

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 918**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2012 PCT/GB2012/052633**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13061052**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2012 E 12778778 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2770977**

54 Título: **Forma de dosificación novedosa**

30 Prioridad:

24.10.2011 GB 201118334

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

30.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GREGORY, MATTHEW ALAN y
MOSS, STEVEN JAMES**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 639 918 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

Forma de dosificación novedosa

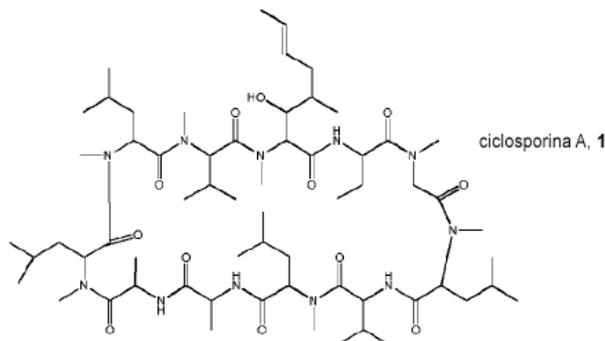
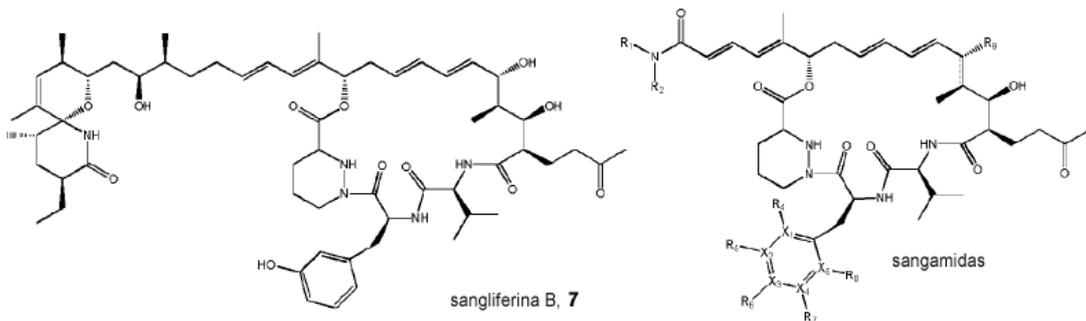
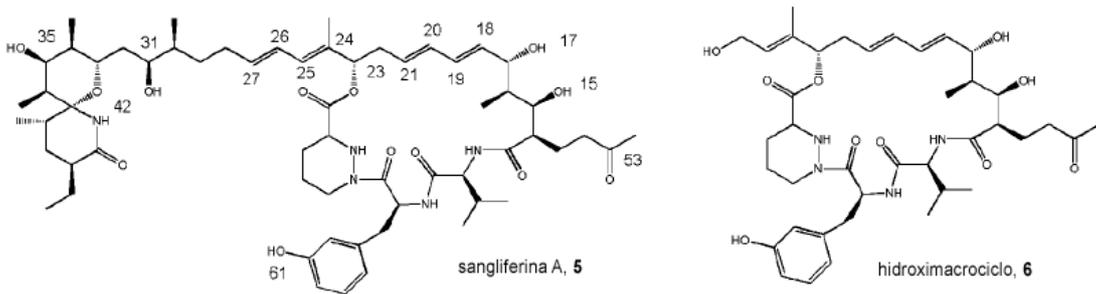
5 Introducción

La presente invención se refiere a formulaciones para aumentar la biodisponibilidad oral de sangliferinas, incluyendo sangliferinas naturales (tales como sangliferina A, B, C y D) y sangliferinas no naturales, tales como sangamidas, protegiendo el principio activo, por ejemplo, mediante recubrimiento entérico para reducir la degradación ácida en el estómago. Se prevé que esto aumente la biodisponibilidad oral liberando material directamente en el compartimento intestinal del sujeto, en el que las sangliferinas son menos propensas a la degradación.

Antecedentes de la invención

15 Sangliferinas

La sangliferina A (SfA), 5 y sus congéneres naturales pertenecen a una clase de péptidos no ribosómicos/policétidos mixtos, producidos por *Streptomyces sp.* A92-308110 (también conocido como DSM 9954) (véanse los documentos WO 97/02285 y WO 98/07743), que se descubrieron originalmente basándose en su alta afinidad por ciclofilina A (CypA). SfA es el componente más abundante en caldos de fermentación y muestra una afinidad aproximadamente 20 veces superior por CyPA en comparación con ciclosporina A (CsA), 1. Esto ha conducido a sugerir que las sangliferinas pueden ser útiles para el tratamiento de VHC (documento WO2006/138507). También se ha mostrado que las sangliferinas muestran un mecanismo novedoso de actividad inmunosupresora en comparación con CsA (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).



Biosíntesis de sangliferinas

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

Sangliferinas semisintéticas

En la bibliografía se han descrito ejemplos de la generación de derivados semisintéticos de sangliferinas naturales. Estos incluyen sangamidas (Moss *et al.*, 2011, documento WO2011/098809), análogos macrocíclicos de éster de sangliferina (documento WO2011/098805) y análogos macrocíclicos de cetona de sangliferina (documento WO2011/098808). Uno de los motivos mencionados para la generación de análogos ha sido mejorar la biodisponibilidad oral. También se han descrito otros análogos en la bibliografía (por ejemplo Sedrani *et al.*, 2003, documento WO 2006/138507, Gaither *et al.*, 2010).

Usos de sangliferinas

Acción inmunosupresora de sangliferinas

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

La estructura molecular de SfA es compleja y se piensa que su interacción con CyPA está mediada en gran medida por la parte macrocíclica de la molécula. De hecho, un compuesto macrocíclico (hidroximacrociclo, 6) derivado a partir de escisión oxidativa de SfA ha mostrado una fuerte afinidad por CyPA (Sedrani *et al.*, 2003). Datos de estructura mediante cristalografía de rayos X han mostrado que el hidroximacrociclo se une al mismo sitio activo de CyPA que CsA. También se ha mostrado anteriormente que análogos basados en el resto de macrociclo de SfA carecen de propiedades inmunosupresoras (Sedrani *et al.*, 2003), proporcionando oportunidad para diseñar inhibidores de CyP no inmunosupresores para su posible uso en la terapia contra VHC y VIH.

En contraposición a esto, también existe la oportunidad de desarrollar agentes inmunosupresores con baja toxicidad para su uso en campos tales como la profilaxis de rechazo de trasplante, trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y respiratorios, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Crohn, síndrome de Behcet, uveítis, psoriasis, dermatitis atópica, artritis reumatoide, síndrome nefrítico, anemia aplásica, cirrosis biliar, asma, fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y enfermedad celíaca. Se ha mostrado que las sangliferinas tienen un mecanismo novedoso de actividad inmunosupresora (Zenke *et al.*, 2001), que actúa posiblemente a través de quimiocinas de células dendríticas (Immecke *et al.*, 2011), y por tanto existe la oportunidad de desarrollar agentes con un mecanismo de acción diferente al de los agentes clínicos actuales, tales como ciclosporina A, rapamicina y FK506.

Virus de inmunodeficiencia humano (VIH)

Los inhibidores de ciclofilina, tales como CsA y DEBIO-025, también han mostrado una posible utilidad en la inhibición de la replicación de VIH. Se piensa que los inhibidores de ciclofilina interfieren con la función de CyPA durante la progresión/terminación de la transcripción inversa de VIH (Ptak *et al.*, 2008). Sin embargo, cuando se sometió a pruebas clínicas, DEBIO-025 sólo redujo los niveles de ARN de VIH-1 $\geq 0,5$ y ≥ 1 log₁₀ copias/ml en nueve y dos pacientes respectivamente, mientras que 27 de los pacientes tratados no mostraron ninguna reducción en los niveles de ARN de VIH-1 (Steyn *et al.*, 2006). Después de esto, se sometió a ensayo DEBIO-025 en pacientes infectados conjuntamente por VHC/VIH, y mostró una eficacia mejor frente a VHC, y se interrumpieron los ensayos clínicos con VIH (véase Watashi *et al.*, 2010).

Virus de la hepatitis B

La hepatitis B es un virus de ADN de la familia de *Hepadnaviridae*, y es el agente causante de la hepatitis B. En contraposición a los casos con VHC y VIH, ha habido muy pocos informes publicados de actividad de inhibidores de ciclofilina frente a los de la hepatitis B. Ptak *et al.* 2008 describieron una actividad débil de DEBIO-025 frente a VHB (CI₅₀ de 4,1 μ M), mientras que Xie *et al.*, 2007 describieron algo de actividad de CsA frente a VHB (CI₅₀ >1,3 μ g/ml). Esto contrasta con VIH y VHC, en los que hay numerosos informes de actividad antiviral nanomolar de

inhibidores de ciclofilina.

Inhibición del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)

5 La apertura de los poros de transición de permeabilidad de alta conductancia en mitocondrias inicia la aparición de la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT). Esto es un acontecimiento causante, que conduce a necrosis y apoptosis en hepatocitos tras estrés oxidativo, toxicidad por Ca^{2+} e isquemia/reperfusión. Se ha mostrado que la inhibición de ciclofilina D (también conocida como ciclofilina F) por parte de inhibidores de ciclofilina bloquea la apertura de poros de transición de permeabilidad y protege frente a la muerte celular tras estos estreses. Por tanto,
10 los inhibidores de ciclofilina D pueden ser útiles en indicaciones en las que está implicada la apertura de mPTP, tales 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
15 (Gomez *et al.*, 2007) y consumo crónico de alcohol (King *et al.*, 2010).

Usos terapéuticos adicionales

20 Los inhibidores de ciclofilina tienen posible actividad frente a, y por tanto en el tratamiento de, infecciones de otros virus, tales como virus de varicela-zóster (Ptak *et al.*, 2008), virus influenza A (Liu *et al.*, 2009), coronavirus de 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).

25 También hay informes de utilidad de inhibidores de ciclofilina e inhibición de ciclofilina en otros campos terapéuticos, tales como en el cáncer (Han *et al.*, 2009).

Biodisponibilidad oral de sangliferinas

30 Uno de los problemas en el desarrollo de fármacos de sangliferinas naturales y no naturales es la baja biodisponibilidad oral (por ejemplo, véase Gregory *et al.*, 2011). Esto puede conducir a costes más altos de productos, aumento de la posibilidad de efecto con alimentos y mayor variabilidad entre pacientes. Mientras que una vía para mejorar esto es generar análogos novedosos, otra vía es usar formulaciones.

35 Por tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar formulaciones novedosas para la dosificación oral de sangliferinas, que puedan aumentar la biodisponibilidad oral de esta clase posiblemente importante de fármacos. Las sangliferinas pueden tener utilidad en el tratamiento de infección por VHC, pero también en el tratamiento de otros campos de enfermedad en los que la inhibición de ciclofilinas puede ser útil, tales como infección por VIH, distrofia muscular o ayuda en la recuperación tras infarto de miocardio o en los que la inmunosupresión o el efecto antiinflamatorio es útil.

Sumario de la invención

45 Los presentes inventores han descubierto de manera inesperada que, mientras que las sangliferinas son metabólicamente estables, y son estables a pH neutro, se degradan rápidamente en condiciones ácidas, tales como fluido intestinal simulado (SGF) o el estómago.

50 Por tanto, la invención proporciona formas de dosificación orales de sangliferinas en las que el compuesto de sangliferina está protegido frente a degradación ácida en el estómago (lo más preferiblemente mediante recubrimiento entérico del material) de tal manera que se libera directamente en el entorno de pH superior del intestino delgado desde el cual puede absorberse en el sistema. Se espera que tales formas de dosificación tengan una biodisponibilidad muy mejorada con respecto a formas en las que las sangliferinas no están protegidas frente a degradación ácida en el estómago.

55 Estas formas de dosificación pueden usarse para sangliferinas naturales tales como sangliferinas A, B, C y D, y para sangliferinas no naturales tales como sangamidas.

60 Por tanto, según un primer aspecto de la invención, se proporciona una forma de dosificación farmacéutica para administración oral que comprende una sangliferina como principio activo en la que el principio activo de sangliferina está protegido frente a degradación ácida en el entorno del estómago tras la administración oral.

Definiciones

65 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 cuanto a la composición (como en la sustitución de un átomo por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular).

Tal como se usa en el presente documento, el término “sangliferina(s)” se refiere a compuestos químicos tales como sangliferina A y a aquellos compuestos que son estructuralmente similares a sangliferina A pero que difieren ligeramente en cuanto a la composición química (tal como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular aquellos generados mediante fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110. Los ejemplos incluyen los compuestos de tipo sangliferina comentados en los documentos WO97/02285 y WO98/07743, tales como sangliferina B. Otros ejemplos incluyen compuestos de fórmula (X) o (I) a (VII). El término “sangliferina(s)” incluye compuestos conocidos como “sangamidas” (véase Moss *et al.*, 2011, documento WO2011/098809).

Tal como se usa en el presente documento, el término “sangliferina(s) mutasintética(s)” se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a sangliferina A, B, C o D pero que difieren ligeramente en cuanto a la composición (como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular) debido a la incorporación de un precursor no natural, en particular, aquellos generados mediante fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110 o un mutante del mismo, en los que el cultivo se alimenta con un análogo de meta-tirosina.

Tal como se usa en el presente documento, el término “sangliferina(s) alterada(s) por biosíntesis” se refiere a compuestos químicos que se biosintetizan mediante la agrupación de genes de sangliferina (véase el documento WO2010/034243), y son estructuralmente similares a sangliferina A, B, C o D pero que difieren ligeramente en cuanto a la composición (como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular), debido a alteraciones en la agrupación de genes, tales como sustitución o alteración de un dominio de aciltransferasa, delección, sustitución o adición de un módulo o dominio de policétido sintasa, tal como delección, sustitución o adición de una aciltransferasa, dominio de carga, dominio de bucle reductor (tal como uno o más de un dominio de deshidratasa, ceto-reductasa o enoilreductasa) o dominio de cetosintasa (por ejemplos, véanse los documentos WO 98/01546 o WO2010/034243) en particular, las generadas mediante fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110 o un mutante del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “análogo(s) de meta-tirosina” se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a meta-tirosina pero que difieren ligeramente en cuanto a la composición (como en la sustitución de uno o más átomos por otro o en la presencia o ausencia de un grupo funcional particular). Los ejemplos incluyen (2S)-2-amino-3-(6-hidroxi-(2-piridil))propanoato de metilo, éster metílico de L-3-aminofenilalanina, éster metílico de L-4-metil-meta-tirosina, éster metílico de L-4-fluoro-meta-tirosina, éster metílico de L-4,5-difluoro-meta-tirosina, DL-3-fluorofenilalanina, L-fenilalanina, DL-4-fluorometa-tirosina, DL-5-fluoro-meta-tirosina, 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo, 2-amino-3-(2-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo, 2-amino-3-(2-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo y 2-amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo.

Tal como se usa en el presente documento, el término “bacteria productora de sangliferina” se refiere a cualquier cepa bacteriana que produce de manera natural una sangliferina o a sangliferina alterada por biosíntesis cuando se cultiva en condiciones apropiadas (por ejemplo, proporcionar medios de crecimiento y precursores necesarios). Esto incluye, pero no se limita a, *Streptomyces sp.* A92-308110, también conocido como DSM 9954 (véanse los documentos WO 97/02285 y WO 98/07743), también conocido como *Streptomyces flaveolus*.

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

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

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

Tal como se usa en esta solicitud, el término “solubilidad en agua” 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%. A continuación en los ejemplos se proporcionan pruebas para determinar la solubilidad en agua como “ensayo de solubilidad en agua”.

Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de la invención, tales como los compuestos de fórmula (I), incluyen sales convencionales formadas a partir de bases o ácidos orgánicos o inorgánicos farmacéuticamente aceptables así como sales de adición de ácido de amonio cuaternario. Los ejemplos más específicos de sales de ácido adecuadas 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, esteoico, tánico y similares. Las sales de ácido clorhídrico son de particular interés. Otros ácidos tales como oxálico, aunque no son en sí mismos farmacéuticamente aceptables, 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 de base adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, cinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaína. Las referencias a continuación en el presente documento a un compuesto según la invención incluyen tanto compuestos de fórmula (I) como sus sales farmacéuticamente aceptables.

Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado, que contiene normalmente 1-10 átomos de carbono, por ejemplo un grupo alquilo C₁₋₆. "Alquenilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene dos o más carbonos (por ejemplo 2-10 carbonos, por ejemplo un grupo alquenilo C₂₋₆) que está insaturado con uno o más dobles enlaces.

Los ejemplos de grupos alquilo incluyen grupos alquilo C₁₋₄ tales como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo y n-butilo. Los ejemplos de grupos alquenilo incluyen grupos alquenilo C₂₋₄ tales como -CH=CH₂ y -CH₂CH=CH₂.

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 ramificado, 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 son adecuadamente monocíclicos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "recubrimiento entérico" significa un recubrimiento de barrera aplicado a una sustancia para prevenir la liberación de dicha sustancia tras la administración oral antes de que alcance el intestino delgado.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término "heterociclenilo" representa un grupo cicloalquenilo en el que uno o más átomos de carbono de anillo (por ejemplo 1, 2 ó 3 átomos de carbono de anillo, tal como 1 ó 2, por ejemplo 1) se sustituyen por heteroátomos seleccionados de O, N y S.

Los ejemplos de grupos arilo incluyen (excepto cuando se indique) grupos monocíclicos, es decir fenilo, y anillos bicíclicos (por ejemplo anillos de 9 y 10 miembros) que son aromáticos o (en el caso de anillos bicíclicos) 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. Un arilo preferido es fenilo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con uno o más (por ejemplo 1, 2 ó 3) sustituyentes, por ejemplo seleccionados de alquilo (por ejemplo, alquilo C₁₋₄), hidroxilo, CF₃, halógeno, alcoxilo (por ejemplo, alcoxilo C₁₋₄), nitro, -SO₂Me, ciano y -CONH₂.

Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen (excepto cuando se indique) 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 anillos bicíclicos) contienen al menos un anillo aromático, y contienen uno o más heteroátomos (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4 heteroátomos) seleccionados de N, O y S. Los ejemplos de anillos heteroarilos de 5 miembros incluyen pirrol, furano, tiofeno, oxazol, oxadiazol, tiazol y triazol. Los ejemplos de anillos 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 parcialmente aromáticos tales como cromeno, cromano, tetrahydroquinolina, dihydroquinolina, isoindolina e indolina. Se prefieren grupos heteroarilo monocíclicos. Los grupos heteroarilo mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos tal como se describió anteriormente para grupos arilo.

Cuando los grupos arilo y heteroarilo bicíclicos son parcialmente aromáticos, la unión al 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.

Leyenda de figuras

5 Figura 1: Imágenes de perfiles de 24 tras la incubación en condiciones ácidas y neutras. A: 24 en PBS, pH 7,3 (t=0, 8,0 horas). B: 24 en condiciones ácidas, pH 1,2 (t = 0, 0,33, 0,67, 1,0 horas).

10 Figura 2: Comparación del porcentaje de 24 en disolución tras la dosificación de una única cápsula con recubrimiento entérico o sin recubrimiento en condiciones ácidas a pH 1,0, que se ajustaron a pH 6,8 tras 60 minutos, para imitar el pH de los compartimentos del estómago e intestinales.

Descripción detallada de la invención

15 En una realización, la protección del principio activo puede lograrse proporcionando una capa de recubrimiento entérico, siendo dicho recubrimiento entérico estable en el entorno ácido del estómago, y adaptado para liberar el principio activo en el entorno de pH superior del intestino delgado.

En una realización, el principio activo está particulado y el recubrimiento entérico se aplica a las partículas de principio activo.

20 En una realización, el principio activo está en forma de un granulado, y el recubrimiento entérico se aplica a los gránulos de principio activo.

25 En una realización, el principio activo está recubierto sobre una perla (por ejemplo, una esfera de azúcar o almidón) y el recubrimiento entérico se aplica a la perla recubierta. Tales perlas recubiertas pueden formularse para dar comprimidos o cápsulas.

En una realización, el principio activo (por ejemplo en forma de polvo) está contenido dentro de una cápsula, estando dicha cápsula dotada de un recubrimiento entérico.

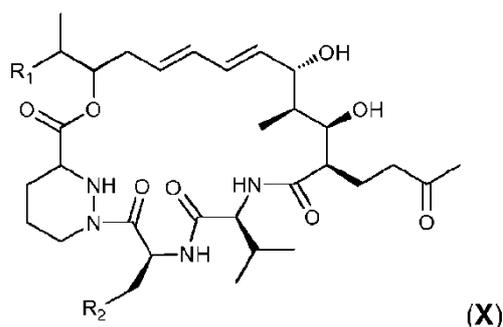
30 En una realización, el principio activo (por ejemplo en forma de polvo) está contenido dentro de un comprimido, estando dicho comprimido dotado de un recubrimiento entérico.

Sangliferinas

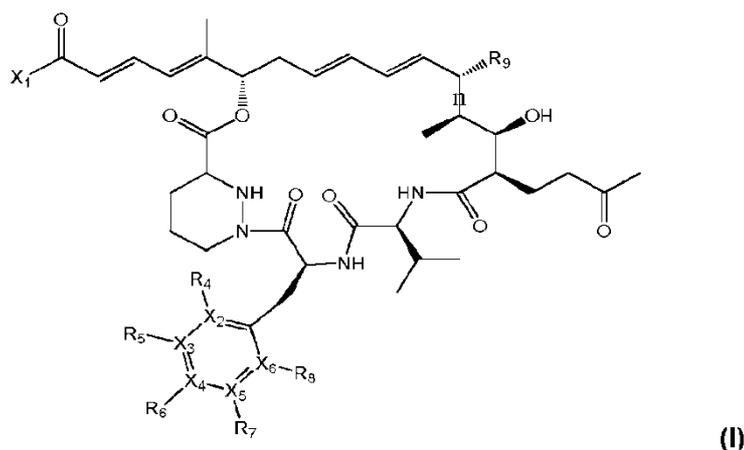
35 En una realización, la sangliferina es una sangliferina natural tal como sangliferina A, B, C o D.

