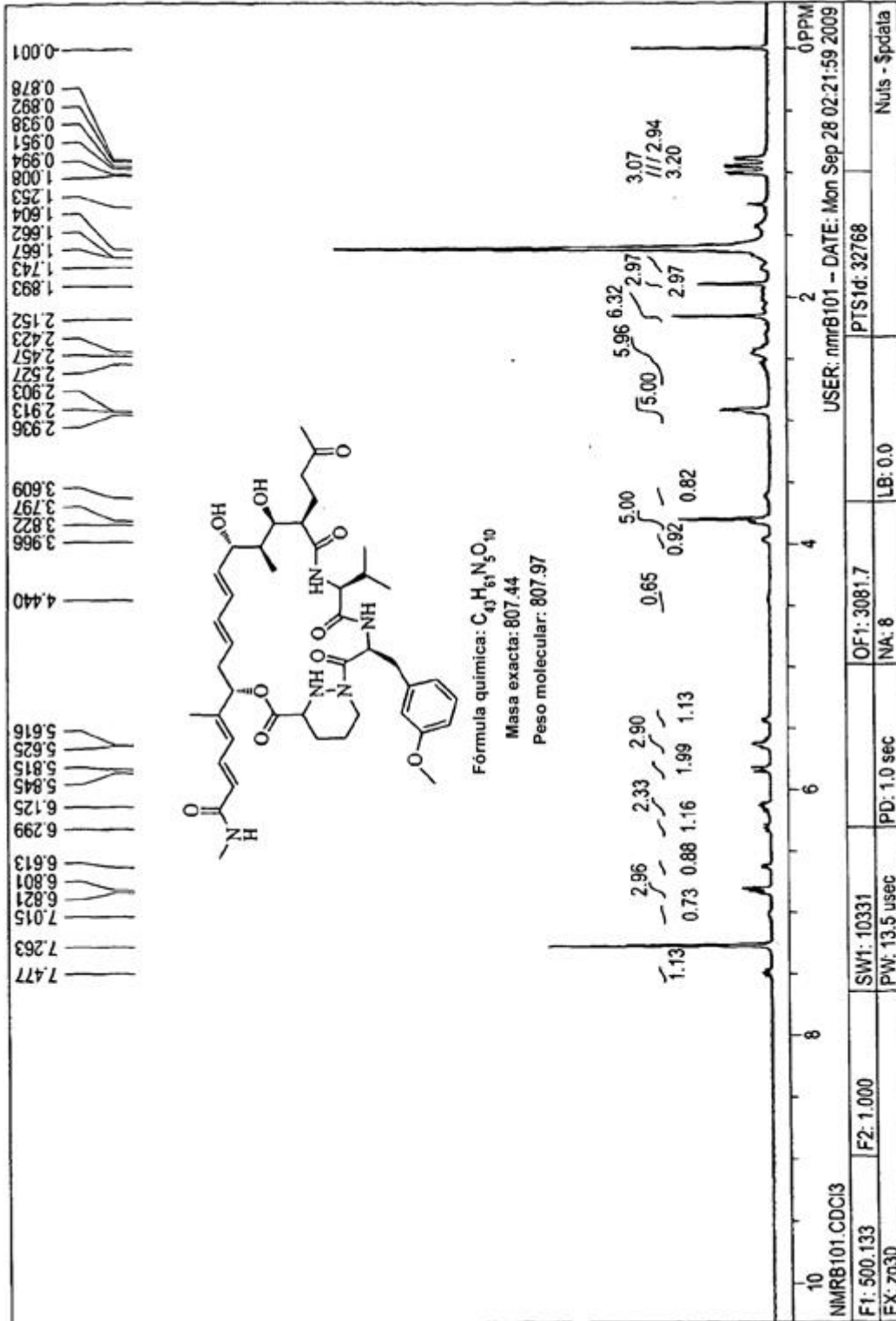


FIG. 5

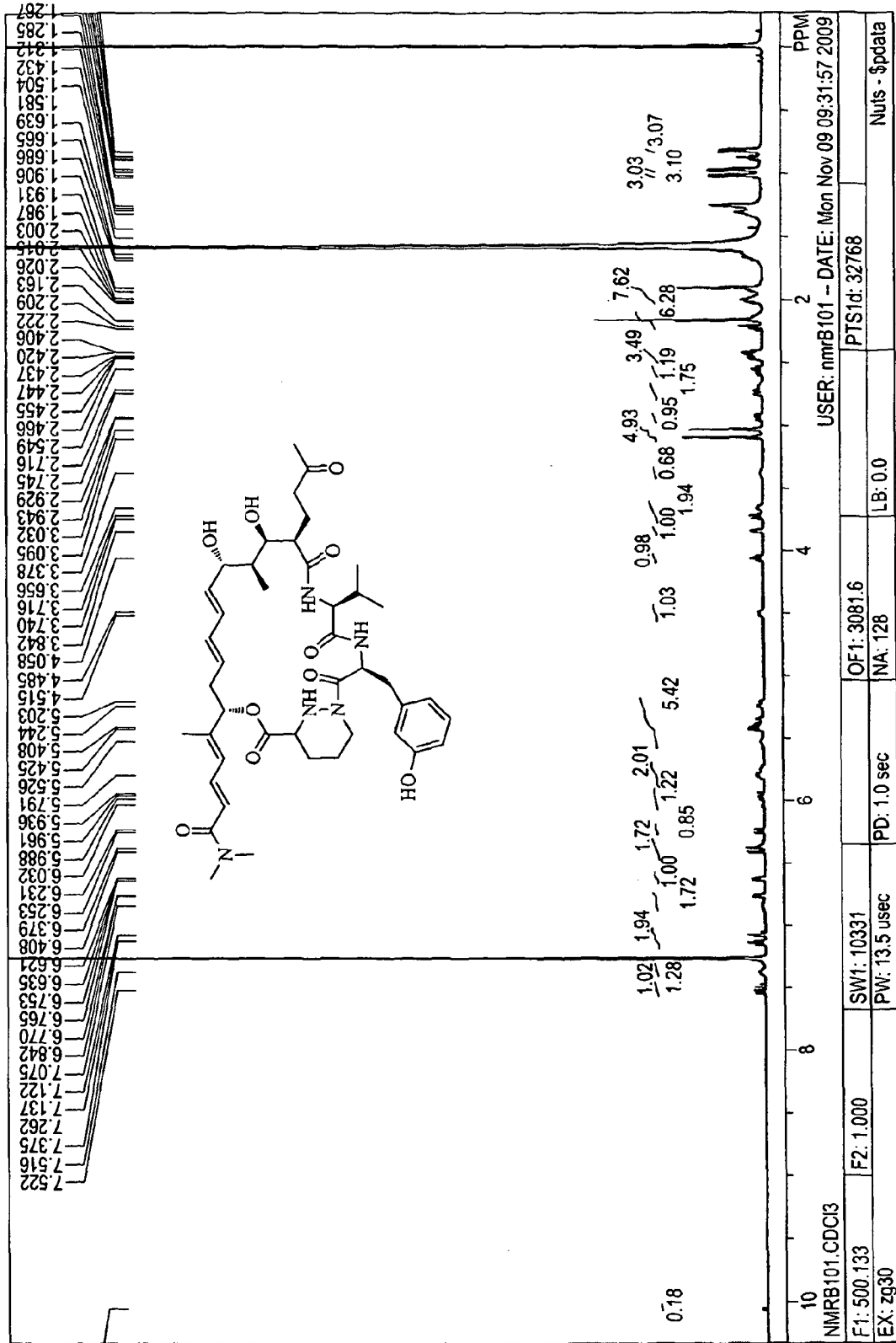


FIG. 6

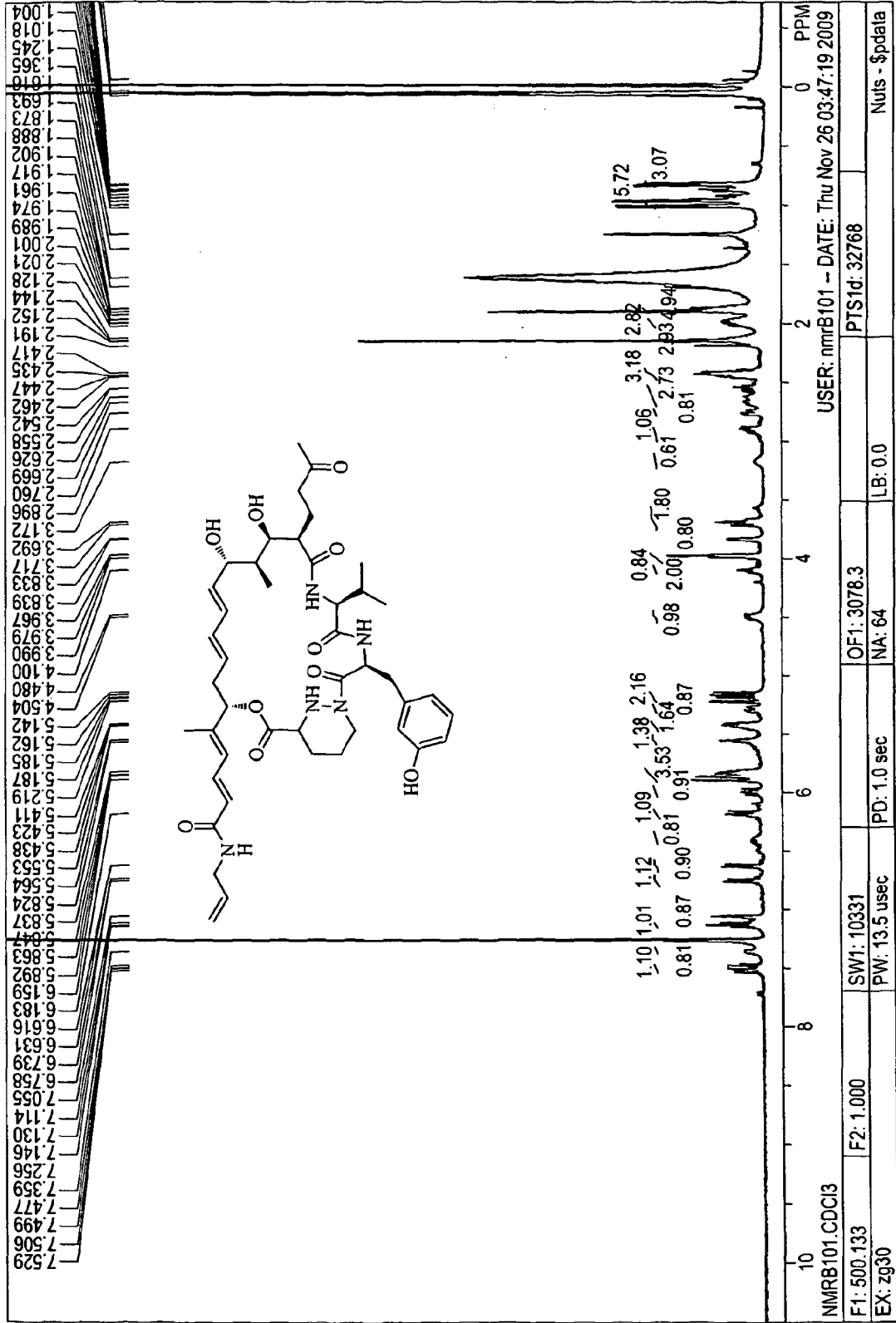


FIG. 7

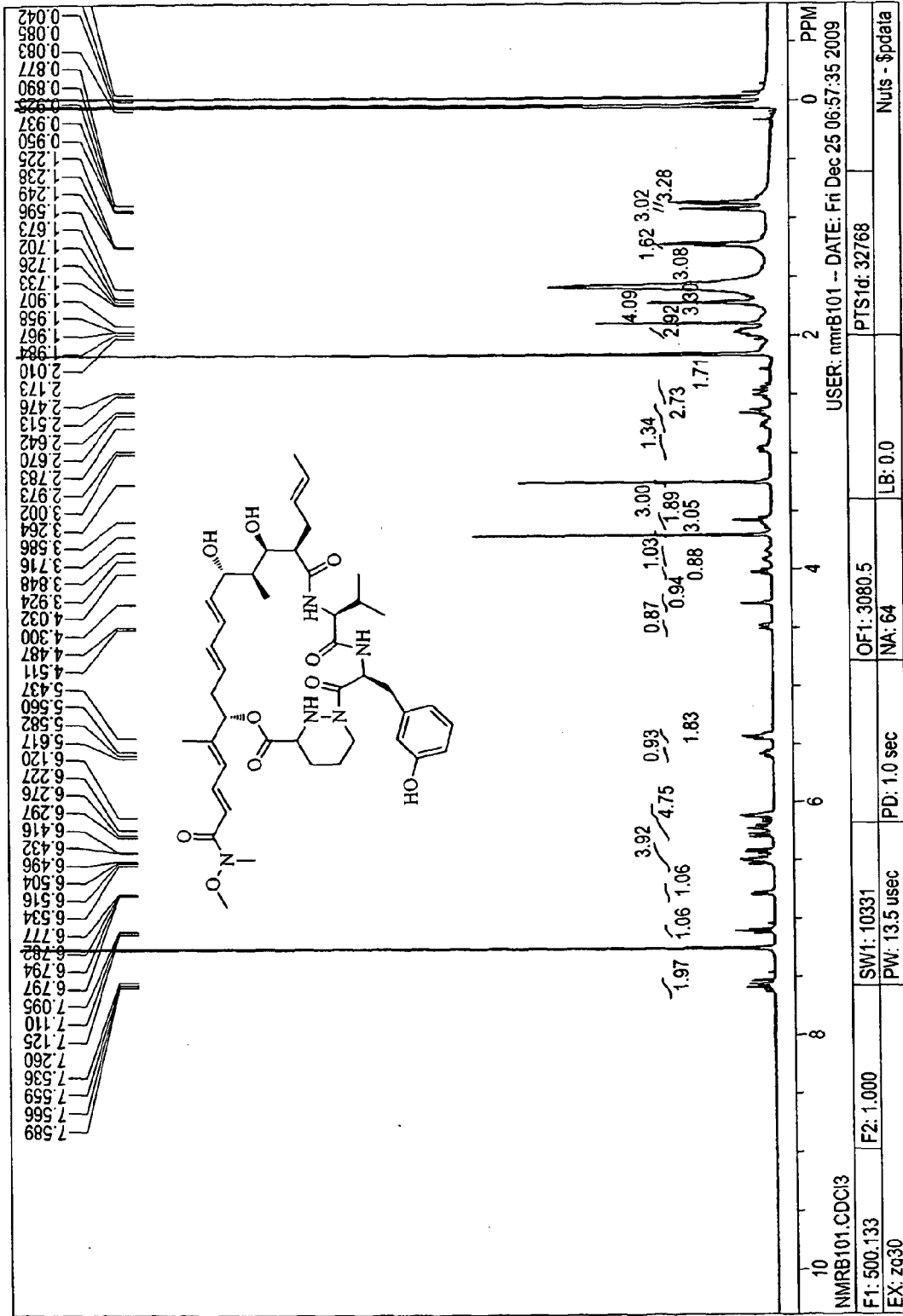


FIG. 8

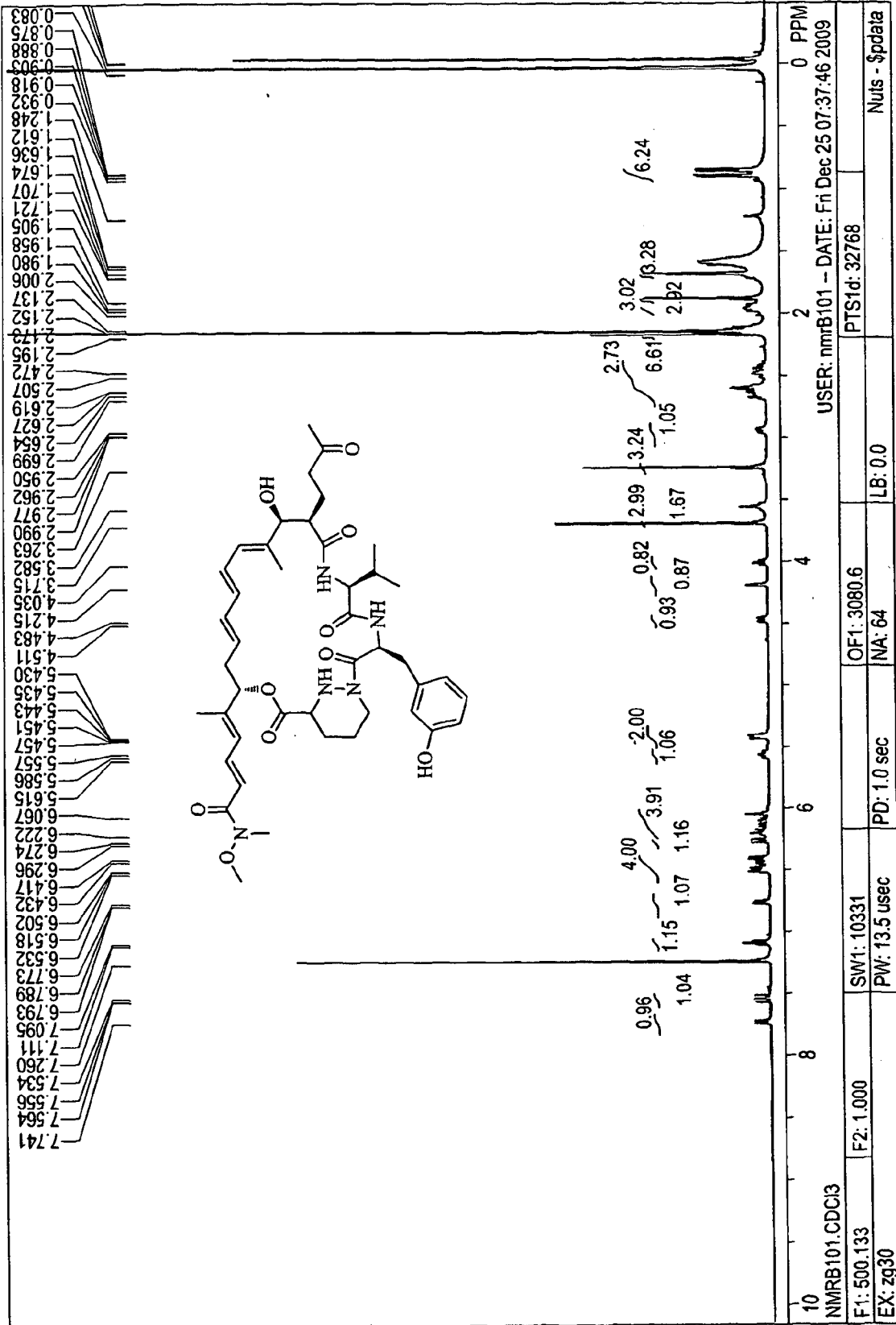


FIG. 9

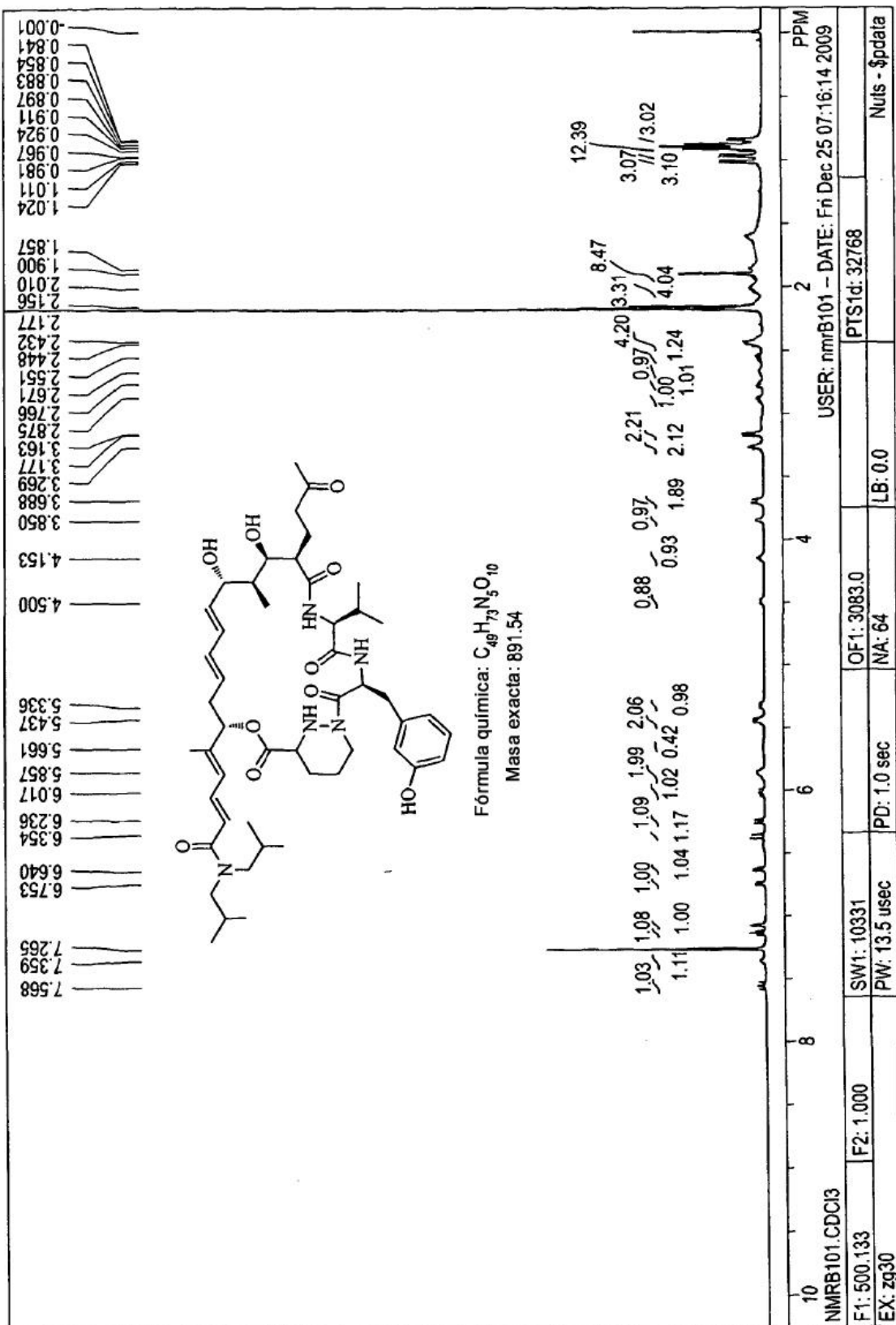


FIG. 10





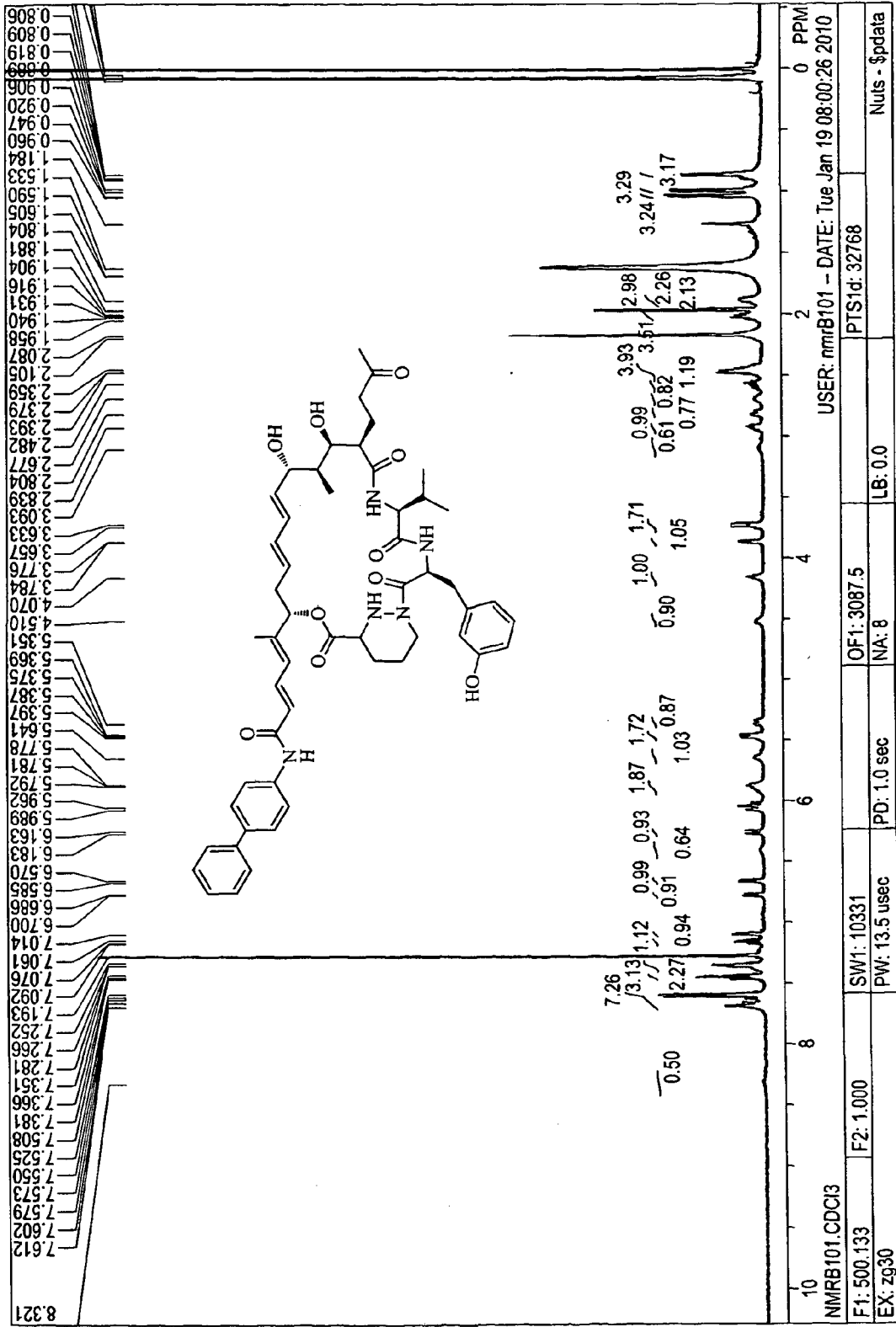


FIG. 12