40 En una realización, la sangliferina es una sangliferina no natural (tal como un sangliferina semisintética, alterada por biosíntesis o mutasintética). En una realización, puede ser una sangliferina no natural preparada mediante modificación química de una sangliferina natural. En otra realización, puede ser el producto de alimentar un precursor no natural a una bacteria productora de sangliferina. Por ejemplo, puede ser el producto de alimentar un análogo de meta-tirosina a una bacteria productora de sangliferina. En otra realización, puede ser el producto de alimentar precursores naturales o no naturales a una bacteria productora de sangliferina en la que la PKS de sangliferina se ha modificado con respecto a uno o más módulos o dominios (véase el documento WO2010/034243), o puede ser el producto de fermentación directa de una bacteria productora de sangliferina genéticamente alterada en la que la PKS de sangliferina se ha modificado con respecto a uno o más módulos o dominios, mediante alteraciones en la agrupación de genes, tales como sustitución o alteración de un dominio de aciltransferasa, deleción, sustitución o adición de un módulo o dominio de policétido sintasa, tal como deleción, sustitución o adición de una aciltransferasa, dominio de carga, dominio de bucle reductor (tal como uno o más de un dominio de deshidratasa, ceto-reductasa o enoilreductasa) o dominio de cetosintasa (por ejemplos, véanse los documentos WO 98/01546 o WO2010/034243) en particular, las generadas mediante fermentación de *Streptomyces sp.* A92-308110 o un mutante del mismo.

55 En una realización, la sangliferina es un compuesto de fórmula (X) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



- 5 en la que R_1 representa un resto orgánico (es decir un resto compuesto por átomos de carbono e hidrógeno y que contiene opcionalmente uno o más átomos de N, O o S) y R_2 representa un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido (tal como un grupo fenilo, piridina o pirimidina opcionalmente sustituido, de manera adecuada un grupo fenilo opcionalmente sustituido) incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetal mediante la combinación del ceto en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol. Pueden seleccionarse sustituyentes opcionales para arilo o heteroarilo, por ejemplo, de halógeno, alquilo, F, Cl, Br, alqueno o alquilo en los que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en el que p representa 0, 1 ó 2 y en los que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno. Un sustituyente a modo de ejemplo es hidroxilo (por ejemplo en la posición meta).
- 10
- 15 En una realización, la sangliferina no natural es un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



- 20 en la que:
- el resto X_1 representa $-OR_1$, $-NR_1R_2$ o R_3 ;
- 25 R_1 , R_2 y R_3 representan independientemente alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquencilicloalquilo, alquencilicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;
- 30 y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 , R_2 y R_3 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 , R_2 y R_3 están opcionalmente sustituidos por carbonilo;
- 35 o R_1 y R_2 están unidos de tal manera que NR_1R_2 representa un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno especificado y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo adicional seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo;
- 40 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R_1 , R_2 y R_3 puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

o R₁ y/o R₂ representa hidrógeno;

R₉ representa H u OH;

5 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R₉ representa H;

10 R₄, R₅, R₆, R₇ y R₈ representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno o alquilo en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

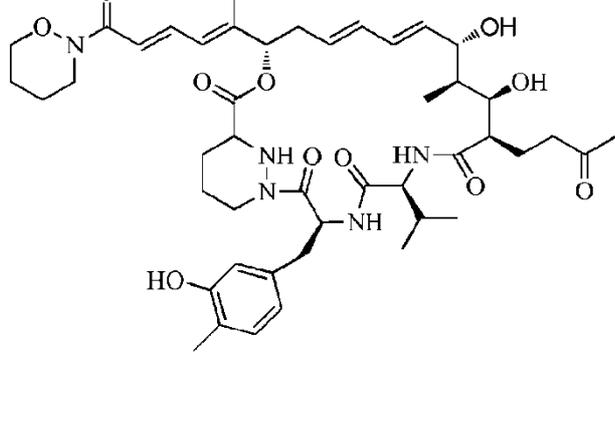
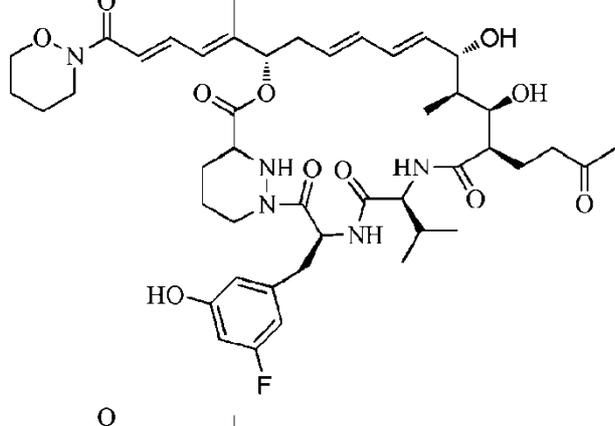
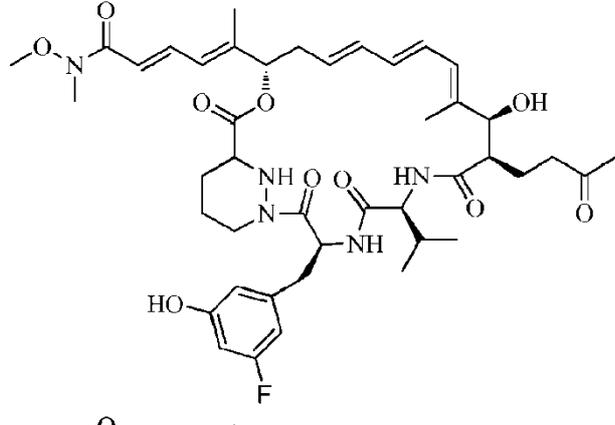
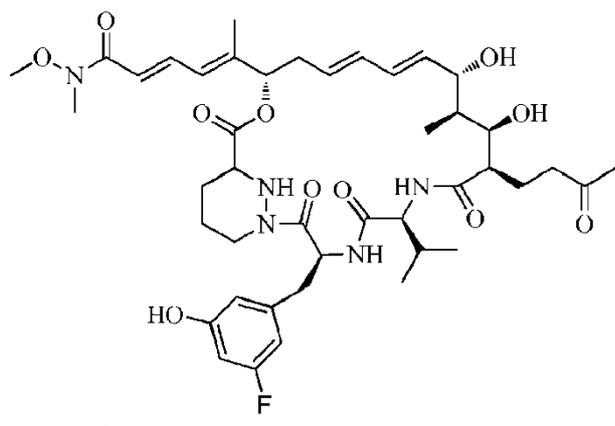
15 X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

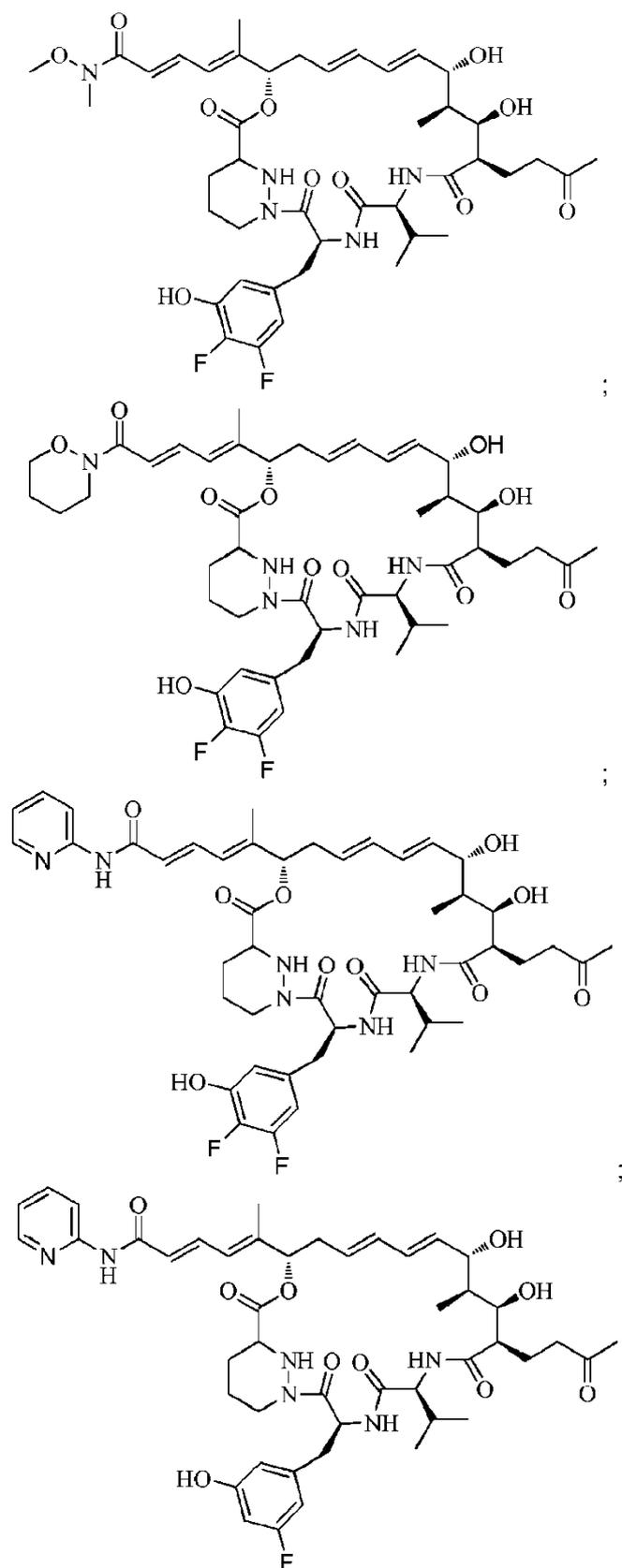
con la condición de que cuando todos de R₄, R₆, R₇ y R₈ representan H y todos de X₂, X₃, X₄, X₅ y X₆ representan C, entonces R₅ no puede representar OH, -O-alquilo u -O(CO)-alquilo;

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

25 Por ejemplo n representa un enlace sencillo. Por ejemplo R₉ representa OH. Por ejemplo X₂ representa C. Por ejemplo X₃ representa C. Por ejemplo X₄ representa C. Por ejemplo X₅ representa C. Por ejemplo X₆ representa C. Por ejemplo R₄ representa H. Por ejemplo R₈ representa H. Por ejemplo R₅ representa OH. Por ejemplo R₆ representa H, Me o F. Por ejemplo R₇ representa H o F. Por ejemplo R₆ y/o R₇ representa F. Por ejemplo X₁ representa NR₁R₂. Por ejemplo R₁ representa alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilcicloalquilo, alquilcicloalqueno, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquencilarilo o alquencilheteroarilo y R₂ representa H, alquilo, alqueno u -O-alquilo. Por ejemplo NR₁R₂ representa morfolinilo, oxazinano o uno de los grupos dados a conocer en la siguiente tabla:

30





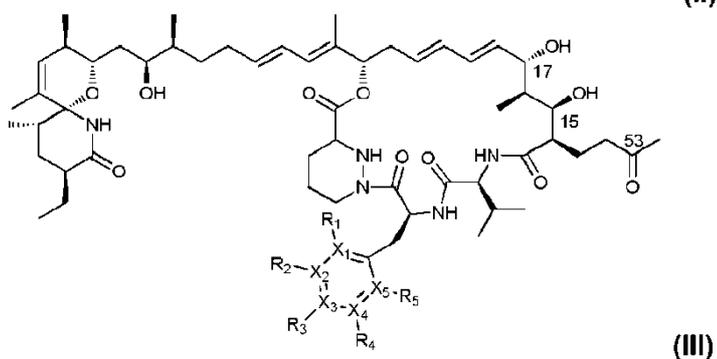
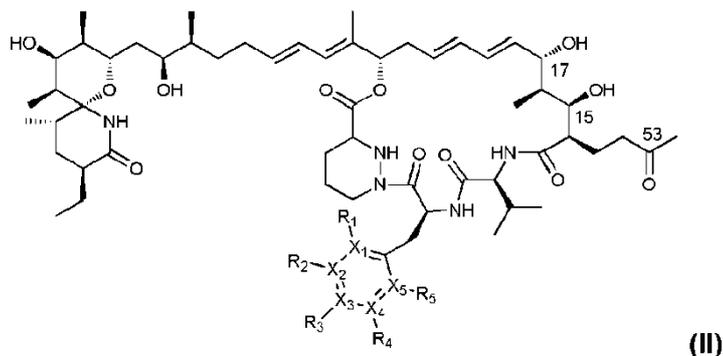
5

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

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, la sangliferrina no natural es un compuesto de fórmula (II) o (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

5



10 en la que: R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C₂₋₆ o alquilo C₁₋₁₀ en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

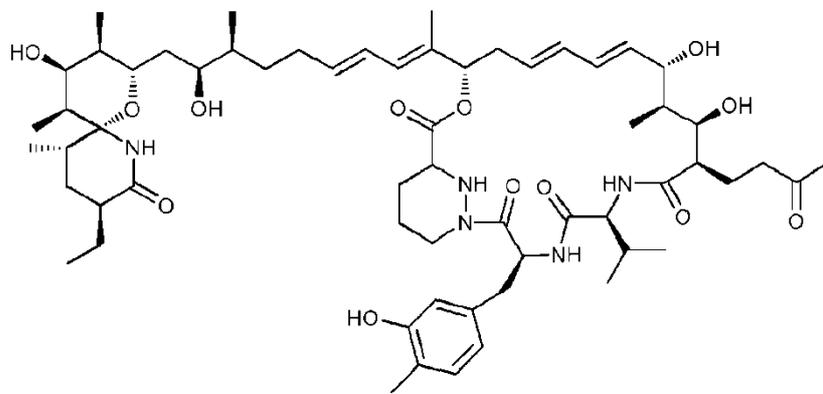
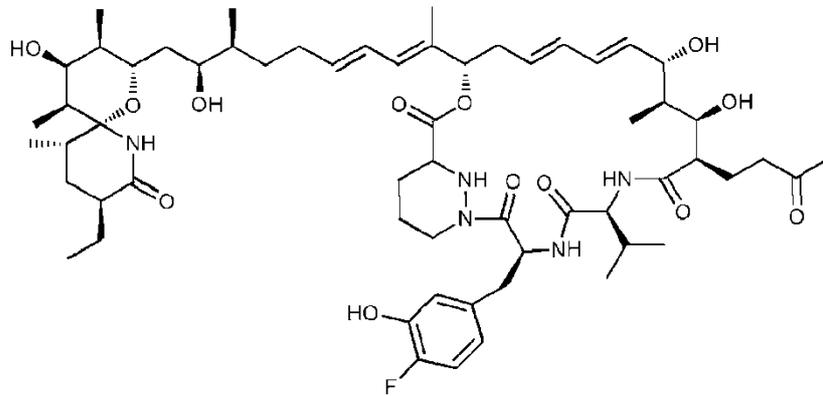
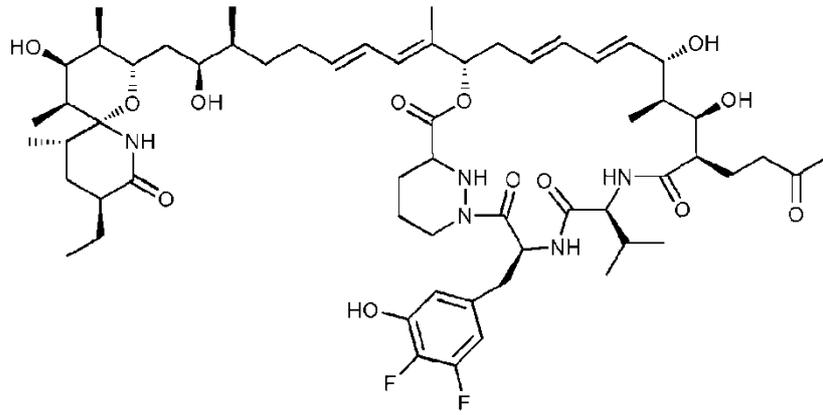
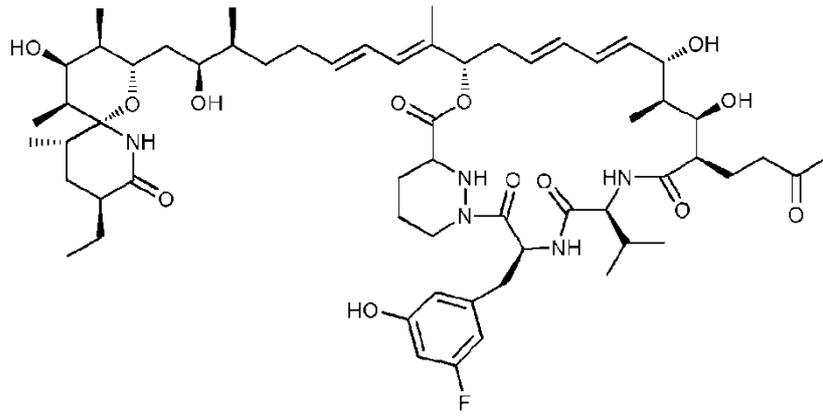
15 X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

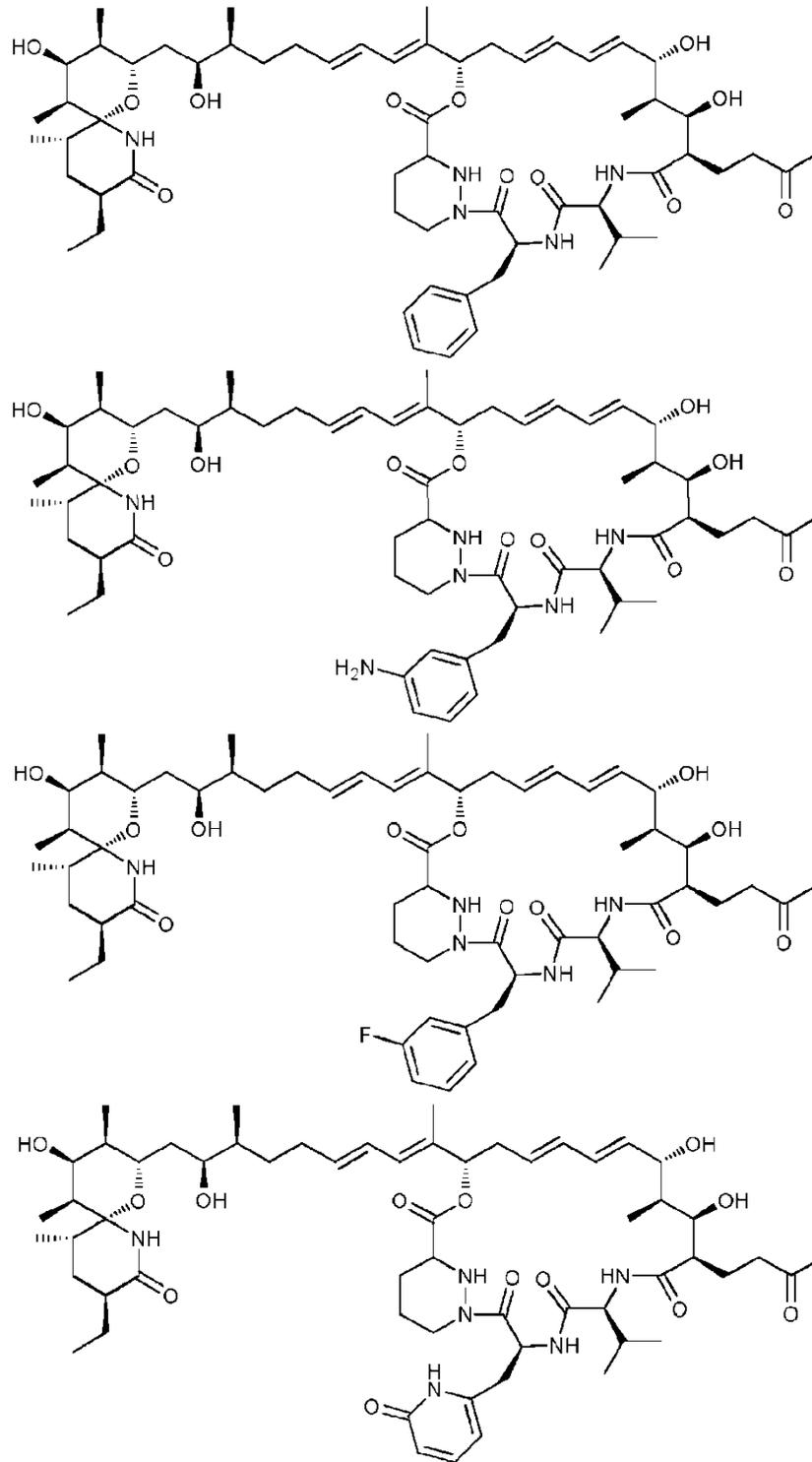
20 con la condición de que cuando todos de R₁, R₃, R₄ y R₅ representan H y todos de X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C, entonces R₂ no puede representar OH;

incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del cetol en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

25 Por ejemplo X₁ representa C. Por ejemplo X₂ representa C. Por ejemplo X₃ representa C. Por ejemplo X₄ representa C. Por ejemplo X₅ representa C. Por ejemplo R₁, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de H, F, Cl, CF₃, OH y alquilo C₁₋₆. Por ejemplo R₂ se selecciona de H, F, Cl, CF₃, OH, NH₂ y alquilo C₁₋₆. Por ejemplo R₂ representa OH.

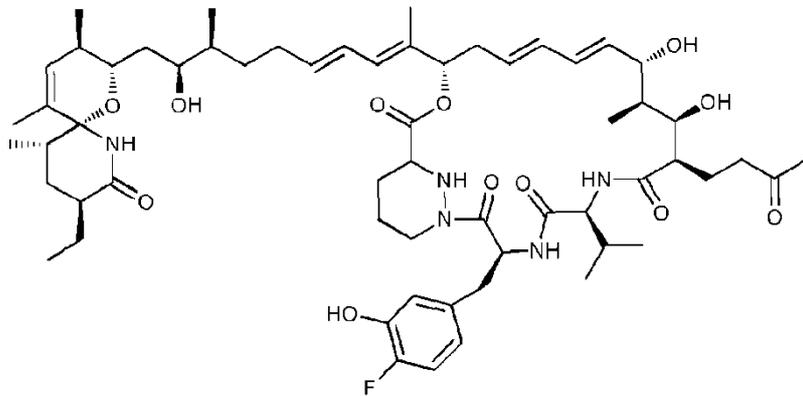
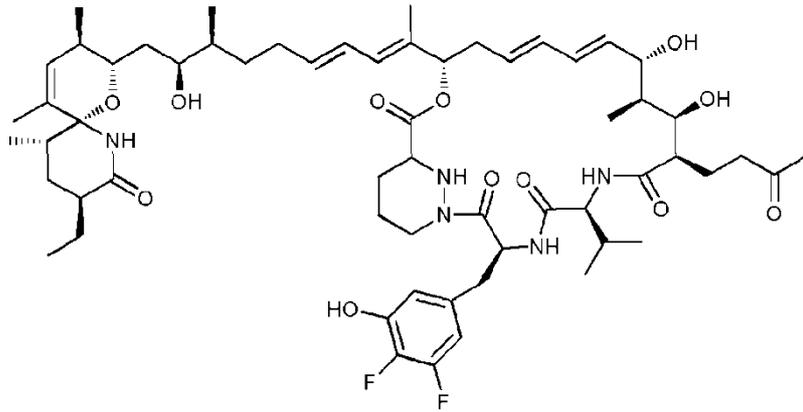
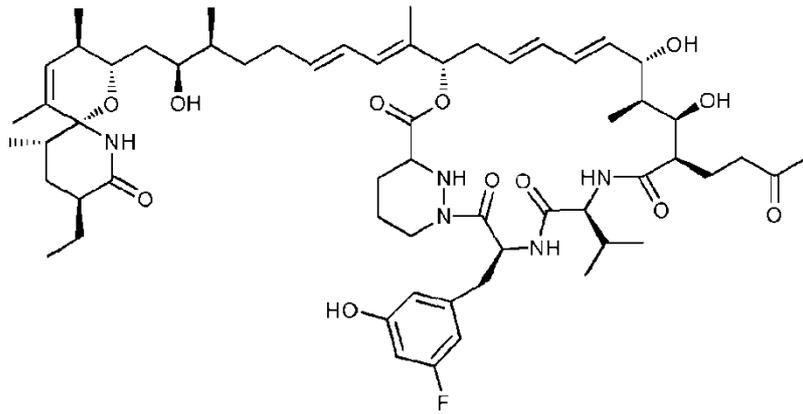
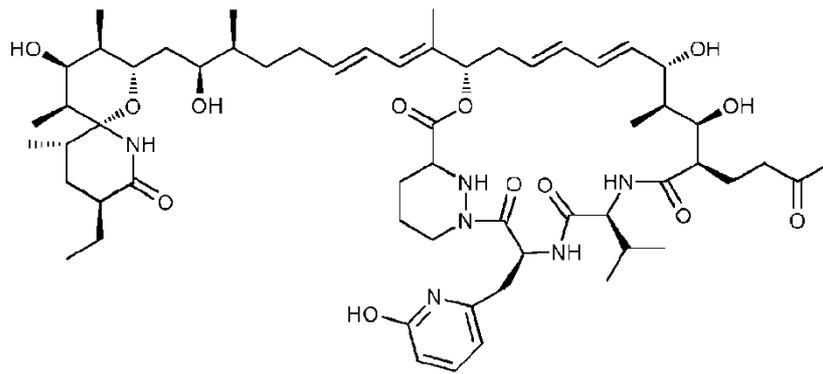
30 Un compuesto según fórmula (II) o fórmula (III) puede seleccionarse de:

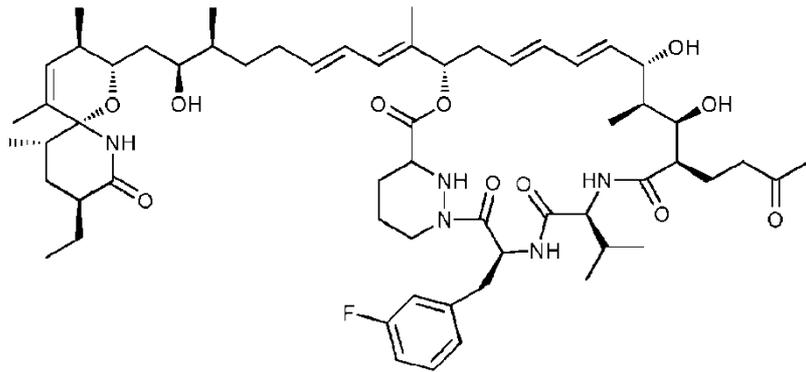
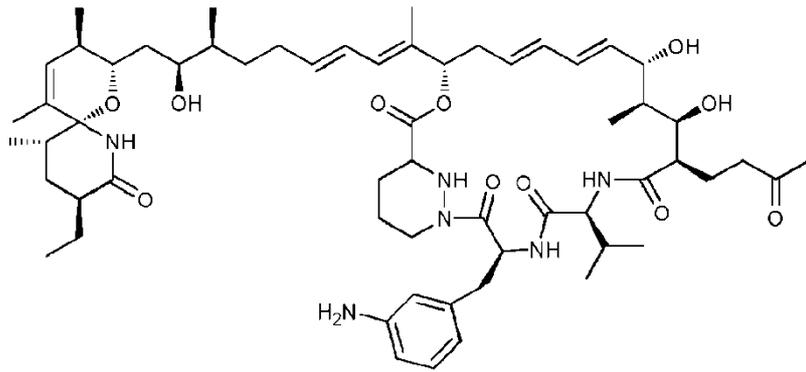
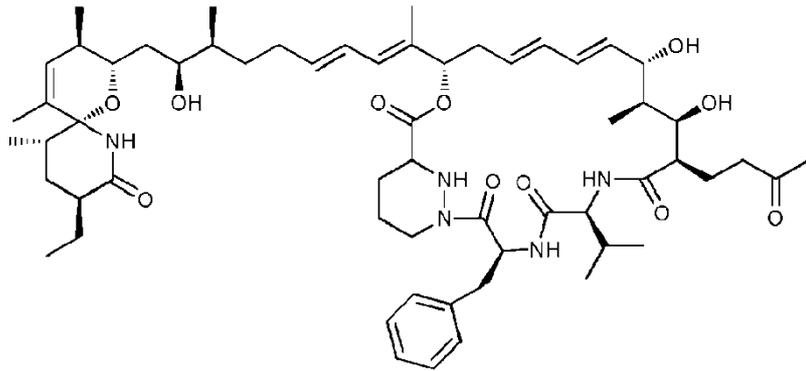
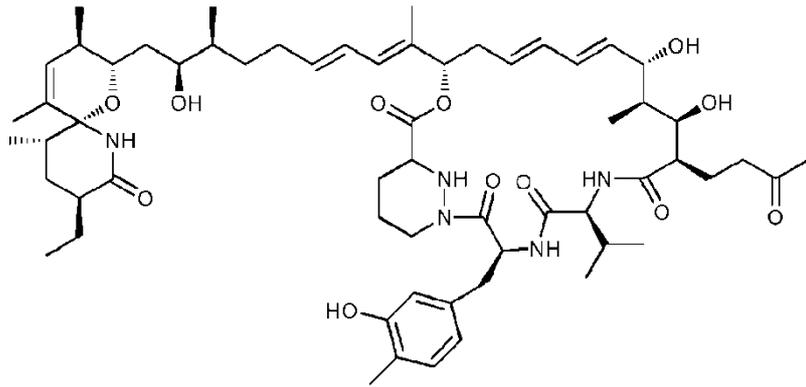


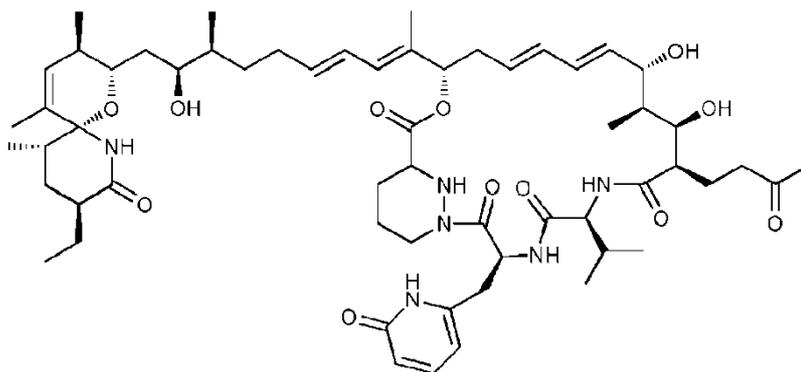


5

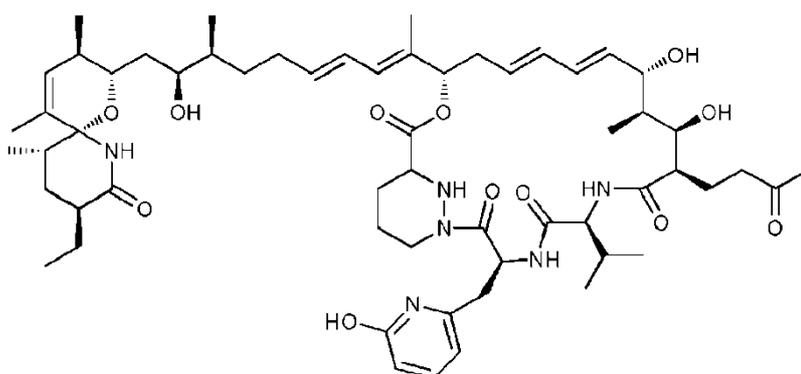
lo que también puede representarse como







y que también puede representarse como:



5

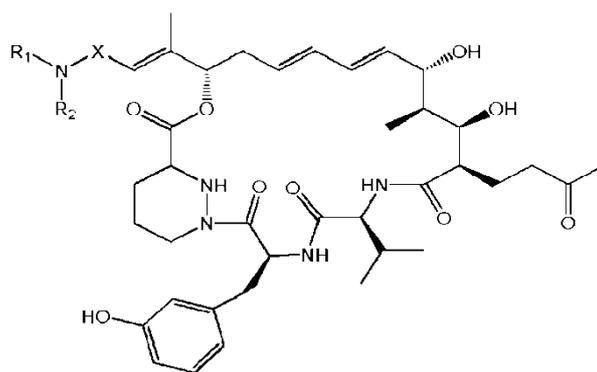
incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, C26, 27, mostrado como trans es cis; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación del cetol en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol;

10

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, la sangliferina no natural es un compuesto de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

15



(IV)

en la que:

20 X representa CH₂ o CO

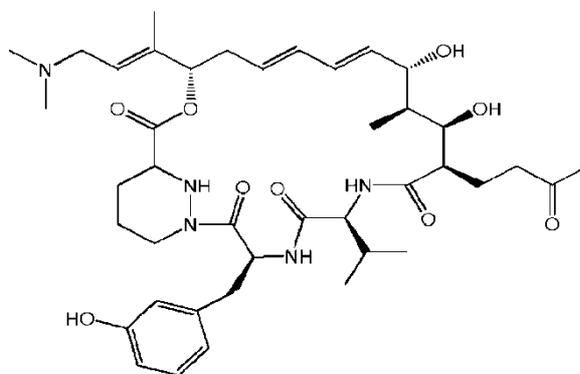
R₁ y R₂ representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alqueno que pueden estar opcionalmente unidos para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ están opcionalmente sustituidos por carbonilo; o uno de R₁ y R₂ representa -alquilarilo, -alquenilarilo, -alquilheteroarilo o -alquenilheteroarilo y el otro representa H, alquilo o alqueno;

25

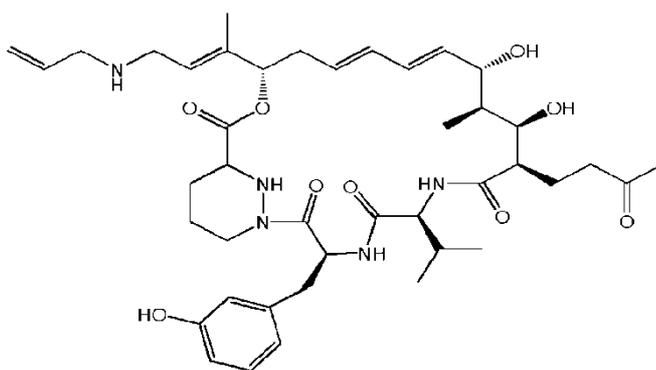
incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetal mediante la combinación del ceto en C-53 y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

5 Por ejemplo, R_1 y R_2 representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alquenilo en el que uno o dos átomos de carbono de R_1 y/o R_2 están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ y en el que uno o dos átomos de carbono de R_1 y/o R_2 están opcionalmente sustituidos por carbonilo. Por ejemplo R_1 representa hidrógeno y R_2 representa un grupo alquilo. Por ejemplo R_1 representa hidrógeno y R_2 representa un grupo alquenilo. Por ejemplo R_1 y R_2 representan independientemente un grupo alquilo o alquenilo que están unidos para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en el que uno o dos átomos de carbono de R_1 y/o R_2 están opcionalmente sustituidos 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 dos átomos de carbono de R_1 y/o R_2 están opcionalmente sustituidos por carbonilo. Por ejemplo R_1 y R_2 representan independientemente un grupo alquilo que están unidos para formar un anillo heterocíclico saturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado. Por ejemplo R_1 y R_2 representan independientemente un grupo alquilo o alquenilo que están unidos para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en el que uno o dos átomos de carbono de R_1 y/o R_2 están sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$. Por ejemplo, si un átomo de carbono está sustituido por un heteroátomo, está sustituido por N u O. Por ejemplo X representa CH_2 .

20 Un compuesto según fórmula (IV) puede seleccionarse de:



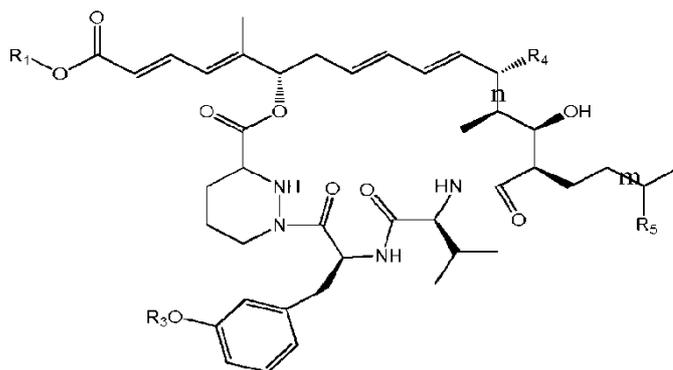
o



25

o una sal farmacéutica aceptable de los mismos.

30 En otra realización, la sangliferina no natural es un compuesto de fórmula (V) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(V)

en la que:

5 R_1 representa alquilo, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alqueniilocicloalquilo, alqueniilocicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alqueniilarilo o alqueniilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

o R_1 representa hidrógeno;

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

15 siempre que R_1 no represente metilo o -CHMe₂;

y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R_1 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

20 R_3 representa H o (CO)_x-alquilo;

R_4 representa H u OH;

R_5 representa H, OH o =O;

25 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R_4 representa H; y

m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R_5 representa H;

30 x representa 0 ó 1;

incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del cetol en C-53 (si está presente) y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

35 Por ejemplo, R_1 representa alquilo, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alqueniilocicloalquilo, alqueniilocicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alqueniilarilo o alqueniilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico; o R_1 representa hidrógeno; y en el que uno o más átomos de carbono de R_1 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos 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 están opcionalmente sustituidos por carbonilo; siempre que R_1 no represente metilo o -CHMe₂.

45 Por ejemplo R_1 representa alquilo C₄₋₁₀, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueniilo, alqueniilocicloalquilo, alqueniilocicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alqueniilarilo o alqueniilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico; o R_1 representa hidrógeno; y en el que uno o más átomos de carbono de R_1 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos 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 están opcionalmente sustituidos por carbonilo.

50 Por ejemplo R_1 se selecciona de alquilo C₂₋₁₀, alqueniilo C₂₋₁₀ y arilo. Por ejemplo R_1 se selecciona de alquilo C₂₋₆, alqueniilo C₂₋₆ y arilo. Por ejemplo R_1 se selecciona de alquilo C₄₋₆, alqueniilo C₂₋₆ y arilo.

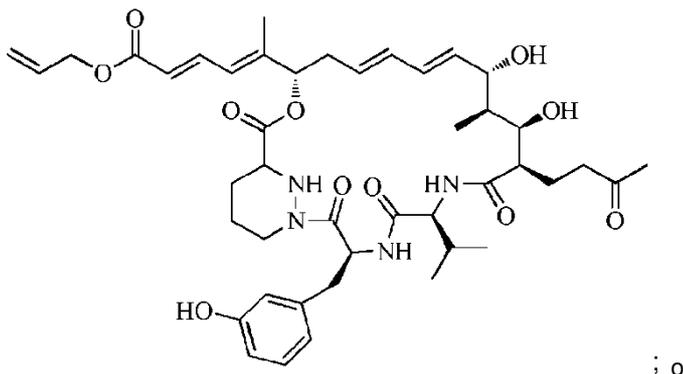
Por ejemplo, independientemente o en cualquier combinación: R₃ representa H o (CO)_x-alquilo C₁₋₄, en el que x es tal como se define en la reivindicación 1; n representa un enlace sencillo; m representa un enlace sencillo; R₄ representa OH; y R₅ representa =O.

5

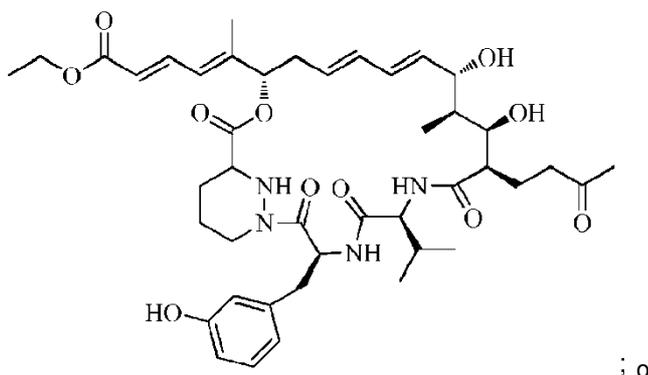
Por ejemplo x representa 0. Por ejemplo R₃ representa H o metilo. Por ejemplo R₅ representa C=O.