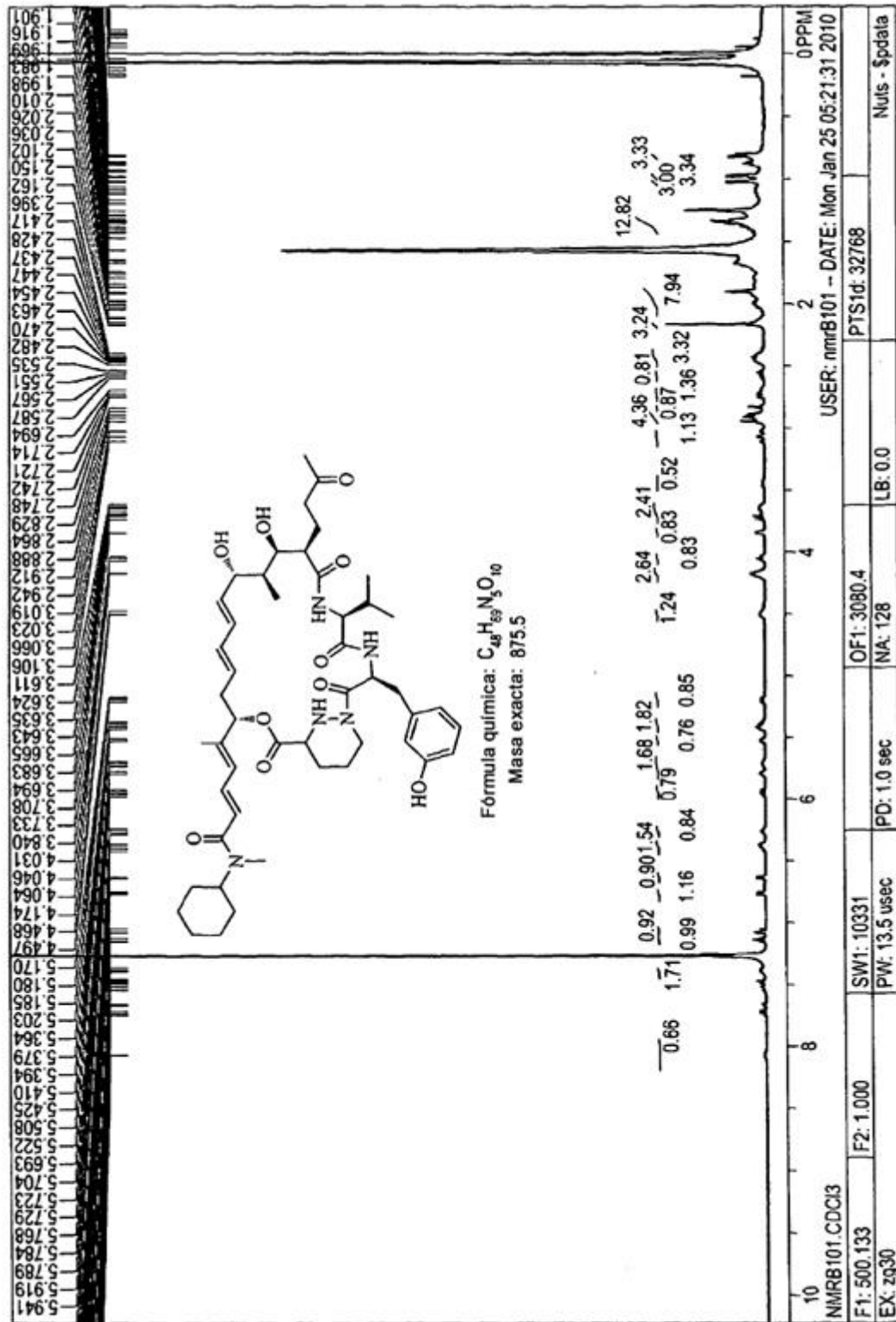


FIG. 13

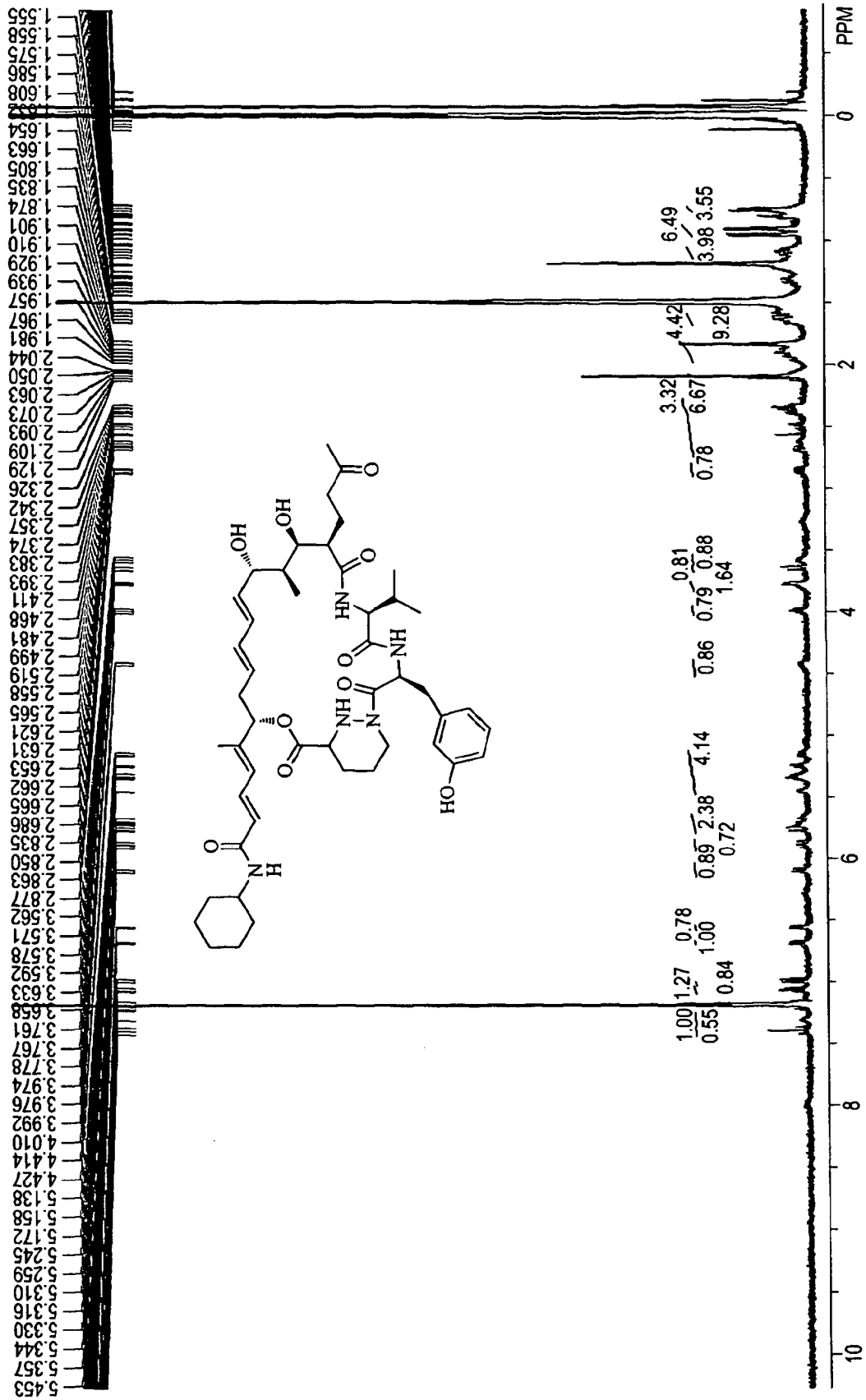


FIG. 14

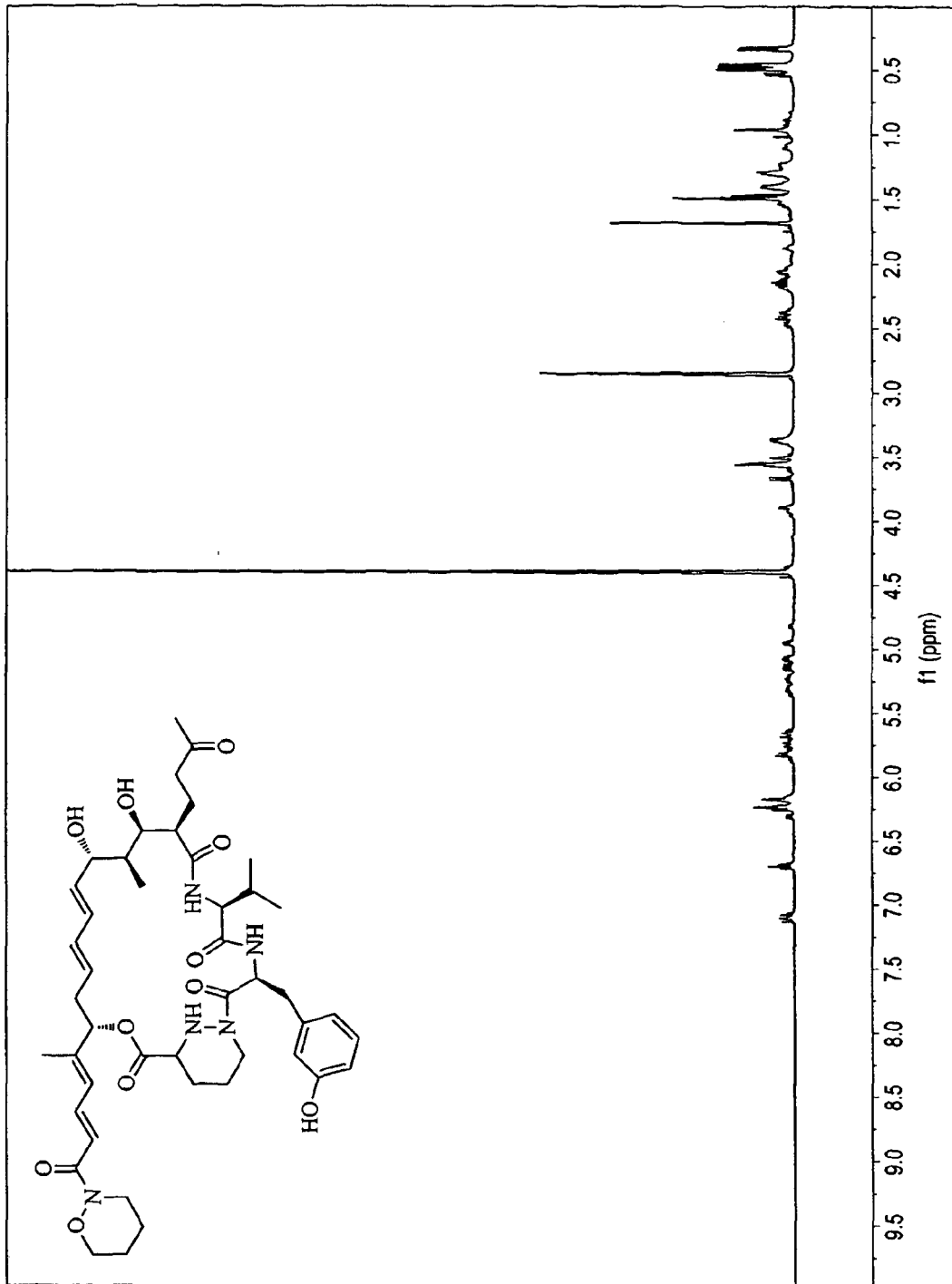


FIG. 15

GCCGAATTCCGCTGCAAGTCTACTCCGCCGAGGCCGACGGCACCCGGCTGGTCCGAGGGCGT  
 CGGCATGCTCCTCGTCGAACGGCTCGGCGACGCCGAACGGCTCGGCCACCCCGTCTCGCCG  
 TGCTGCGCGGCTCAGCGGTCAACCAGGACGGTGCCAGCAGCGGCCTCACCACCCCAACGGG  
 CCGGCCAGCAGCGGTATCCGGCAGGCGCTCGCCGACGCCCGGCTCACCCCGCCGACCT  