Por ejemplo un compuesto de fórmula (V) se selecciona de un compuesto en el que:

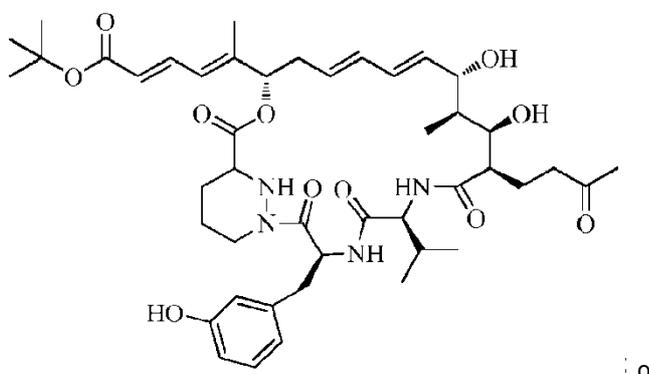
10 R₁ representa CH₂CH=CH₂, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



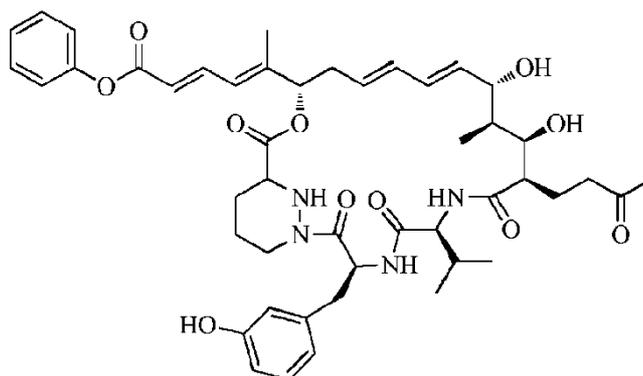
15 R₁ representa CH₂CH₃, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



20 R₁ representa C(CH₃)₃, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



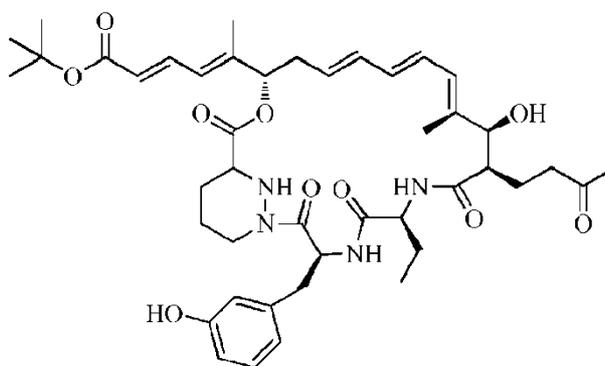
25 R₁ representa fenilo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



o

R₁ representa C(CH₃)₃, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un doble enlace, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

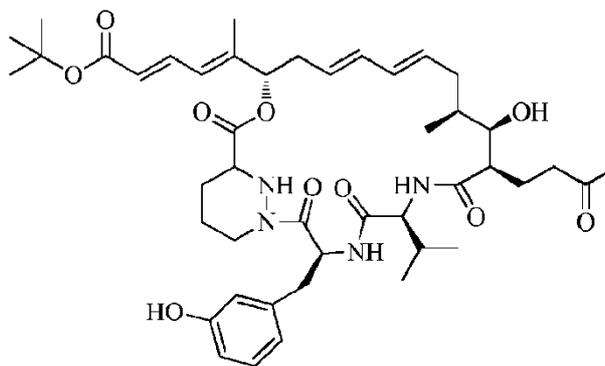
5



o

R₁ representa C(CH₃)₃, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

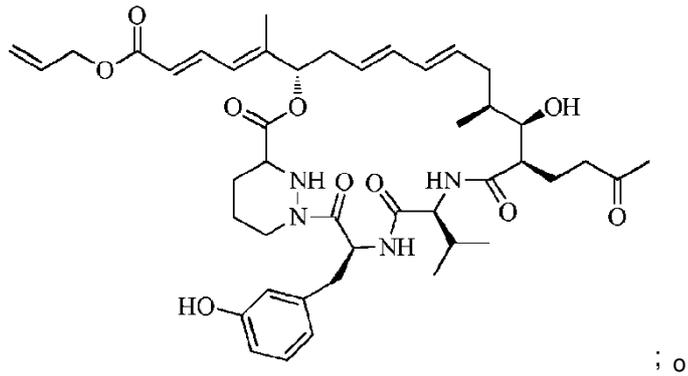
10



o

R₁ representa CH₂CH=CH₂, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

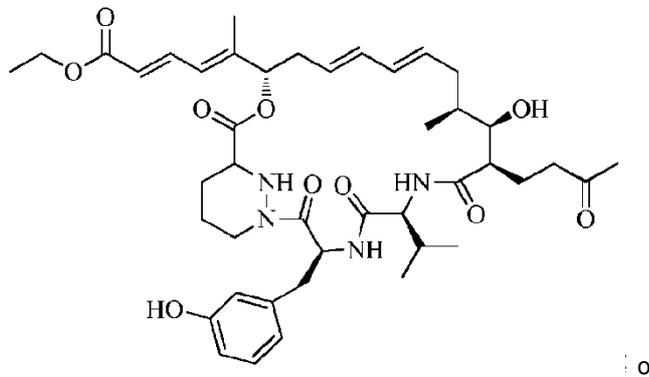
15



; o

R₁ representa CH₂CH₃, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

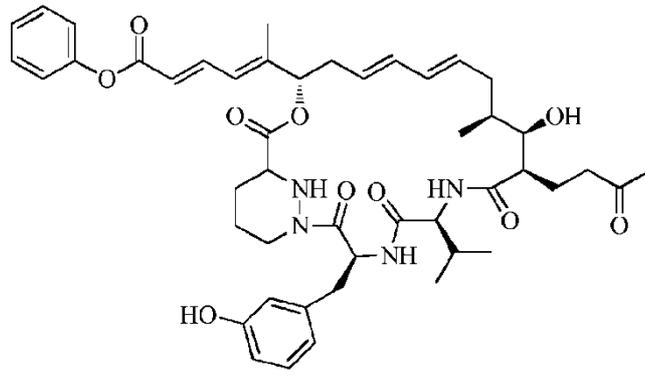
5



; o

R₁ representa fenilo, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

10

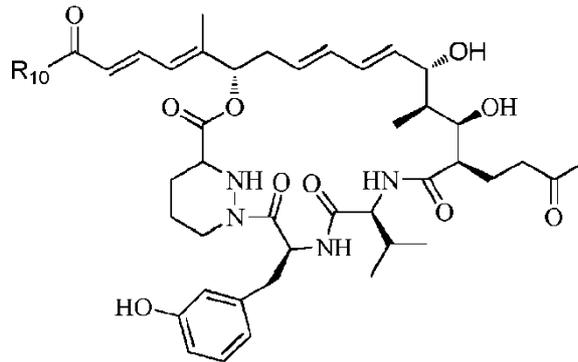


;

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

15

Por ejemplo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



en la que R₁₀ representa -OR₁ y R₁ es tal como se definió anteriormente,

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

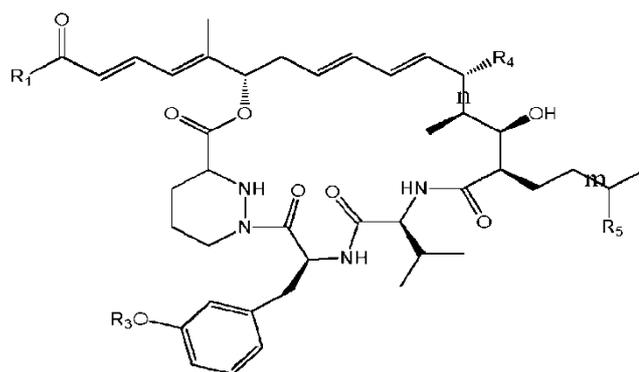
Por ejemplo, R₁₀ se selecciona de un grupo indicado en la siguiente tabla:

10

Los compuestos de fórmula (V) pueden prepararse según métodos dados a conocer en el documento WO2011/098805 que se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

15

En otra realización, la sangliferrina no natural es un compuesto de fórmula (VI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(VI)

en la que:

- 5 R_1 representa alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquilcicloalquenilo, alquenilcicloalquilo, alquenilcicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

10 y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 salvo porque el átomo adyacente al grupo carbonilo al que está unido R_1 no es O o N y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

15 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R_1 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

R_3 representa H o (CO)_x-alquilo;

20 R_4 representa H u OH;

R_5 representa H, OH o =O;

n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R_4 representa H; y

25 m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R_5 representa H;

x representa 0 ó 1;

30 incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del ceto en C-53 (si está presente) y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

35 Por ejemplo R_1 representa alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquilcicloalquenilo, alquenilcicloalquilo, alquenilcicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

40 y en el que uno o más átomos de carbono de R_1 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 salvo porque el átomo adyacente al grupo carbonilo al que está unido R_1 no es O o N y en el que uno o más átomos de carbono de R_1 están opcionalmente sustituidos por carbonilo.

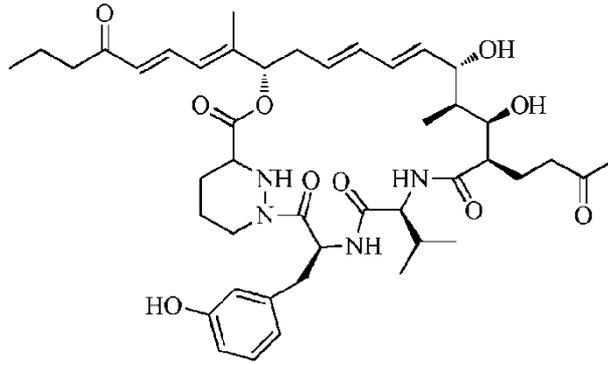
Por ejemplo R_1 representa alquilo C₁₋₆, alquenilo C₂₋₆, alquil C₁₋₄-cicloalquilo C₄₋₇ o alquil C₁₋₄-cicloalquenilo C₅₋₇.

45 Por ejemplo independientemente o en cualquier combinación: R_3 representa H o (CO)_x-alquilo C₁₋₄; n representa un enlace sencillo; m representa un enlace sencillo; R_4 representa OH; y R_5 representa =O.

Por ejemplo x representa 0. Por ejemplo R_3 representa H o metilo.

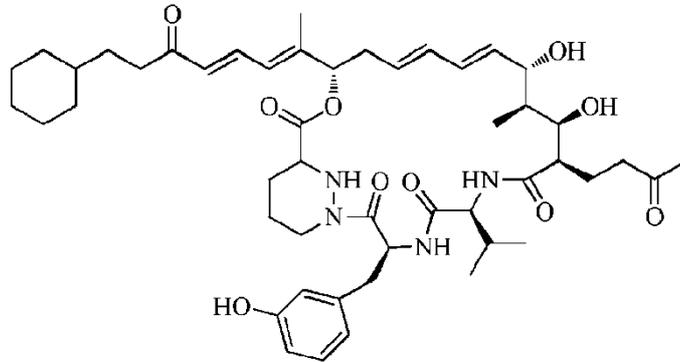
50 Por ejemplo un compuesto de fórmula (VI) se selecciona de un compuesto en el que:

R_1 representa CH₂CH₃, R_3 representa H, R_4 representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R_5 representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



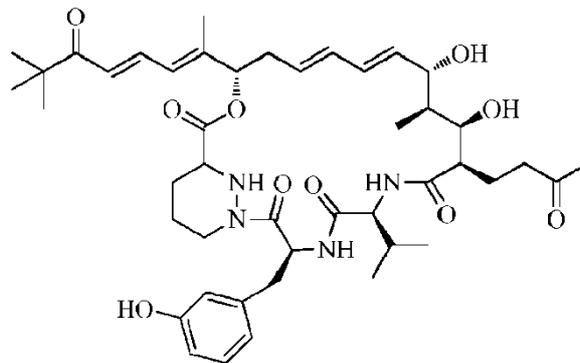
; o

- 5 R₁ representa etilciclohexilo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



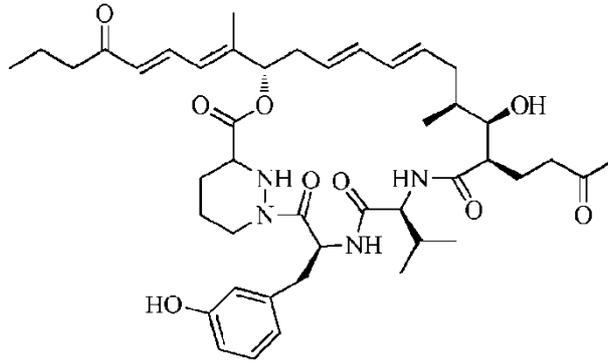
; o

- 10 R₁ representa t-butilo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



; o

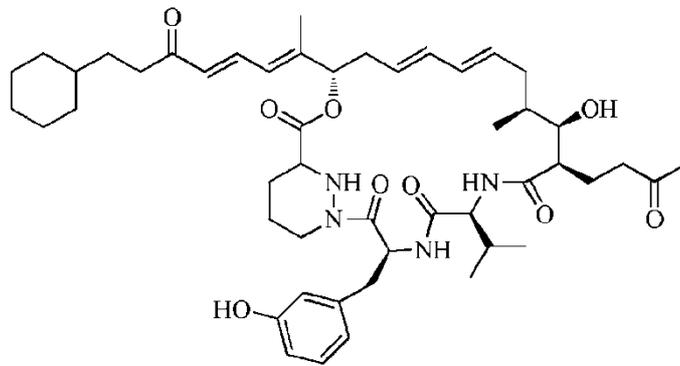
- 15 R₁ representa CH₂CH₃, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



; o

R₁ representa etilciclohexilo, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

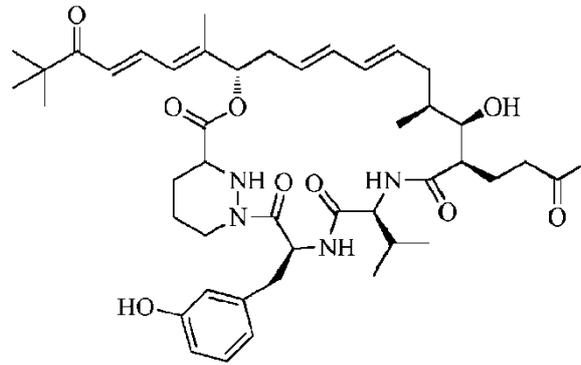
5



; o

R₁ representa t-butilo, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

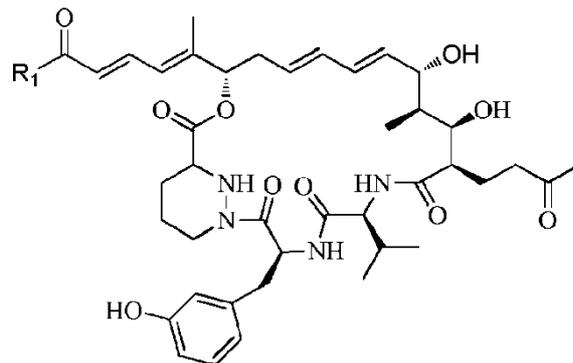
10



; o

R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

15

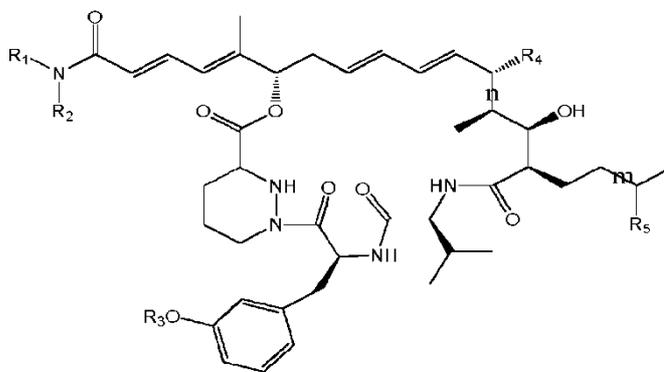


en la que R₁ es tal como se definió anteriormente;

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

Por ejemplo R₁ se selecciona de un grupo indicado en la siguiente tabla:

En otra realización, la sangliferina no natural es un compuesto de fórmula (VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



5

en la que:

10 R₁ y R₂ representan independientemente alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquenoilo, alquencilicloalquilo, alquencilicloalquenoilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

15 o R₁ representa hidrógeno; y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

20 o R₁ y R₂ están unidos 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 opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo;

25 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R₁ y/o R₂ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

R₃ representa H, -(CO)_x-alquilo;

30 R₄ representa H u OH;

R₅ representa H, OH o =O;

35 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R₄ representa H; y

m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R₅ representa H;

x representa 0 ó 1;

40 incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del cetoxígeno en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

45 Por ejemplo R₁ y R₂ representan independientemente alquilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, alquilocicloalquilo, alquilocicloalquenoilo, alquencilicloalquilo, alquencilicloalquenoilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

50 o R₁ representa hidrógeno; y en el que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos 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 R₁ y/o R₂ están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

o R₁ y R₂ están unidos 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 opcionalmente sustituidos 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 opcionalmente sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo.

Por ejemplo R₁ representa arilo o heteroarilo sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico, -alquilo C₁₋₄, -O-alquilo C₁₋₄, -CO-alquilo C₁₋₄ o -alqueno C₂₋₄. Por ejemplo R₂ representa hidrógeno, alquilo C₁₋₄ o alqueno C₁₋₄. Por ejemplo R₂ representa hidrógeno o alquilo C₁₋₄.

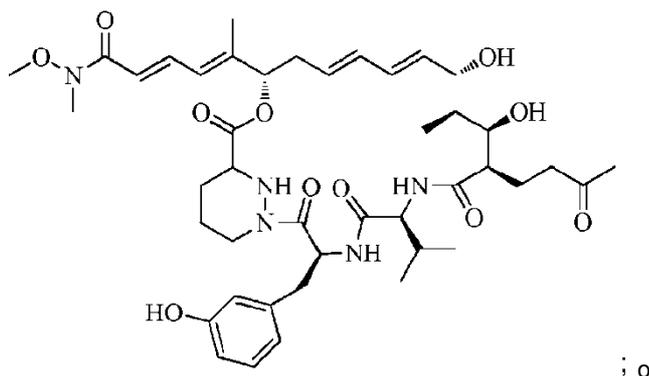
Por ejemplo R₁ y R₂ junto con el nitrógeno al que están unidos representan un anillo heterocíclico de 5-7 miembros, tal como un anillo de pirrolidina, piperidina, morfolina o piperazina en el que el nitrógeno en la posición 4 de piperazina está opcionalmente sustituido con alquilo C₁₋₄ y en el que un átomo de carbono adyacente a un átomo de nitrógeno dentro del anillo está opcionalmente sustituido por carbonilo.

Por ejemplo, independientemente o en cualquier combinación: R₃ representa H o (CO)_x-alquilo C₁₋₄, en el que x es tal como se definió anteriormente; n representa un enlace sencillo; m representa enlace sencillo; R₄ representa OH; R₅ representa =O.

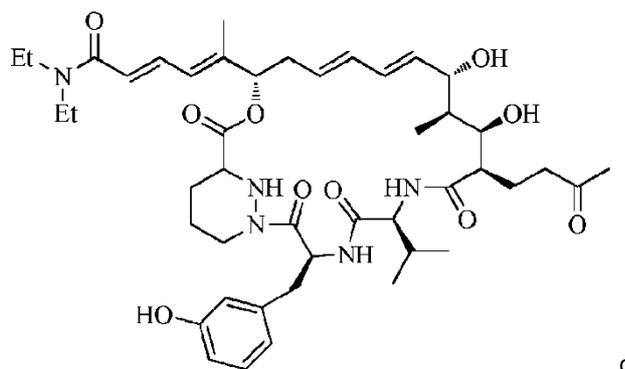
Por ejemplo x representa 0.

Por ejemplo un compuesto de fórmula (VII) se selecciona de un compuesto en el que:

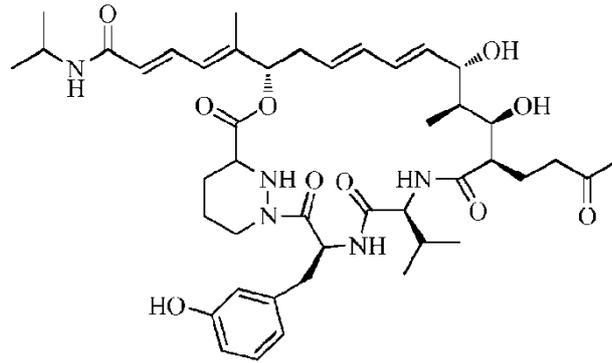
R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



R₁ representa etilo, R₂ representa etilo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

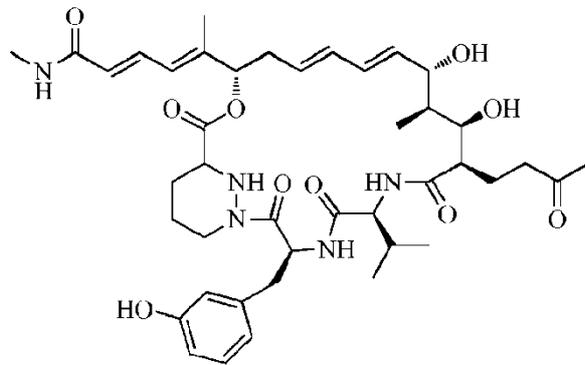


R₁ representa -CHMe₂, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



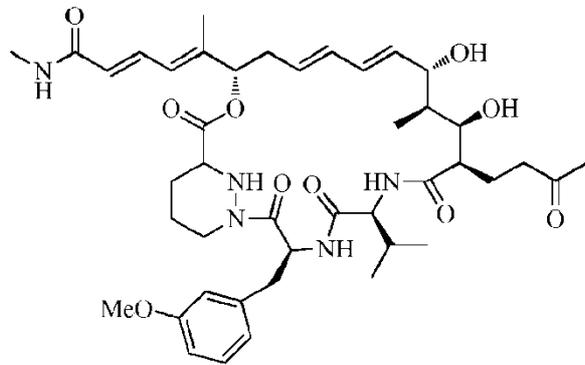
R₁ representa metilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

5



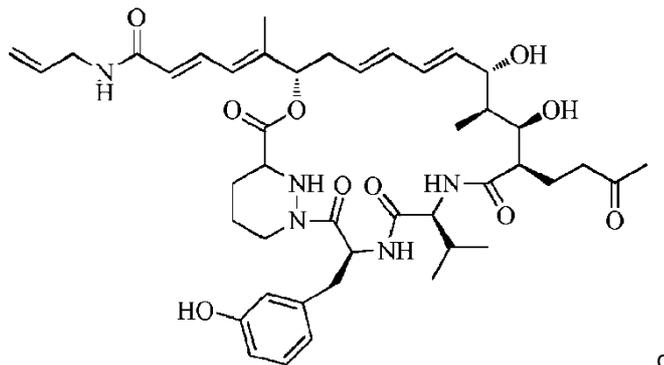
R₁ representa metilo, R₂ representa H, R₃ representa Me, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

10

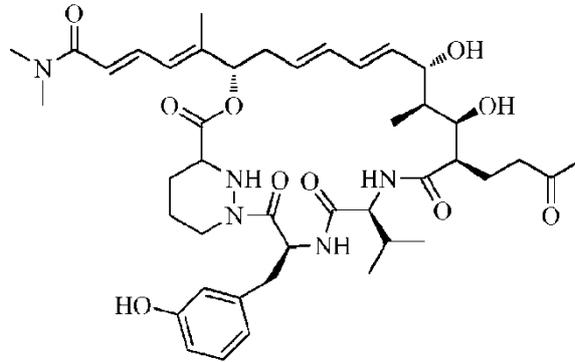


R₁ representa -CH₂CH=CH₂, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

15



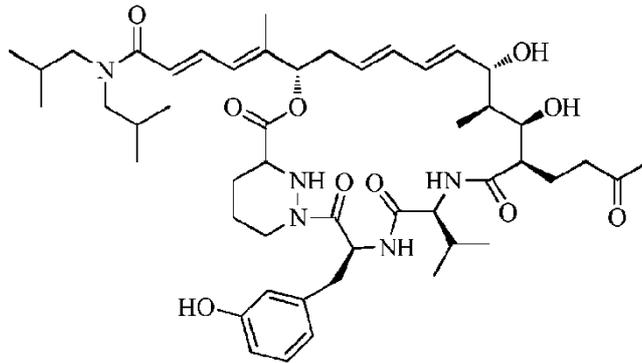
R₁ representa metilo, R₂ representa metilo, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace, m representa un enlace y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



5

; o

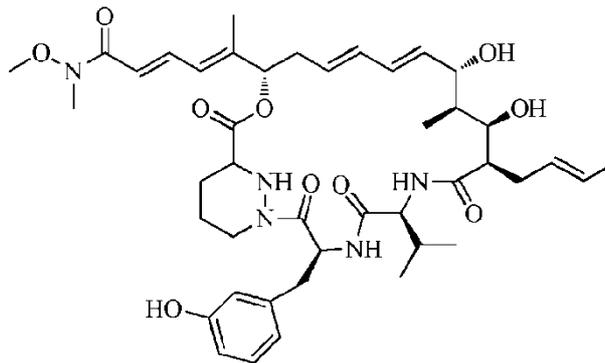
R₁ representa -CH₂CHMe₂, R₂ representa -CH₂CHMe₂, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



10

; o

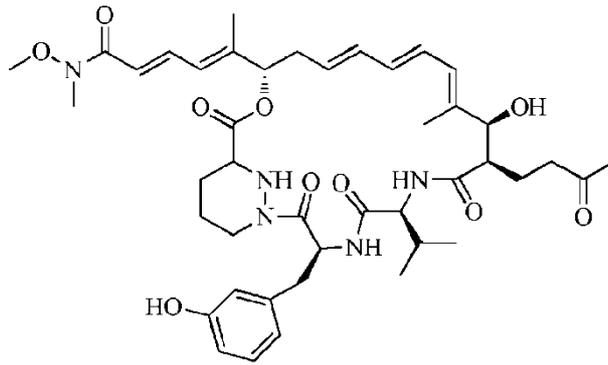
R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R₅ representa H tal como se representa por la siguiente estructura:



15

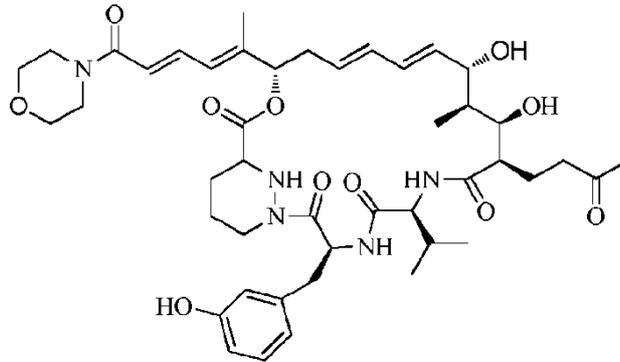
; o

R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un doble enlace, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



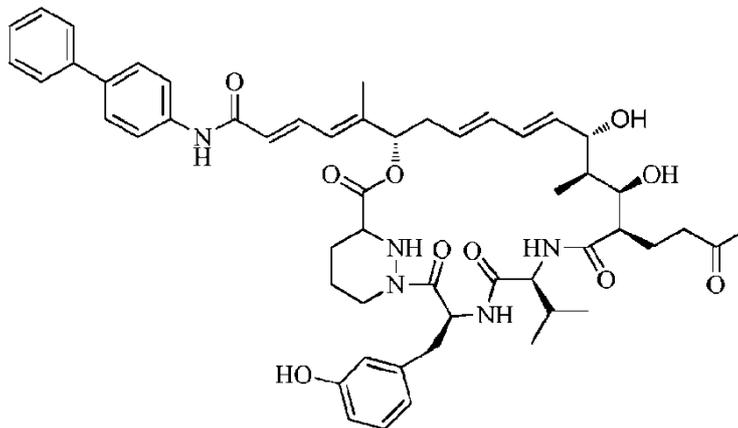
; o

5 R₁ y R₂ juntos representan -CH₂CH₂OCH₂CH₂- conectados para dar un heterociclo de 6 miembros, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



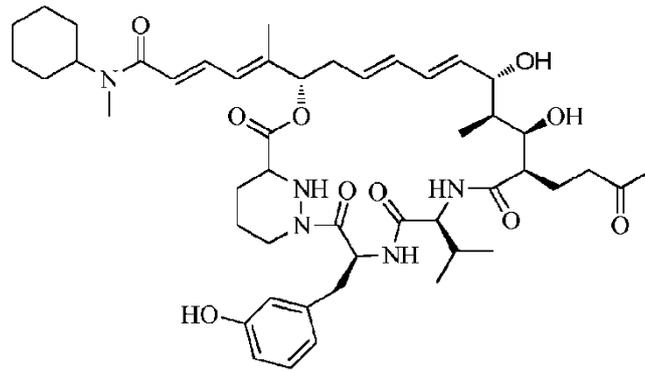
; o

10 R₁ representa 4-bifenililo, R₂ representa H, en el que, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



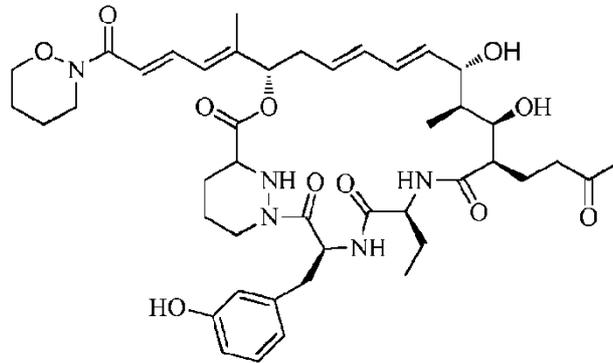
; o

15 R₁ representa ciclohexilo, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



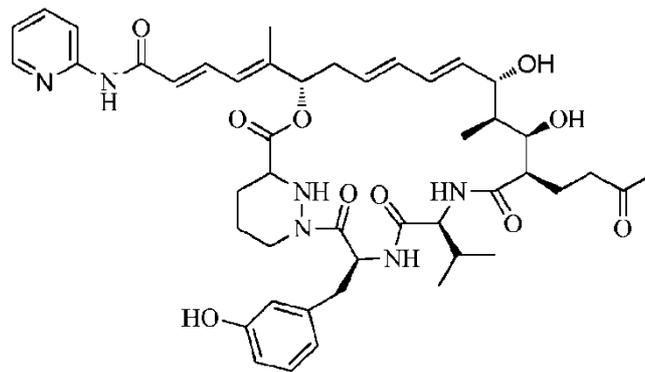
; o

- 5 R₁ y R₂ juntos representan -OCH₂CH₂CH₂CH₂- conectados para dar un heterociclo de 6 miembros, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



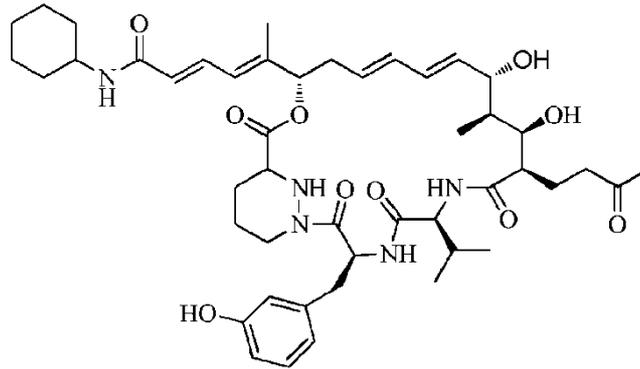
; o

- 10 R₁ representa 2-piridinilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



; o

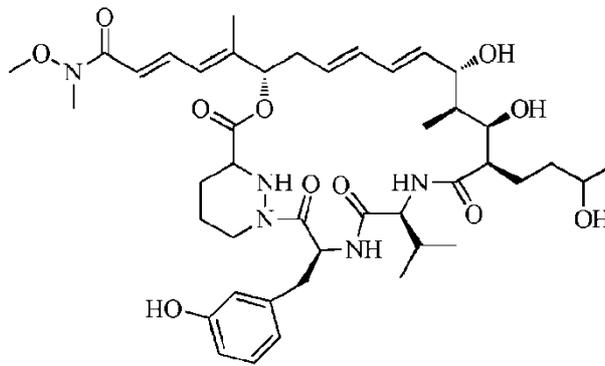
- 15 R₁ representa ciclohexilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



o

R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa OH tal como se representa por la siguiente estructura:

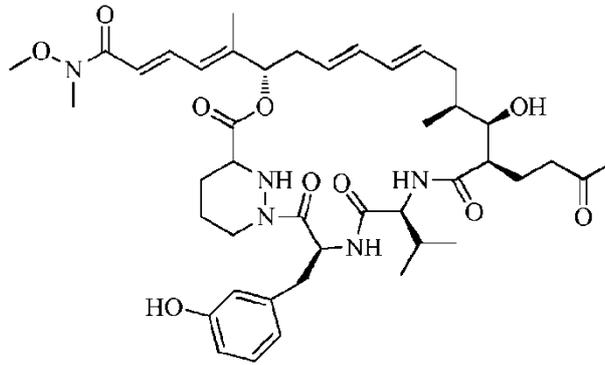
5



o

R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

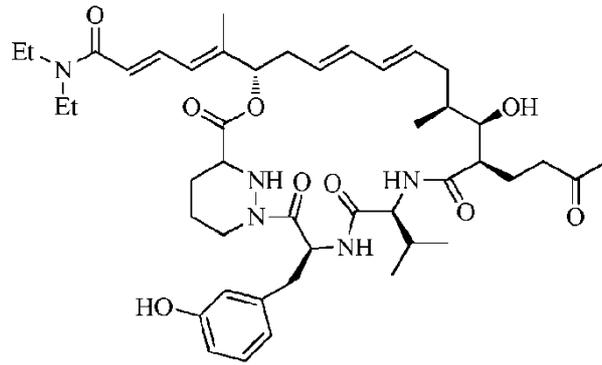
10



o

R₁ representa etilo, R₂ representa etilo, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

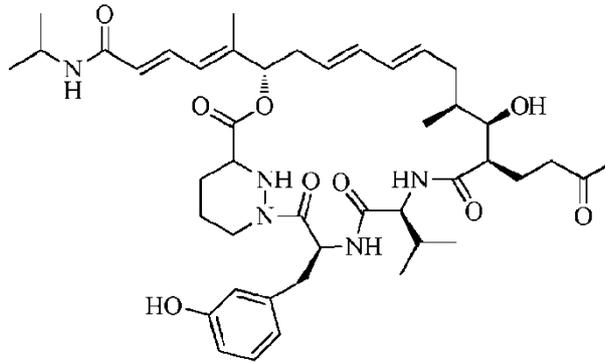
15



; o

R₁ representa -CHMe₂, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

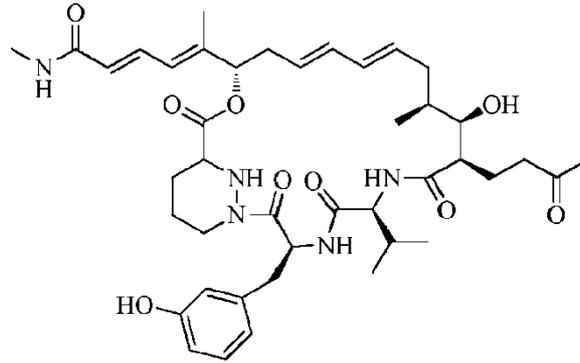
5



; o

R₁ representa metilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

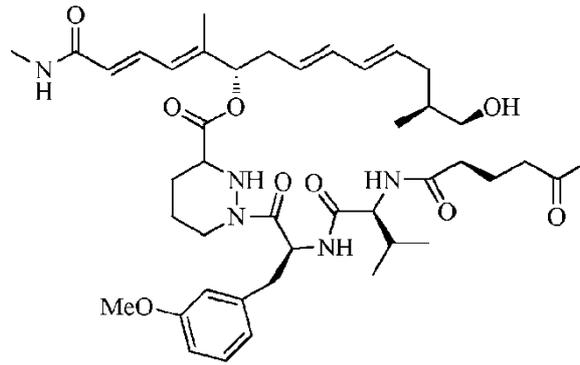
10



; o

R₁ representa metilo, R₂ representa H, R₃ representa Me, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

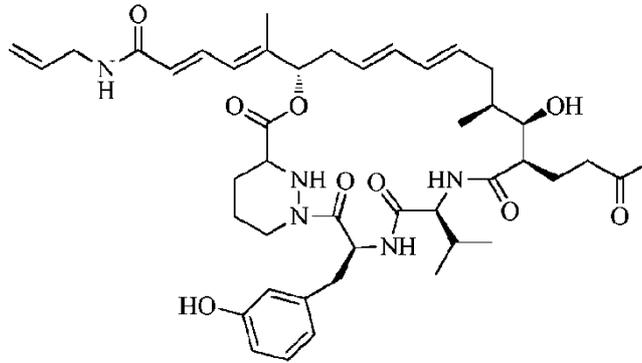
15



; o

R₁ representa -CH₂CH=CH₂, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

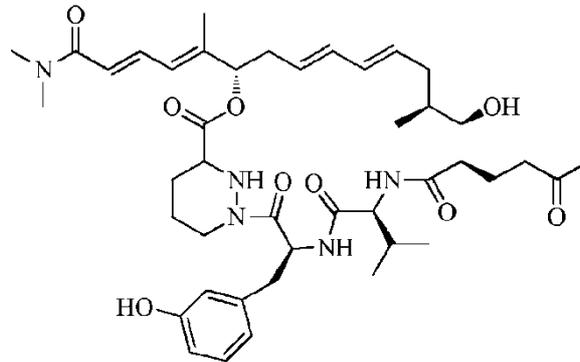
5



; o

R₁ representa metilo, R₂ representa metilo, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace, m representa un enlace y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

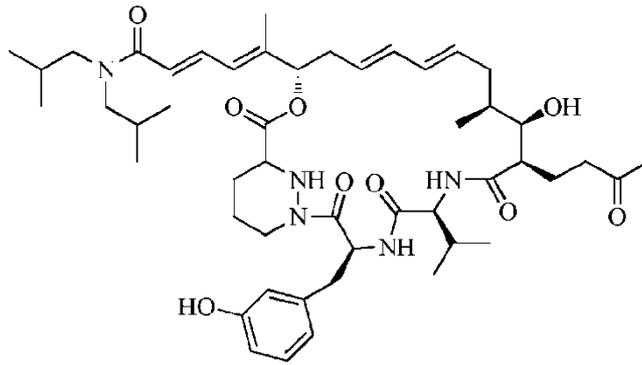
10



; o

R₁ representa -CH₂CHMe₂, R₂ representa -CH₂CHMe₂, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

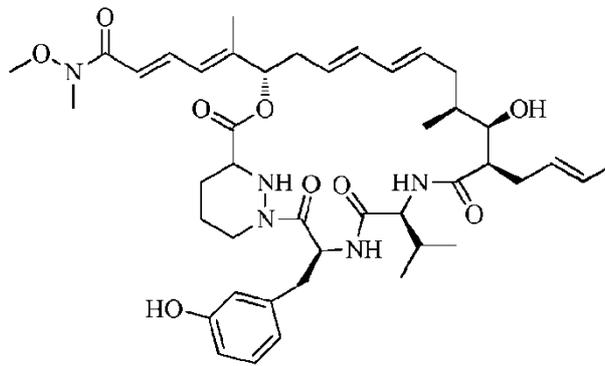
15



; o

R₁ representa OCH₃, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R₅ representa H tal como se representa por la siguiente estructura:

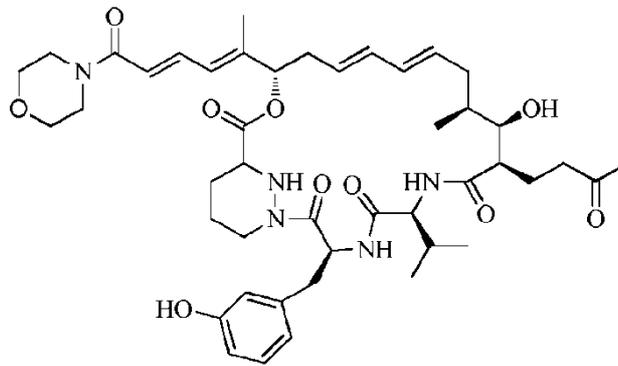
5



; o

R₁ y R₂ juntos representan -CH₂CH₂OCH₂CH₂- conectados para dar un heterociclo de 6 miembros, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

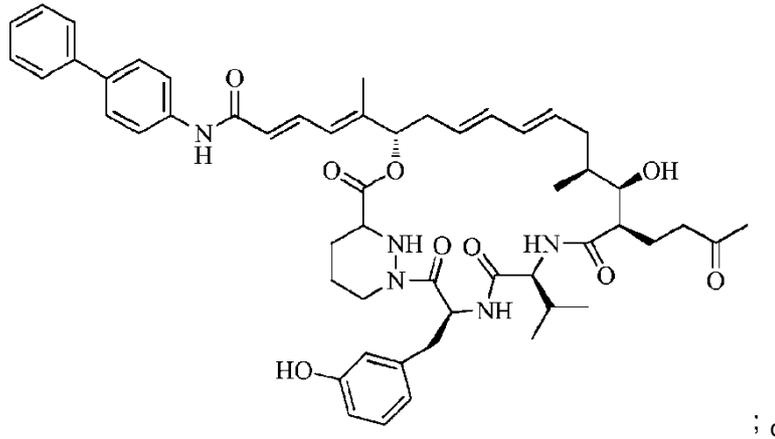
10



; o

R₁ representa 4-bifenililo, R₂ representa H, en el que, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

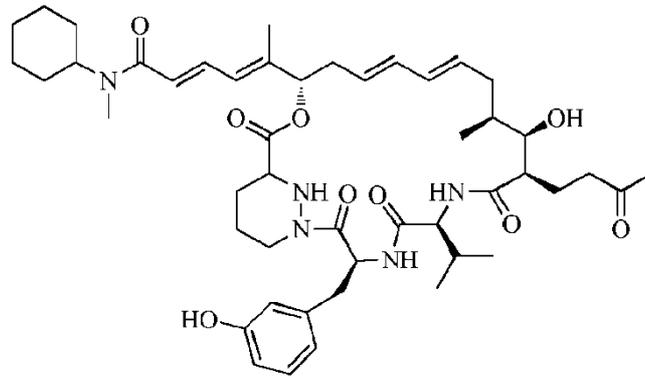
15



; o

R₁ representa ciclohexilo, R₂ representa Me, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

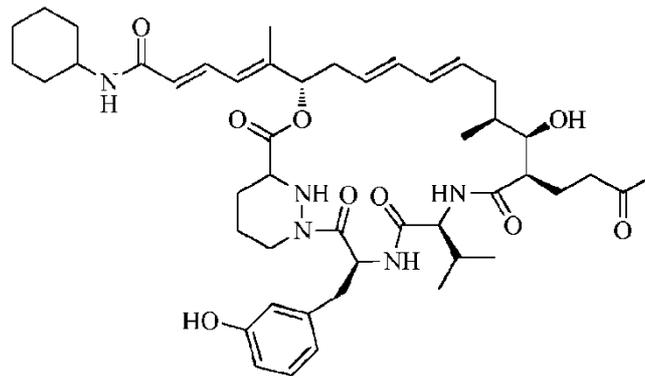
5



; o

R₁ representa ciclohexilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

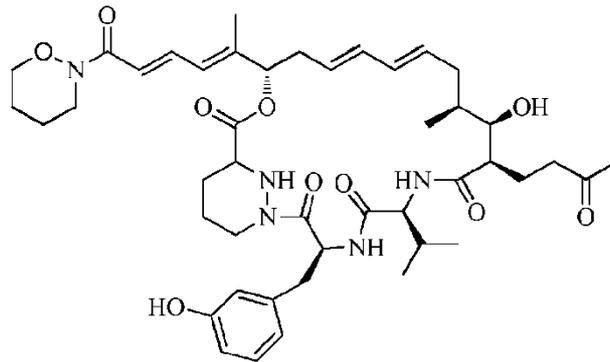
10



; o

R₁ y R₂ juntos representan -OCH₂CH₂CH₂CH₂- conectados para dar un heterociclo de 6 miembros. R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

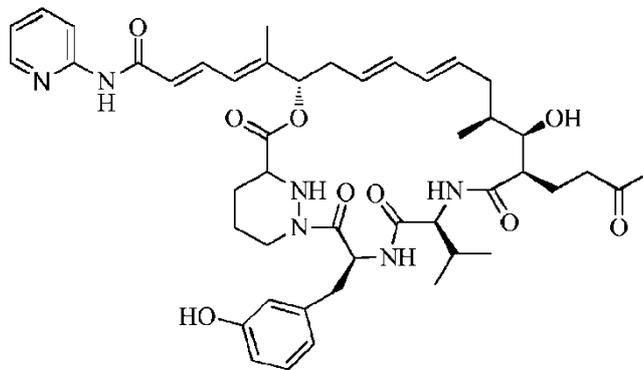
15



; o

R₁ representa 2-piridinilo, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

5



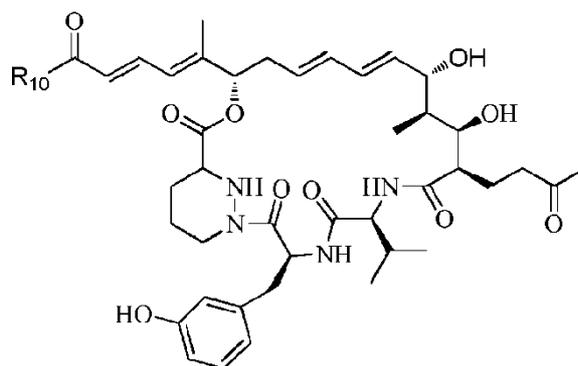
; o

o una sal farmacéuticamente aceptable de uno cualquiera de los mismos; incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del ceteno en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