 GGACCTCGTGGAGGGCCACGGCACCGGCACCCCGCTCGGCGACCCGATCGAGGTGCAGGCC  
 TGCTCGCCACCTACGGCCAGGACCGCGCCGAACCGCTCTGGCTGGGCTCGGTGAAGTCCAAC  
 ATCGGCCACACCCAGGCCGCCCGGGCGTCCGCGGAGTCATCAAGGCCGTCTGGCCCTCCG  
 GCACGGTGTACTGCCCGGCACCGCCACCTGACCGAGCCGACCCCGCAGGTGCACTGGACCG  
 CCGGCGCCGTGGAACCGCTGCGGGAGACGCGCGCTGGCCCGAGACCGGCAGGCCGCGCCGC  
 GCGGCCGTGTCTCGTTCGGCATCAGCGGCACCAACGCCACATCGTCTGGAACAGGCCCC  
 CGCCCCGCGGCGCCGACGGCGCCGAGCCAGGCGCCCGCGGCGCCGCGGCCCGTCCGGGA  
 ACCAGGCCACCGCCGCGCCGAGGTCCATGGAGGACCGGACCGCCGCGCCGCTAGCGCCGGC  
 GGAGACCCGACCCCTACCGCGCCGGCCCCCTCCGCGCCCCGCCCCGCCCCCGCCCTCCC  
 CGTCCCGCTGTCCGCCGCGACCGAGCCCGGTGTCCGTGCCAGGCCCTCCGGCTGGCCGCC  
 ACCTACCGAGCACCCCGAACTCGCCCCGAGGACATCGCGTTCAGCGCCGCCACCACGCGC  
 GCCGCGCTGGCGTCCCGGGCCGTCTGTCTCGCCGACGACCGGGCCGGGCTGCTGGACGCCCT  