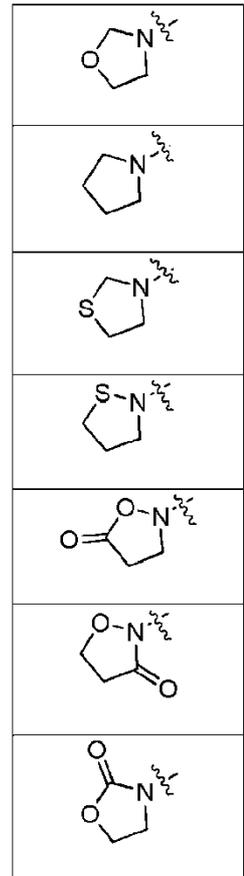
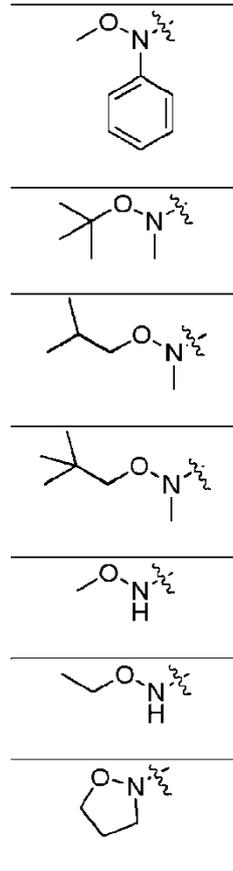
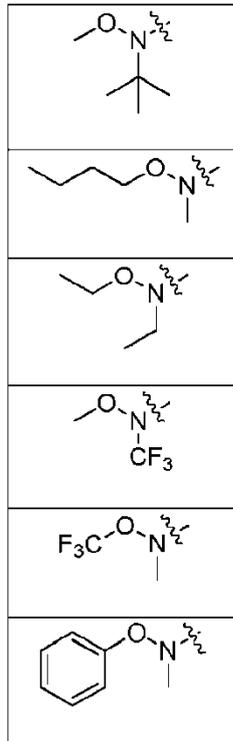
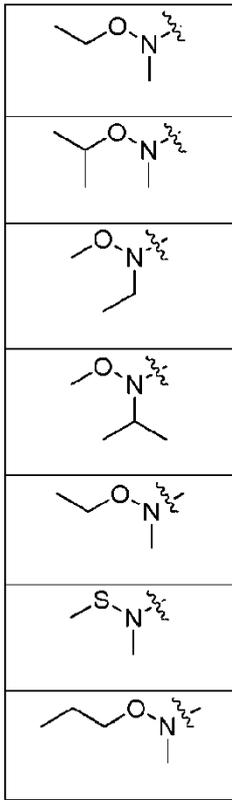
10

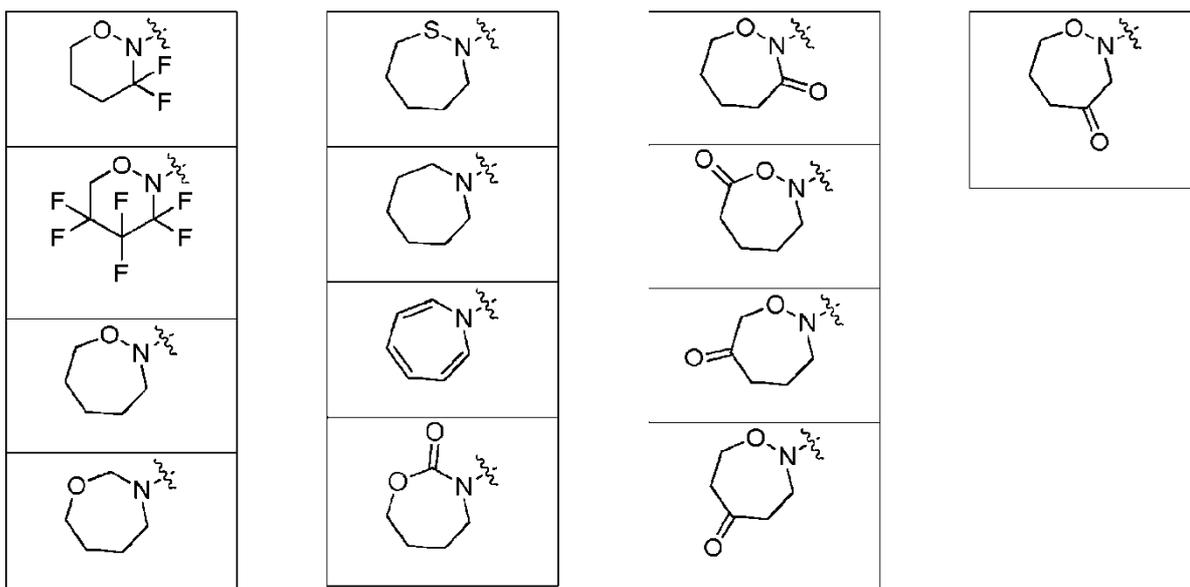
Por ejemplo R₃ representa H, R₄ representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R₅ representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

15



en la que R₁₀ 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 del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del ceteno en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

10 Los compuestos de fórmula (VII) pueden prepararse según métodos dados a conocer en el documento WO2011/098809 que se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

15 Los compuestos de fórmula (X) y (I) a (IV) pueden prepararse generalmente mediante métodos similares a los descritos en los documentos WO2010/034243, WO2011/098805, WO2011/098808 y WO2011/098809. Esto puede implicar alteración semisintética de un molde de sangliferina producido mediante fermentación, por ejemplo mediante dihidroxilación asimétrica de Sharpless modificada y escisión oxidativa, seguido por acoplamiento de Horner-Wadsworth-Emmons de un fosfonato adecuado.

Formulaciones

20 Las formulaciones farmacéuticas de sangliferinas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo (sangliferina) con el portador que constituye uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

25 Según la invención, las sangliferinas se administrarán normalmente por vía oral en forma de una formulación farmacéutica que comprende el principio activo, opcionalmente en forma de una sal de adición de ácido o base, orgánica o inorgánica, no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno y del paciente que va a tratarse, así como de la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a diversas dosis.

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

40 También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la 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, material colorante o pigmentos, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

45 Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes

auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse comprimiendo en una máquina adecuada el principio activo en una forma de flujo libre 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 sódica reticulada), agente tensioactivo o de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en los mismos usando, 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, cachets o comprimidos, que contienen, cada una, una cantidad predeterminada del principio activo; o como polvo o gránulos.

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

La forma de dosificación contendrá la sangliferina como principio activo en una forma en la que está protegida frente a degradación ácida en el estómago (lo más preferiblemente proporcionando un recubrimiento entérico y comentado en otra parte en el presente documento).

La dosificación de una sangliferina que va a administrarse variará según el compuesto particular, la enfermedad implicada, el sujeto y la naturaleza e intensidad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía de administración seleccionada. La dosificación apropiada puede determinarla fácilmente 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 una sangliferina, dependiendo del método de administración.

Un experto en la técnica reconocerá que la cantidad y separación óptimas de dosificaciones individuales de una sangliferina estarán determinadas por la naturaleza y el alcance del estado que esté tratándose, la forma, vía y sitio de administración, y la edad y el estado del sujeto particular que esté tratándose, y que un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas que deben usarse. Esta dosificación debe repetirse con la frecuencia que resulte apropiada. Si se desarrollan efectos secundarios puede alterarse o reducirse la cantidad y/o frecuencia, según la práctica clínica normal.

Tecnologías de recubrimiento entérico

En general, cuando va a aplicarse recubrimiento entérico a sustratos (tales como partículas, gránulos, cápsulas o comprimidos), se recubren con una capa de recubrimiento entérico con la presencia opcional de una capa de separación entre el sustrato y la capa de recubrimiento entérico y con la presencia opcional de una capa de acabado aplicada encima de la capa de recubrimiento entérico.

Opcionalmente pueden usarse capas de separación para evitar problemas de posible interacción química entre la capa de recubrimiento entérico (o su portador usado en el procedimiento de aplicación) y el principio activo (u otro componente del sustrato). También puede usarse una capa de separación cuando el principio activo (u otro componente del sustrato) puede disolverse parcial o sustancialmente durante el procedimiento de aplicación de la capa de recubrimiento entérico.

Una capa de separación puede contener, por ejemplo, un polímero tal como hidroximetilcelulosa (HPMC).

Opcionalmente pueden usarse capas de acabado, por ejemplo para proteger la capa entérica o, mediante inclusión de agentes de blanqueamiento o colorantes, para modificar el color del material recubierto. Una capa de acabado puede contener, por ejemplo, un polímero tal como hidroximetilcelulosa (HPMC) y un agente de blanqueamiento tal como dióxido de titanio.

Hay materiales de recubrimiento adecuados de capa de separación y capa de acabado disponibles con el nombre comercial Opadry de Colorcon.

La capa de recubrimiento entérico comprenderá normalmente una sustancia, tal como un ácido graso, cera, laca, polímeros, fibras vegetales y similares, que es estable frente al pH ácido del estómago (particularmente pH inferior a 5 y especialmente pH de aproximadamente 3 o menos) pero se descompone en entorno alcalino (por ejemplo pH 7-9) del intestino delgado.

Una clase de materiales de recubrimiento entérico son los ftalatos. Los ejemplos incluyen acetato-ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y poli(acetato-ftalato de vinilo).

Sureteric™ es un sistema de recubrimiento entérico acuoso patentado de Colorcon que comprende poli(acetato-ftalato de vinilo), plastificantes y otros componentes en un sistema en polvo seco.

5 Opadry™ Enteric es un sistema de recubrimiento entérico patentado de Colorcon basado en poli(acetato-ftalato de vinilo) que es adecuado para su aplicación mediante técnicas de procesamiento alcohólicas o hidroalcohólicas. Un grosor a modo de ejemplo de recubrimiento de Opadry Enteric es el de 11 mg de Opadry Enteric aplicado a una cápsula de tamaño 0 (21,7 mm de diámetro x 7,65 mm de altura) ajustado a escala según el tamaño del artículo recubierto.

10 Otra clase de materiales de recubrimiento entérico es los acetato-succinatos. Los ejemplos incluyen acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa y acetato-succinato de celulosa.

15 Otra clase de materiales de recubrimiento entérico incluye alginatos y derivados de ácido algínico.

Otra clase de materiales de recubrimiento entérico incluye copolímeros de acrilato de metilo - ácido metacrílico y copolímeros de metacrilato de metilo - ácido metacrílico. Acryl EZE™ es un sistema de recubrimiento entérico acrílico acuoso patentado de Colorcon.

20 Un material de recubrimiento entérico a modo de ejemplo adicional es Eudragit™ L-30 D55 de Evonik Röhm GmbH.

El recubrimiento, tal como recubrimientos de separación, recubrimientos entéricos y recubrimientos de acabado, se aplica normalmente al sustrato (partícula, gránulo, cápsula o comprimido) mediante recubrimiento por pulverización. El recubrimiento por pulverización puede realizarse según las instrucciones del fabricante.

25 Pueden obtenerse detalles adicionales de capas de recubrimiento a modo de ejemplo y métodos de aplicación de capas de recubrimiento (incluyendo grosores adecuados) mediante referencia a "Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms" 3ª edición (2008) Editores: James W McGinity and Linda A Felton; Editorial: Informa Healthcare USA, Inc, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

30 También puede obtenerse información adicional mediante referencia a Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, cuyo contenido se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

35 El tipo y grosor de las capas respectivas también pueden seleccionarse según las instrucciones del fabricante.

Uso terapéutico

40 Se espera que una sangliferina según la invención sea útil en el tratamiento de infecciones virales (especialmente infecciones por virus de ARN) tales como infección por VHC o VIH, para su uso como agente antiinflamatorio o para la profilaxis de rechazo de trasplante de órgano.

Los aspectos de la invención incluyen:

45 - Una forma de dosificación farmacéutica según esta invención para su uso en el tratamiento de infecciones virales (especialmente infecciones por virus de ARN) tales como infección por VHC o VIH, o para su uso como agente antiinflamatorio o para la profilaxis de rechazo de trasplante de órgano, mediante administración oral.

50 - Un método de tratamiento de infecciones virales (especialmente infecciones por virus de ARN) tales como infección por VHC o VIH, o un método de tratamiento de inflamación o un método de profilaxis de rechazo de trasplante de órgano, que comprende administrar por vía oral a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una forma de dosificación farmacéutica según esta invención.

55 Una cantidad eficaz es una cantidad que da lugar a una respuesta biológicamente significativa (por ejemplo, reducción de la carga viral, reducción de la inflamación, etc.) y puede determinarla experimentalmente un experto. Una cantidad eficaz puede estar normalmente en el intervalo de 1-1500 mg/día, lo más preferiblemente 25-600 mg/día (o 0,015-20 mg/kg, lo más preferiblemente 0,35-9 mg/kg/día), haciendo referencia dicha cantidad en peso a la cantidad de principio activo de sangliferina en la forma de dosificación.

Terapia de combinación

60 Una sangliferina según la invención puede administrarse sola o en combinación con otros agentes terapéuticos. La administración conjunta de dos (o más) agentes puede permitir usar dosis inferiores de cada uno, reduciendo así los efectos secundarios, puede conducir a una potencia mejorada y por tanto una SVR superior, y a una reducción de la resistencia.

65 Por tanto en una realización, la sangliferina se administra conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos para

el tratamiento de infección por VHC, tomados de los tratamientos de normas asistenciales. Puede ser un interferón (por ejemplo pIFN α y/o ribavirina).

5 En una realización alternativa, se administra una sangliferina conjuntamente con uno o más de otros agentes antivirales, tales como un STAT-C (agente dirigido específicamente para el tratamiento de VHC) o DAA (agentes antivirales de acción directa), que puede ser uno o más de los siguientes: inhibidores no nucleosídicos 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 nucleosídicos o nucleotídicos de la polimerasa (por ejemplo 2'-C-metilcitidina, 2'-C-metiladenosina, R1479, PSI-6130, R7128, R1626, PSI 7977 o IDX 184), inhibidores de la 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).

15 En una realización alternativa, se administra una sangliferina conjuntamente con uno o más de otros agentes antivirales (tales como terapia antirretroviral de alta actividad (HAART)) para el tratamiento de VIH, que puede ser uno o más de los siguientes: inhibidores nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NRTI) (por ejemplo emtricitabina o tenofovir), inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa (NNRTI) (por ejemplo rilpivirina o efavirenz), inhibidores de la 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 la maduración (por ejemplo bevirimat), anticuerpos monoclonales de CD4 (por ejemplo ibalizumab) e inhibidores de la integrasa (por ejemplo eltiegravir).

25 En una realización alternativa, se administra una sangliferina conjuntamente con uno o más de otros agentes antivirales para el tratamiento de VHB, que pueden ser uno o más de los siguientes: interferones (por ejemplo interferón alfa o interferón alfa pegilado), análogos de nucleósidos o nucleótidos (por ejemplo lamivudina, entecavir, adefovir dipivoxil o telbivudina), otros inmunomoduladores (por ejemplo timosina alfa, CYT107 o DV-601) o inhibidores de la HMG CoA reductasa (por ejemplo simvastatina).

30 Opcionalmente, la forma de dosificación farmacéutica según la invención puede comprender uno o más de otros agentes terapéuticos, por ejemplo uno o más de otros agentes antivirales y/o uno o más de otros agentes terapéuticos mencionados anteriormente.

35 Alternativamente, la forma de dosificación farmacéutica de la invención puede formar un kit de partes junto con una o más de otras formas de dosificación farmacéuticas que contienen uno o más de otros agentes antivirales y/o uno o más de otros agentes terapéuticos mencionados anteriormente

Métodos generales

40 Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

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

50 Se hizo crecer BIOT-4585 en agar de harina de avena a 28°C durante 7-10 días. Se recogieron esporas de la superficie de la placa de agar en glicerol estéril al 20% p/v en destilada y se almacenaron en alícuotas de 0,5 ml a -80°C. Se usó la disolución madre de esporas congelada 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 alcance 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 de siembra y se incubó con agitación entre 200 y 300 rpm con un alcance de 5 ó 2,5 cm a 24°C durante 4-5 días. Después se recogió el cultivo para la extracción.

Análogos de meta-tirosina

60 Se adquirieron (2S)-2-amino-3-(6-hidroxi-(2-piridil))propanoato de metilo, éster metílico de L-3-aminofenilalanina, éster metílico de L-4-metilmeta-tirosina, éster metílico de L-4-fluoro-meta-tirosina y éster metílico de L-4,5-difluoro-meta-tirosina de Netchem (EE.UU.).

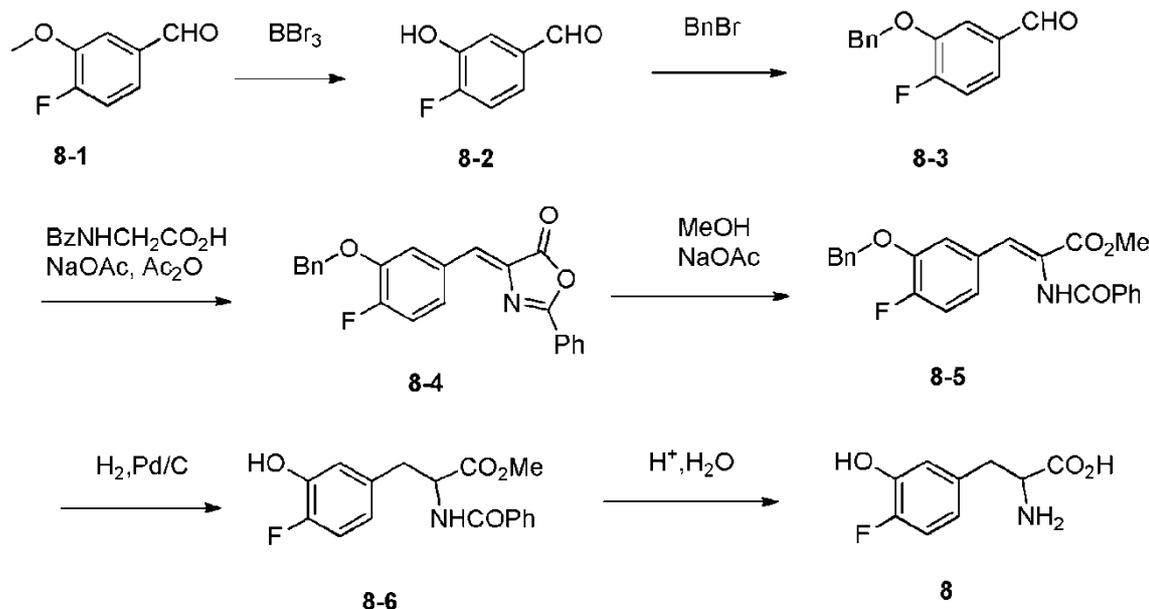
Se adquirieron DL-3-fluorofenilalanina y L-fenilalanina de Sigma (R.U.).

65 Se adquirió DL-meta-tirosina de Fluorochem (R.U.).

Se adquirió L-meta-tirosina de Alfa Aesar (R.U.).

Se sintetizaron DL-4-fluoro-meta-tirosina (8), DL-5-fluoro-meta-tirosina (9), 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (10), 2-amino-3-(2-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo (11), 2-amino-3-(2-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo (12) y 2-amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo (13) de la siguiente manera:

DL-4-fluoro-meta-tirosina (8)



10

15

20

25

30

35

40

A una disolución de 8-1 (3 g, 19,5 mmol) en DCM seco (150 ml) se le añadió gota a gota BBr_3 (4 M en DCM, 14,6 ml, 58,5 mmol) a -70°C . Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a -20°C durante 3 h, se añadió cuidadosamente agua con hielo y se extrajo con DCM. Se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice para dar el compuesto deseado 8-2.

A una disolución de 8-2 (0,9 g, 6,4 mmol) en acetona (40 ml) se le añadió K_2CO_3 (2,2 g, 16 mmol) a temperatura ambiente. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió agua y se eliminó acetona a vacío, y después se extrajo con EtOAc, se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice para dar el compuesto deseado 8-3.

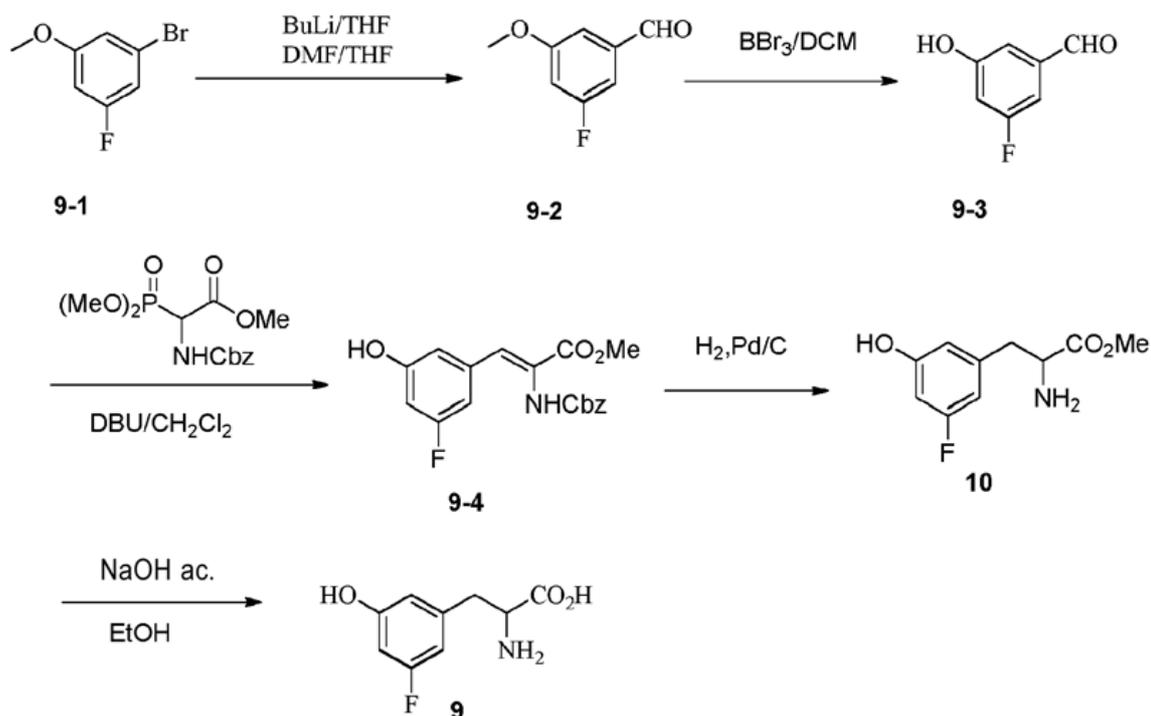
Se agitó una mezcla de 8-3 (1 g, 4,34 mmol), ácido hipúrico (860 mg, 4,80 mmol), NaOAc (400 mg) y Ac_2O (2,2 ml) a 80°C durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción amarilla y se añadió EtOH frío (10 ml), se enfrió la mezcla en un baño de hielo durante 15 min y después se vertió en 30 ml de agua con hielo, se enfrió y se recogió el producto mediante filtración. Se secó el sólido a vacío para proporcionar 8-4.

Se agitó una disolución de 8-4 (300 mg, 0,8 mmol) y NaOAc (71 mg, 0,87 mmol) en MeOH (50 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria y se disolvió el residuo en 50 ml de EtOAc, se lavó la disolución de EtOAc dos veces con agua y se concentró para dar 8-5.

Se hidrogenó una disolución de 8-5 (360 mg, 0,89 mmol) en MeOH (50 ml) sobre Pd al 10%/C (77 mg) a presión normal durante 20 h. Tras la retirada del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para dar el producto 8-6.

Se sometió una disolución de 8-6 (210 mg) en HCl 3 N (10 ml) a reflujo durante 24 h, se concentró la disolución hasta sequedad y se purificó el residuo mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para dar el producto objetivo 8.

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



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

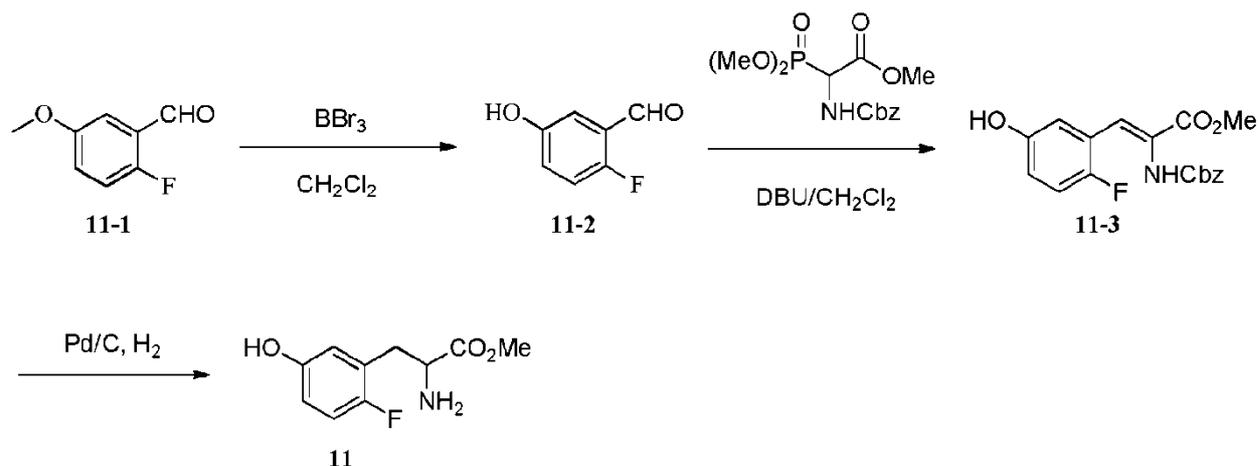
10 A una disolución de 9-2 (6 g, 38,9 mmol) en DCM seco (200 ml) se le añadió gota a gota BBr_3 (4 M en DCM, 30 ml, 116,8 mmol) a -70°C . Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a -20°C durante 3 horas, se añadió cuidadosamente agua con hielo y se extrajo con DCM. Se lavaron las fases orgánicas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

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

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

25 A una disolución de 10 (300 mg, 1,4 mmol) en EtOH (30 ml) se le añadió NaOH ac. (2 N, 4 ml), se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se eliminó el disolvente y se neutralizó el residuo a pH=6 con HCl 2 N y se recogieron los cristales blancos que se formaron mediante filtración para dar el compuesto objetivo 9.

2-Amino-3-(2-fluoro-5-hidroxi-fenil)propanoato de metilo (11)

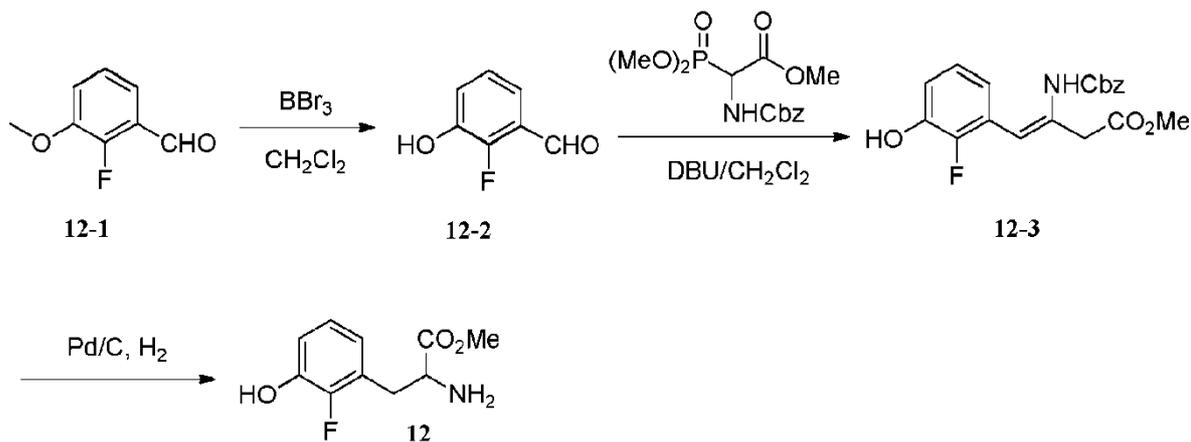


A una disolución del compuesto 11-1 (1,4 g, 9 mmol) en 50 ml de DCM se le añadió gota a gota BBr_3 (4M en DCM, 3,6 ml, 13,5 mmol) a -78°C . Tras la adición, se agitó la reacción a -20°C durante 4 horas. Después se añadió lentamente de hielo/agua, se separaron las fases, se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron hasta sequedad. Se usó el residuo para la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una disolución de 2-(benciloxycarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (3 g, 9 mmol) en 100 ml de DCM se le añadió DBU (2,8 g, 18 mmol) a temperatura ambiente, tras 10 min, se añadió el compuesto 11-2 (compuesto bruto de la etapa anterior), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se diluyó la disolución con DCM (50 ml), se lavó con HCl 1 N (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo=5/1) para dar 11-3.

Se hidrogenó una mezcla del compuesto 11-3 (500 mg, 1,5 mmol) en MeOH (20 ml) sobre 50 mg de Pd al 10%/C a presión normal durante la noche. Tras la retirada del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para obtener 11 como un sólido blanco.

2-Amino-3-(2-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo (12)



A una disolución del compuesto 12-1 (1,4 g, 9 mmol) en 50 ml de DCM se le añadió gota a gota BBr_3 (4M en DCM, 3,6 ml, 13,5 mmol) a -78°C . Tras la adición, se agitó la reacción a -20°C durante 4 horas. Tras la adición lenta de hielo/agua, se separaron las fases, se lavó la fase orgánica con agua y salmuera, se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se usó el residuo para la siguiente etapa sin purificación adicional.

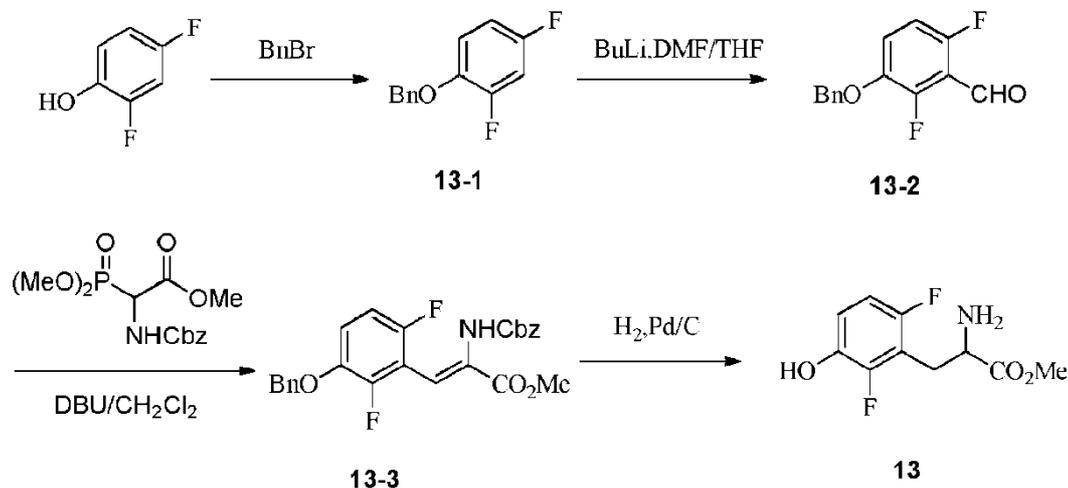
A una disolución de 2-(benciloxycarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (3 g, 9 mmol) en 100 ml de DCM se le añadió DBU (2,7 ml, 18 mmol) a temperatura ambiente, tras 10 min, se añadió el compuesto 12-2 (compuesto bruto de la etapa anterior), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se diluyó la disolución con DCM (100 ml), se lavó con HCl 1 N (30 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo = 5/1) para dar 12-3.

Se hidrogenó una mezcla del compuesto 12-3 (500 mg, 1,44 mmol) en MeOH (10 ml) sobre 100 mg de Pd al 10%/C a presión normal durante la noche. Tras la retirada del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para

obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para obtener el compuesto deseado 12 como un sólido blanco.

2-Amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo (13)

5



A una disolución de 2,4-difluorofenol (2 g, 15,4 mmol) en 50 ml DMF se le añadieron K_2CO_3 (3,2 g, 23,1 mmol) y BnBr (2,2 ml, 18,5 mmol) a 0°C. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron agua (100 ml) y EA (200 ml), se lavaron las fases orgánicas con agua (50 ml) y salmuera (50 ml), se secaron sobre Na_2SO_4 y se evaporaron hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo =10/1) para dar el producto bruto 13-1.

10

A una disolución del compuesto 13-1 (2 g, 9 mmol) en 10 ml THF se le añadió gota a gota n-BuLi (4 ml, 2,5 M) a -78°C y se agitó durante 30 min. Se añadió DMF (1,3 g, 0,018 mmol) y se agitó de nuevo durante 30 min. Después se retiró el baño frío y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora antes de extinguirse con agua. Se extrajo con acetato de etilo (20 ml x3), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo =10/1) para dar 13-2 como un sólido amarillo.

15

20

A una disolución de 2-(benciloxicarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (728 mg, 2,2 mmol) en 20 ml de DCM se le añadió DBU (319 mg, 2,1 mmol) a temperatura ambiente. Tras 10 min, se añadió el compuesto 13-2 (500 mg, 2 mmol) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se diluyó la disolución con DCM (50 ml), se lavó con HCl 1 N (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo =5/1) para dar 13-3 como un aceite amarillo.

25

Se hidrogenó el compuesto 13-3 (600 mg, 1,32 mmol) en MeOH (20 ml) sobre 60 mg de Pd al 10%/C a presión normal durante la noche. Tras la retirada del catalizador mediante filtración, se evaporó el disolvente para obtener el producto bruto, que se purificó mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para obtener el compuesto deseado 13 como un sólido blanco.

30

Fórmula de medios

35

El agua usada para preparar los medios se preparó usando un sistema de purificación de agua de calidad analítica Millipore Elix.

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 (Becton Dickinson, 212770)	1,35 g
extracto de malta (Becton Dickinson, 218630)	3,75 g
almidón de patata (soluble) (Sigma, S2004)	7,50 g
NZ-amina A (Sigma, C0626)	2,50 g
harina de soja tostada, Nutrisoy (ADM, 063-160)	2,50 g
L-asparagina (Sigma, A0884)	1,00 g
$CaCO_3$ (Calcitec, V/40S)	0,05 g

ES 2 639 918 T3

NaCl (Fisher Scientific, S/3160/65)	0,05 g
KH ₂ PO ₄ (Sigma, P3786)	0,25 g
K ₂ HPO ₄ (Sigma, P5379)	0,50 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, M7774)	0,10 g
disolución de oligoelementos B	1,00 ml
agar	1,00 g
Antiespumante SAG471 (GE Silicones, SAG471)	*0,20 ml
H ₂ O por RO	hasta un vol. final de **1,00 l

El pH previo a la esterilización se ajustó a pH 7,0 con NaOH 10 M/H₂SO₄ 10 M.

Esterilización mediante calentamiento a 121°C, 20-30 min (tratamiento en autoclave).

5

Notas

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

10

**el volumen final se ajusta en consecuencia para tener en cuenta el volumen de siembra.

Disolución de oligoelementos B

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

15

Medio de producción SGP2

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

El pH previo a la esterilización se ajustó a pH 6,8 con NaOH 10 M.

20

Esterilización mediante calentamiento a 121°C, 20-30 min (tratamiento en autoclave).

Notas

*el volumen final se ajusta en consecuencia para tener en cuenta el volumen de siembra.

25

**el antiespumante sólo se usa en fermentadores, no en matraces.

Medio SM25-3 (también denominado SM25)

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

30

No se ajusta el pH previo a la esterilización (es decir, pH 7,0).

Medio ISP4

Componente	Fórmula
Almidón soluble (Difco)	10 g

ES 2 639 918 T3

K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
NaCl	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
CaCO ₃	2 g
Disolución de sales de oligoelementos ISP	1 ml
Agar	20 g
hasta un vol. final de	1 l

Preparar una pasta con el almidón en un volumen pequeño de agua fría y se lleva a un volumen de 500 ml.

- 5 Añadir los demás componentes a la disolución II en 500 ml de agua, el pH debe estar entre pH 7,0 y pH 7,4 (pH 7,3).
Mezclar las dos disoluciones entre sí y añadir agar.

Sales de oligoelementos ISP

Componente	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
hasta un vol. final de	1 l

- 10 Almacenar a 4°C.

Método de fermentación general

- 15 Se descongelaron disoluciones madre de esporas criopreservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 4,0 ml de disolución madre de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (alcance de 5,0 cm). A partir del cultivo de siembra se transfirieron 25 ml a 250 ml de medio de producción SGP2+HP20 al 5% en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Tras 24 horas de cultivo a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm), se añadieron 2 ml de una disolución racémica 250 mM o enantioméricamente pura 125 mM del precursor deseado en ácido clorhídrico 1 M y 2 ml de una disolución metanólica 250 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración final de 1 mM de los enantiómeros individuales de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm).

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

Se añadieron caldo de cultivo (1 ml) y acetato de etilo (1 ml) y se mezclaron durante 15-30 min seguido por centrifugación durante 10 min. Se recogieron 0,4 ml de la fase orgánica, se evaporaron hasta sequedad y después volvieron a disolverse en 0,20 ml de acetonitrilo.

- 30 Condiciones de HPLC:

Columna C18 Hyperclone BDS C18 de 3u, 4,6 mm x 150 mm

- 35 Equipada con una precolumna de seguridad Phenomenex Analytical C18 (KJ0-4282)

Temp. de columna a 50°C

Velocidad de flujo de 1 ml/min

- 40 UV de monitorización a 240 nm

Inyección de alícuota de 20 ul

- 45 Gradiente de disolventes:

0 min: el 55% de B

1,0 min: el 55% de B

- 50 6,5 min: el 100% de B

10,0 min: el 100% de B

ES 2 639 918 T3

- 10,05 min: el 55% de B
- 13,0 min: el 55% de B
- 5 El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%
- El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
- 10 En estas condiciones SfA eluye a 5,5 min
- En estas condiciones SfB eluye a 6,5 min
- 15 Se realiza CL-EM en un sistema de HPLC Agilent HP1100 integrado en combinación con un espectrómetro de masas por electropulverización Bruker Daltonics Esquire 3000+ que funciona en modo de iones positivos usando la cromatografía y los disolventes descritos anteriormente.
- Método de CL-EM de QC
- 20 Condiciones de HPLC:
- Columna C18 Hyperclone BDS C18 de 3u, 4,6 mm x 150 mm
- Equipada con una precolumna Phenomenex Analytical C18 (KJ0-4282)
- 25 Temp. de columna a 50°C
- Velocidad de flujo de 1 ml/min
- 30 UV de monitorización a 210, 240 y 254 nm
- Gradiente de disolventes:
- 0 min: el 10% de B
- 35 2,0 min: el 10% de B
- 15 min: el 100% de B
- 40 17 min: el 100% de B
- 17,05 min: el 10% de B
- 20 min: el 10% de B
- 45 El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%
- El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
- 50 Condiciones de EM:
- La EM funciona en modo de conmutación (conmutando entre positivo y negativo), barriendo desde 150 hasta 1500 uma.
- 55 Análisis de 24 mediante HPLC en el estudio de cápsulas
- Se analizó 24 mediante HPLC usando los siguientes parámetros

Parámetro	Configuración
Sistema:	Serie Agilent 1200
Columna:	Columna Phenomenex Hyperclone BDS C18 de 3u, 4,6 mm x 150 mm
Fase móvil:	El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1% El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
Volumen de inyección:	20 ml
Velocidad de flujo:	1 ml/min

Temperatura de columna:	50°C
Tiempo de ejecución:	20 min
Detección:	Detector UV Agilent, 276 nm
Gradiente:	0 min: el 10% de B 2,0 min: el 10% de B 15 min: el 100% de B 17 min: el 100% de B 17,05 min: el 10% de B 20 min: el 10% de B

Evaluación *in vivo* de farmacocinética oral e intravenosa

- 5 Para sangliferinas, se analiza sangre completa. Se formulan compuestos en el 5% de etanol / el 5% de Cremophor EL / el 90% de solución salina para la administración tanto v.o. como i.v. A grupos de 3 ratones CD1 macho se les administran dosis de o bien 1 mg/kg i.v. o bien 5 ó 10 mg/kg v.o. Se extraen muestras de sangre (40 ml) a través de la vena safena, antes de la dosis y a las 0,25, 0,5, 2, 8 y 24 horas, y se diluyen con una cantidad igual de dH₂O y se colocan inmediatamente en hielo seco. Se almacenan las muestras a -70°C hasta el análisis. Se determina la concentración de la sangliferina o del compuesto original en la muestra mediante CL-EM de la siguiente manera: a
- 10 20 µl de sangre:H₂O (1:1, v/v)/muestra de PK se le añaden 20 µl patrón interno (hidroximacrociclo, 6) a 100 ng/ml, 20 µl disolución de trabajo/MeOH y 150 µl de ACN, se agitan con vórtex durante 1 minuto a 1500 rpm, y se centrifugan a 12000 rpm durante 5 min. Después se inyecta el sobrenadante en CL-EM/EM. Se representan gráficamente las concentraciones en sangre a lo largo del transcurso del tiempo y se usan para derivar el área bajo la curva de concentración en sangre completa-tiempo (AUC, que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco sin modificar que alcanza la circulación sistémica). Estos valores se usan para generar parámetros de PK cuando es posible.

Evaluación *in vitro* de la estabilidad en condiciones ácidas y neutras

- 20 Disoluciones en DMSO de compuesto de prueba

Se prepararon disoluciones en DMSO 1 mM de compuestos que iban a someterse a prueba y se mezclaron en Vibrax para garantizar que el compuesto se disolvía completamente.

- 25 Disoluciones de prueba

Se prepararon las siguientes disoluciones para someter a prueba los compuestos:

- 30 Disolución de PBS: se añadieron 2 comprimidos de solución salina tamponada con fosfato (Dulbecco A) (Oxoid, BR0014G) a 200 ml de agua destilada y se agitó para mezclar. Se midió que el pH era de 7,28.

Fluido intestinal simulado (SGF): se añadieron 300 µl de HCl conc. a 50 ml de agua destilada y se mezclaron. Se midió que el pH era de 1,21.

- 35 Fluido intestinal simulado + pepsina: se añadieron 300 µl de HCl conc. y 1 g de pepsina (de mucosa gástrica porcina, Sigma) a 50 ml de agua destilada y se mezclaron mediante agitación durante 1 h.

SGF + pepsina desnaturalizada: se llevaron 900 µl de disolución de enzima ácida a un tubo Eppendorf de 2 ml y se calentaron a 99°C en un baño de agua durante 30 min.

- 40 Las disoluciones de enzima ácida y de enzima desnaturalizada ácida se prepararon nuevas cada día, mientras que las disoluciones de PBS y ácido se almacenaron a 4°C cuando no se usaban.