 CACCGCGCTGGCCGAGGGACGGCCCGCCCCGCGTTCGTACCGGCGCCCGCGGGCCGGCG  
 CGCGCCGGATCACTTCGTCTCCCCGGCCAGGGCGCCAGTGGGCGGCATGGCCGTACCC  
 CTGCTGGAGACCTCGCCGGTGTTCGCGGCGAAGTGGGCCGAATGCGCCCCGCTGCTCGCCCC  
 CTGGGTGGACTGGTGCCTCGAGGGCGTGCCTCACCGCAGGCACTGGAACGGGTTCGACG  
 TCGTCCAGCCCGTGTGTGGGCCGTATGGTTCAGCCTCGCCGAGCTGTGGCGGGCGCGGGC  
 GTACGGCCCGACGCCGTACTCGGCCATTCGAGGGCGAGATCGCCCGCCCTGCGTCCCGG  
 CGCCCTGTCCCTGGAGGACGGCGCCAAGGTGTCGCGCTGCGCGCCAAGGCCCTGCTCGCGC  
 TCGCCGGCCGCGGCGGCATGCTCTCCGTCCCGCTGCCCGAGGCGGAGGTCCGCGCCCGGCTC  
 GACAGCCGGCCCGGCTCGGCATCGCCGCGTCAACGGGCCCGCCACCGTGGTGGTCTCCGG  
 CGAGACGGCCGCCCTCGACGAGGCCAGGCCGCTGGGAGGCCGAGGGCGTCCGGGTGCGCC  
 GCATCCCCGTGACTACGCTCCCACTCCCCGCACGTCCCGAGGTGCAGGACCGCCTCGCC  
 GCCGACCTCGCCGGCATCGCCCCGCGCCCGGCCGAGGTGACCTTCCTGTCCACGCTACCCG  
 GGAACCTTCGACACCACCGGACTCGACGCCGGCTACTGGTACCGCAACCTGCGCGAGCAGG  
 TCCGCTTCGAGGCGGCCACCCGGCGCGCCCTGGAGCAGGGCCACCGCGTGTTCATCGAGGTC  
 GGCCCGCACCCCGTGTCTACGCTCGGCGTCCAGCAGACCGCCGAGGCCATGGACGTGCCCGC  
 CGAGGCGATCGCCACCTCCGCCGCGACCGAGGCCGACTGCTCCGCTTCGCGACCGCGCTCG  
 CCGAGGCCGCGTCTCGGCGCCCCGTCGACTGGGCCGCGCAACTCGCCCCGTACGCGCC  
 CGCCGGGTAGATCTGCCCTCGAGCGC

FIG. 16

GCTCTCGAGGCGGCTAGCCTCCCTGCCCGAGGCCGGCCCGGGCGGGCCGTCACCGAACTGG  
 TCCGCGAGCACGCCGCCCGCTCCTCGGCCACGACTCGCCCGCCGCGCTCCCCGCCGACCGC  
 GCCTTCCGGGACGTGGCTTCGACTCCATCACCGCGGTCGAGCTGCGCAACCGGCTCCGCTC  
 GGCCACCGGCTGGCCCTGCCGCCACCCTCGTCTTCGACCACCCGTCGCCACCGCGCTGG  
 CCGGCCACCTGCTCGCGCTCGCCTTCGACACCGCCCGGCGGAACCTCGCCCGGCCCGCC  
 CGCGCCCGGACGATGACGACGACCCGATCGCCGTCGTCGGCCTCAGCTGCCGCTACGCCGG  
 CGGCGTCGCTCCCCGGACGAGCTGTGGCGGCTCGTCGTGGCCGGTCAGGACGCGGTGGGCG  
 CCCTGCCACCGACCGTGGCTGGGACCTCGACTCGCTCTACGACTCCGACCCCGACGCCCGC  
 GGTCGAGCTACGTCCGCCAAGGGCCTTCCTCACCGACCCCGCCGGCTTCGACGCCGCCTT  
 CTTGGCATCGCCCGGCGGAGGCCCGGCCACCGACCCCGCAGCAGCGGCTGCTCCTGGAAG  
 CCGCCTGGGAGGCGTTTCGAGCACGCCGGCATCGACGCCACCGGCTGCGCGGCTCGCGCGTC  
 GCGTCTTCGCCGGCGCCAACGTGGCGACTACGCCTCCAGCCGCGGCCCTGGCGCCGGCGG  
 CTCGACGGACAGCTGCTCACCGGCAACGTCCCCAGTGTGATCTCCGGCCGGATCTCCTACA  
 CCTTCGGTTTCGAGGGGCGGCCGTCACCGTGGACACCGCCTGCTCGTCCGCCCTGGTCGCC  
 CTCCACCTGGCTGCCGGTCGGTGC CGCGCGGCGAGAGCGACATGGCCCTGGCCGGCGGCGT  
 CGCGCTCATGTCCAGCCCGGCCGCCCTGATCGGCTTCTCCGCGCAGCGCGGCCCTGTCCGGCG  
 ACGGCCGCTGCAAGGCCTTCGCCGACGCCGCCGACGGCACCGGTCTCGCCGAGGGCGTCGGA  
 CTGCTGCTGGTGAACGCCTTCCCGGGCCCGCGCCAGGGCCACCGGCTCCTCGCCCTCGT  
 ACGCGGCTCGGCGATCAACCAGGACGGCGCCTCCAACGGACTCACCGCCCCAGCGGACCCG  
 CCCAGCAGCGGTCATCACCGCCGCGCTCGCCGACGCCGGGCTGCGGCCCGCCGACGTCGAC  
 GCCGTGGAGGCCATGGCACCGGACCCGCCTCGGCGACCCGATCGAGGCCAGGCCCTGCT  
 CGCCACCTACGGACAGGACCGCGCCGAACCGCTCTGGCTCGGCTCGGTGAAGTCCAACATCG  
 GCCACTCCCAGGCCGCGTCCGGCGCGGCCGGCGTGATCAAGACCGTGCAGGCGCTGCGGCAC  
 GGCCTGCTGCCCGCCACGCTCCACGTGGACCGGCCACCACCCAGGTCGACTGGACCGCCGG  
 CGCGTTCGAGGTGCTGACCGAGGCCCGGACTGGCCGGCCGTGGACCGGCCCTCGGCGGGCCG  
 CCGTGTGGCGTTTCGGCCTGTCCGGCACCAACGCGCACGTGATCCTCGAACAGGCCCCCGCC  
 GAAGACGCCACCCGGCCCCGAACCGGCCCGGGCGAGGACTCCACCCGACCCCGAAAC  
 GGCCCCAGGCGAGGACGCCCGCGGACCGCGCCGAGCCCGCGCGGCCCGTGGTGTGGCCGG  
 TGCACGGCCGTACCCGGGACGCCCTGCGCGCCAGGCGGCGCGGCTGCGCACCCACCTGGAG  
 ACCCGCCCCGACGCCCGCCGGCCGACGTCGGCTGGACCTCGCGGCCGGTCGGGCCGTGTT  
 CGACCACCGCGCCGTGGTGTTCGGCGCCGACCGCGCCGAGCTGCTGCGCGGACTCGACGCCG  
 TCGCCGCCGGCACCCCGACCCCGCGGTGCGCGACGGCGCGGCCAGGGCGCCGAGCCGGGC  
 CGAAGCTTCT

FIG. 17

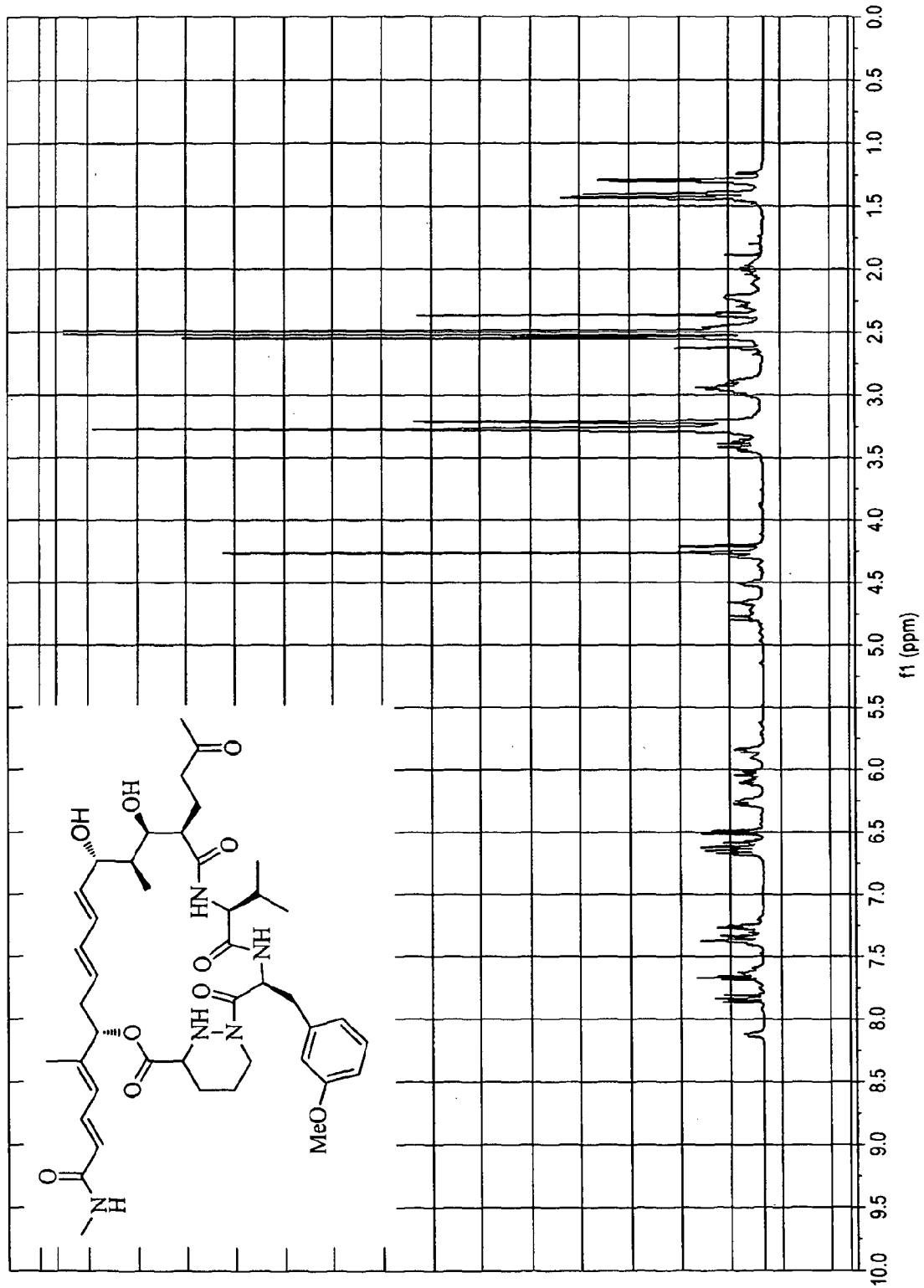


FIG. 18