- 45 Se calentaron previamente tubos Eppendorf que contenían 900 µl de disoluciones de prueba en un baño de agua a 37°C. A t = 0, se añadieron 100 µl de compuesto de prueba (disolución en DMSO 1 mM) a la disolución de prueba y se mezclaron. Se tomaron inmediatamente 100 µl y se mezclaron con 900 µl de acetonitrilo en un vial para CL de vidrio ámbar. Se analizaron 50-100 µl de la muestra mediante HPLC, integrando los picos UV de los compuestos para determinar la degradación a lo largo del tiempo. Se midió la sangliferina A a su $\lambda_{\text{máx}}$ de 240 nm; se midieron 33, 45 y 24 a su $\lambda_{\text{máx}}$ de 276 nm.

- 50 Se tomaron muestras adicionales de la misma manera para el análisis a aproximadamente t = 0,33, 0,67, 1,0, 2,67 y 4,67 h. Se realizó un análisis final a t = >30 para confirmar el punto final de la reacción.

- 55 También se prepararon controles de disoluciones en DMSO de compuestos de prueba en 900 µl de DMSO y se trataron de la misma manera, analizándose las muestras a t = 0, t = 8 y t = >30 h. Se calcularon las semividas a partir de los datos generados.

Evaluación de la estabilidad en hepatocitos

5 Se colocan hepatocitos crioconservados, previamente almacenados en nitrógeno líquido, en un baño de agua con agitación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $2 \text{ min} \pm 15 \text{ s}$. Después se añaden los hepatocitos a un volumen de 10X de tampón de bicarbonato de Krebs-Henseleit (KHB) previamente calentado (glucosa 2000 mg/l, sin carbonato de calcio ni bicarbonato de sodio, Sigma), se mezclan suavemente y se centrifugan a 500 rpm durante 3 minutos. Tras la centrifugación, se retira cuidadosamente el sobrenadante y se añade un volumen de 10X de tampón KHB
10 previamente calentado para resuspender el sedimento celular. Se mezcla esto suavemente y se centrifuga a 500 rpm durante 3 minutos. Después se retira el sobrenadante y se descarta. Después se determinan la viabilidad celular y el rendimiento mediante recuentos celulares, y se usan estos valores para generar suspensiones de hepatocitos humanos a la densidad de siembra apropiada (densidad de células viables = 2×10^6 células/ml). Se prepara una disolución de dosificación 2X en KHB previamente calentado (DMSO al 1%) (disolución de adición conocida 200 μM :
15 20 μl de disolución madre de sustrato (10 mM) en 980 μl de DMSO, disolución de dosificación 2X: 10 μl de disolución de adición conocida 200 μM en 990 μl de KHB (2 μM tras la dilución).

Se añaden 50 μl de disolución de dosificación 2X previamente calentada a los pocillos y se añaden 50 μl de disolución de hepatocitos previamente calentada (2×10^6 células/ml) y se comienza la temporización. Después se incubaba la placa a 37°C . Se añaden 100 μl de acetonitrilo que contiene patrón interno a cada uno de los pocillos tras transcurrirse el tiempo de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 minutos), se mezcla suavemente y se añaden 50 μl de disolución de hepatocitos previamente calentada (2×10^6 células/ml). Al final de la incubación, se determina la viabilidad celular. Se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C , se diluyen los sobrenadantes 2 veces con agua ultrapura y se analizan los niveles de compuestos mediante CL-EM/EM.

25 **Ejemplos**

*Ejemplo 1 - Construcción de un mutante de delección de *sfaA* de *Streptomyces* sp. A92-308110 (DCM9954)*

30 1.1 Construcción del constructo de delección de *sfaA*

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

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

(SEQ ID NO. 1) SfaA17161f 5'-

CGCTCTGTGGCGCCTGGTTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATTA
40 ACCCTCACTAAAGGGCG-3'

(SEQ ID NO. 2) SfaA17825r 5'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCGAGAATTCACCTGCGACGTCCTCCAGATGCATTAATAC
GACTCACTATAGGGCTC-3'

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

Se transformó el plásmido pSGK268 en *E. coli* DH10B usando técnicas convencionales y se seleccionó en placas que contenían apramicina (50 $\mu\text{g/ml}$). Se realizó la introducción del constructo de delección esencialmente siguiendo el protocolo del kit de Gene Bridges. Se hizo crecer una única colonia durante la noche en apramicina 2TY (50 $\mu\text{g/ml}$) y se transformó con el plásmido pRedET (tet) y se seleccionó en apramicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (3 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C . Se usó una única colonia para preparar un cultivo durante la noche de esta cepa en 3 ml de apramicina 2TY (50 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (3 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C . Se usaron 0,5 ml de este cultivo para inocular 10 ml de apramicina 2TY (50 $\mu\text{g/ml}$) y tetraciclina (3 $\mu\text{g/ml}$) a 30°C y se hicieron crecer hasta una $\text{DO}_{600 \text{ nm}} \sim 0,5$. Se transfirieron 1,4 ml de este cultivo a cada uno de 2 tubos Eppendorf y se añadieron 50 μl de arabinosa al 10% a un tubo para inducir la expresión de las proteínas de recombinación Red/ET. Se agitaron los tubos durante ~ 1 hora a 37°C . Se sedimentaron las células inducidas y no inducidas en una centrifuga de sobremesa y se lavaron dos veces con agua estéril helada; resuspendiendo y centrifugando para sedimentar las células cada vez. Se suspendieron los

sedimentos resultantes en aproximadamente 30-40 µl de agua y se mantuvieron en hielo. Se añadió el fragmento de alteración de 1,7 kb anteriormente aislado a los tubos inducidos y no inducidos y se transfirió a electrocubetas Biorad de 1 mm en hielo. Se sometieron las muestras a electroporación (Biorad Micropulser a 1,8kV, constante de tiempo resultante ~4 ms) y se añadió 1 ml de 2TY (sin antibióticos) y se mezclaron para retirar las células de la cubeta. Se incubaron las células durante ~3 horas a 37°C con agitación (1100 rpm, Eppendorf Thermomixer compacta) antes de sembrar en placas de 2TY que contenían apramicina (50 µg/ml) y kanamicina 25 µg/ml e incubar durante la noche a 37°C. Se cultivaron en líneas colonias de las placas de muestra inducidas sobre placas de 2TY que contenían kanamicina a 50 µg/ml para purificar y confirmar la introducción del casete de resistencia a la kanamicina. Se usó PCR con colonias bacterianas individuales para confirmar la introducción del casete. Se prepararon plásmidos a partir de estos cultivos y se digirieron para confirmar el plásmido previsto pSGK270. Después se digirieron los plásmidos con *NsiI* para retirar el fragmento de marcador, y volvió a ligarse el resto para producir el constructo con delección en marco de *sfaA*, pSGK271.

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

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

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

Se mezclaron *E. coli* ET12567 pUZ8002 pSGK271 y Biot-4370 preparadas a razones de 1:1 (250 µl de cada cepa) y 1:3 (100 µl de *E. coli*) y se extendieron inmediatamente sobre placas R6 y se transfirieron a una incubadora a 37°C. Tras aproximadamente 2 horas de incubación, se recubrieron estas placas con 2 ml de agua estéril que contenía ácido nalidíxico para dar una concentración en placa final de 25 µg/l. Se devolvieron las placas a la incubadora a 37°C durante la noche antes de recubrir con 2 ml de agua estéril que contenía apramicina para dar una concentración en placa final de 20-25 µg/l. Se fijaron colonias ex-conjugantes que aparecían tras ~4-7 días a medios ISP4 que contenían apramicina (25 µg/l) y ácido nalidíxico (25 µg/l) y se incubaron a 37°C. Una vez observado un crecimiento micelial adecuado, volvieron a fijarse las cepas a medios ISP4 que contenían apramicina (25 µg/l) a 37°C y se dejó que produjeran esporas. Después se subcultivaron las cepas tres veces (para fomentar la eliminación del plásmido sensible a la temperatura) mediante fijación a ISP4 (sin antibiótico) e incubación a 37°C durante 3-4 días. Finalmente se fijaron las cepas a ISP4 y se incubaron a 28°C para permitir una esporulación completa (5-7 días). Se recogieron las esporas y se diluyeron en serie sobre placas de ISP4 a 28°C para permitir la selección de colonias individuales. Se fijaron doblemente las colonias individuales esporuladas a placas de ISP4 con o sin apramicina (25 µg/l) para confirmar la pérdida de plásmido y se dejó que crecieran ~ 7 días antes de someter a prueba para determinar la producción de sangliferinas.

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

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

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

Se analizaron extractos de cepas mediante HPLC. Las cepas que produjeron sangliferina A y B no se analizaron adicionalmente ya que éstas habían vuelto al tipo natural. Las cepas que carecían de producción de sangliferina A y

B mostraron pequeños niveles (~1-2 mg/l) de un pico con un tiempo de retención de 6,5 minutos que presentaba un cromóforo de tipo sangliferina. El análisis mediante CL-EM indicó que este pico tenía una m/z de 1073, -16 unidades con respecto a la m/z prevista de sangliferina. Se postuló que este pico se debía a la incorporación de fenilalanina en ausencia de meta-hidroxitirosina.

Posteriormente volvieron a hacerse crecer ocho cepas que mostraban pérdida de producción de sangliferina para evaluar si la posible mutación de *sfaA* podía complementarse químicamente permitiendo un procedimiento mutasintético para producir sangliferinas novedosas. Se hicieron crecer las cepas en medios de siembra SM25-3 durante 48 horas antes de la transferencia a medios de producción SGP2 con resina al 5%. Tras 24 horas de crecimiento adicionales, se alimentó por triplicado a las cepas DL-meta-hidroxitirosina 2 mM (adición de 100 μ l de una disolución 0,16 M en HCl 1 M) o L-fenilalanina 2 mM usándose una cepa sin alimentación como control. También se alimentó a las cepas ácido piperólico (2 mM en metanol) para potenciar los rendimientos de producto. Se recogieron cepas tras 4 días de crecimiento adicionales y se extrajeron y se analizaron mediante HPLC. Se mostró que meta-hidroxi-tirosina complementaba completamente la mutación de *sfaA* y la adición de L-fenilalanina aumentó los niveles del compuesto de -16 uma. Se eligió la cepa Biot-4585 para estudiarla adicionalmente como mutante de delección de *sfaA*.

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

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

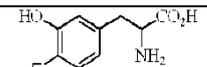
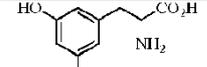
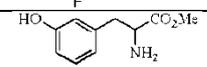
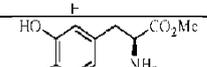
Ejemplo 3 – Alimentación en matriz del mutante de delección de *sfaA*

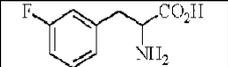
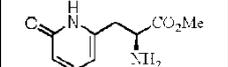
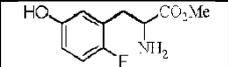
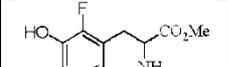
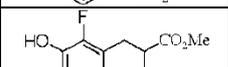
Se prepararon disoluciones madre de esporas de un mutante con alteración en *sfaA* (BIOT-4452 o BIOT-4585) tras el crecimiento en medio MAM, ISP4, ISP3 o ISP2, y se conservaron en glicerol al 20% p/v en agua destilada y se almacenaron a -80°C. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) inoculando disolución madre de esporas (1% v/v) en 7 ml de medio de siembra (medio SM25) en tubos de centrifuga de 50 ml con tapones de espuma. Se incubaron los tubos de cultivo a 27°C, 250 rpm (alcance de 5 cm) durante 48 h. A partir del cultivo de siembra se transfirió el 10% (v/v) a 7 ml de medio de producción SGP-2 en tubos de centrifuga de 50 ml con tapones de espuma. Se llevó a cabo el cultivo a 24°C y 300 rpm (alcance de 2,5 cm). Para la producción de sangliferinas mutasintéticas, se añadieron 0,05 ml de una disolución 0,32 M (en HCl 1 N) del compuesto de alimentación (mutasintón) a cada tubo a las 24 horas tras la inoculación para dar una concentración final de 2 mM. Adicionalmente, se añadieron 0,05 ml de una disolución 0,32 M de ácido piperázico (en metanol) a cada tubo a las 24 horas para dar una concentración final de 2 mM. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales tras la alimentación.

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

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

Tabla 1

mutasintón alimentado	nombre de mutasintón	[M-H] ⁻ observada (m/z)	[M+Na] ⁺ observada (m/z)	masa molecular (uma)	tiempo de retención (minutos)
	ácido 2-amino-3-(4-fluoro-3-hidroxifenil)propanoico	1106,4	1130,4	1107,4	5,5
	ácido 2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propanoico	1106,4	1130,4	1107,4	5,7
	2-amino-3-(3-fluoro-5-hidroxifenil)propionato de metilo	1106,4	1130,4	1107,4	5,7
	(S)-2-amino-3-(3-hidroxi-4-metilfenil)propanoato de metilo	1102,5	1126,7	1103,5	6,0

	ácido 2-amino-3-(3-fluorofenil)propanoico	1090,4	1114,5	1091	6,1
	(2S)-2-amino-3-(3-hidroxi(2-piridil))propanoato de metilo	1089,5	1113,7	1090,5	4,4
	2-amino-3-(2-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo	1106,5	1130,6	1107,5	5,5
	2-amino-3-(2-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo	1106,5	1130,6	1107,5	5,1
	2-amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo	1124,4	1148,5	1125,5	5,1

Ejemplo 4 - aislamiento de 63-fluoro-sangliferina A, compuesto 14

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

Tras la recogida, se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (1,3 g).

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

Ejemplo 5 - Aislamiento de 62,63-fluoro-sangliferina A, compuesto 15

30 Se llevó a cabo la fermentación tal como se describe en los métodos generales usando (S)-2-amino-3-(3,4-difluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo y ácido DL-piperázico como precursores, se añadieron ambos a las 26 horas.

Tras la recogida, se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (1,6 g).

Se disolvió el extracto bruto (1,6 g) en 2 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (10 x 2 cm) acondicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (188 mg) en 1,8 ml de metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un

sólido amorfo blanquecino (15 mg).

Ejemplo 6 - Aislamiento de 62-fluoro-sangliferina A, compuesto 16

- 5 Se emplearon los precursores (S)-2-amino-3-(4-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo y ácido DL-piperázico. Se llevó a cabo según el método general con la excepción de que los precursores se añadieron a las 27 horas.

Tras la recogida, se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones.

- 15 Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto aceitoso final (4,2 g).

Se disolvió el extracto bruto (4,2 g) en 4 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) acondicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (390 mg) en 2,4 ml de metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se identificaron las fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (38 mg).

30 *Ejemplo 7 - Aislamiento de 62-metil-sangliferina A, compuesto 17*

Se descongelaron disoluciones madre de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 0,4 ml de disolución madre de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm). A partir del cultivo de siembra se transfirieron 20 ml a 400 ml de medio de producción SGP2+HP20 al 5% en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Tras 24 horas de cultivo a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm), se añadieron 2 ml de una disolución 200 mM de (S)-2-amino-3-(3-hidroxi-4-metilfenil)propanoato de metilo en ácido clorhídrico 1 M y 2 ml de una disolución metanólica 400 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración final de 1 mM de los enantiómeros individuales de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm).

Se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador de paletas superior. Se recuperó el extracto de acetonitrilo dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (7,6 g).

Se disolvió el extracto bruto (7,6 g) en 5 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) acondicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (319 mg) en 2,4 ml de metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se identificaron las fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (14,9 mg).

Ejemplo 8 - Aislamiento de 61-deshidroxi-sangliferina A, compuesto 18

- 65 Se descongelaron disoluciones madre de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 0,4 ml de disolución madre de esporas a 400 ml

de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm). A partir del cultivo de siembra se transfirieron 500 ml a 4,5 l de medio de producción SGP2+HP20 al 5% en un fermentador Applikon de 7 l y se cultivaron a 24°C, 400 rpm (control de DOT en cascada), flujo de aire de 2,5 l/min y DOT al 30% (control de agitación en cascada). Tras 24 horas de cultivo, se añadieron 7,5 ml de una disolución 667 mM de ácido (S)-2-amino-3-fenilpropanoico en ácido clorhídrico 1 M al fermentador para dar una concentración final de 1 mM del precursor. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C, 400 rpm (control de DOT en cascada), flujo de aire de 2,5 l/min y DOT al 30% (control de agitación en cascada).

Se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador de paletas superior. Se recuperó el extracto de acetonitrilo dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones, pero recuperándose el segundo extracto mediante centrifugación. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (55 g).

Se suspendió el extracto bruto (55 g) en metanol al 80% en agua y se extrajo con 300 ml de hexano dos veces. Se encontró el compuesto objetivo en la parte de metanol/agua y se llevó hasta sequedad. Se disolvió este extracto seco (48 g) en 30 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (20 x 5 cm) acondicionada con 1 l de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (813 mg) en metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se identificaron las fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (34 mg).

Ejemplo 9 - Aislamiento 58-des(3-hidroxifenil)-58-(3-hidroxi-(2-piridil)-sangliferina A, compuesto 19

Se emplearon los precursores (2S)-2-amino-3-(3-hidroxi-(2-piridil)propanoato de metilo y ácido DL-piperázico. Se llevó a cabo según el método general con la excepción de que el alcance de la incubadora durante el cultivo vegetativo (de siembra) era de 2,5 cm.

Se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador de paletas superior. Se recuperó el extracto de acetonitrilo dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (7 g).

Se disolvió el extracto bruto (7 g) en 4 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) acondicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo hasta el 100% acetona, después del 1% de metanol gradualmente al 5% de metanol en acetona). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (204 mg) en metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática al 50% de B durante 6 minutos tras la inyección seguido por un gradiente hasta el 100% de B a los 30 minutos. Se identificaron las fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (4 mg).

Ejemplo 10 - Aislamiento de 61-deshidroxi-61-fluoro-sangliferina A, compuesto 20

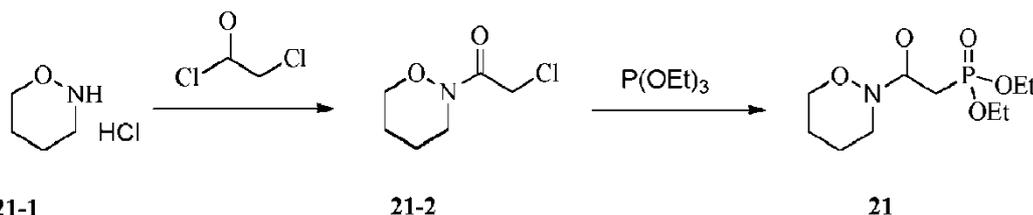
Se descongelaron disoluciones madre de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 0,4 ml de disolución madre de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm). A partir del cultivo de siembra se transfirieron 20 ml a 400 ml de medio de

producción SGP2+HP20 al 5% en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Tras 24 horas de cultivo a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm), se añadieron 2 ml de una disolución 400 mM de ácido 2-amino-3-(3-fluorofenil)propanoico en ácido clorhídrico 1 M y 2 ml de una disolución metanólica 400 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración final de 1 mM de los enantiómeros individuales de los
5 precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (alcance de 2,5 cm).

Se combinaron los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo aclarado. Se descartó el caldo aclarado tras haber confirmado el ensayo que estaba presente menos del 5% del compuesto objetivo. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador de paletas superior. Se recuperó el extracto de acetonitrilo dejándolo reposar por gravedad. Después se llevó a cabo una segunda extracción en acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se obtuvo un tercer extracto mediante centrifugación de la mezcla de células residuales y resina. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta obtener un volumen acuoso residual a presión reducida y después se ajustaron a pH 6. Se extrajo dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto bruto final (10,5 g).
10

Se disolvió el extracto bruto (10,5 g) en 7 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) acondicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y después con aumentos graduales de acetona (10%, 20%, 30%, etc. en acetato de etilo). Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml y se identificó el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinaron y se llevaron hasta sequedad. Se disolvió este material (342 mg) en metanol y se purificó mediante HPLC preparativa. Se usó una columna Waters Xterra MSC18 (10 micrómetros, 19 cm x 250 mm) con disolvente bombeado a 21 ml/min. El disolvente A era agua y el disolvente B era acetonitrilo. Se empleó la columna de manera isocrática at 53% de B durante 30 minutos tras la inyección. Se identificaron las fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para proporcionar el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (6 mg).
15

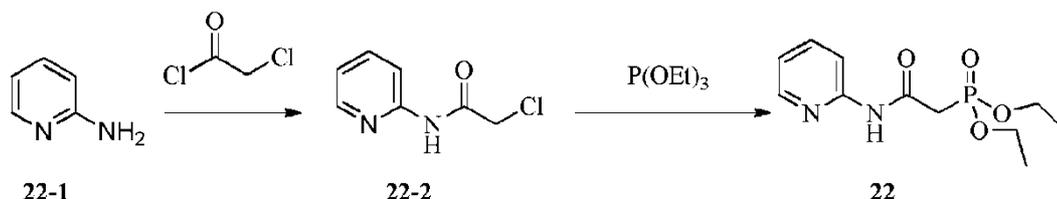
Ejemplo 11 - Síntesis de (2-(1,2-oxazinan-2-il)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo



A una disolución de 21-1 (ChemCollect, Alemania) (100 mg, 0,81 mmol), Et₃N (246 mg, 2,43 mmol) en DCM seco (5 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (138 mg, 1,22 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente 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 Na₂SO₄, se filtró, se concentró a vacío. Se usó el residuo (21-2) para la siguiente etapa sin ninguna purificación adicional (123 mg, rendimiento del 90%).
35

Se agitó una mezcla de 21-2 (123 mg, 0,75 mmol) y fosfito de trietilo (250 mg, 1,50 mmol) a 140°C durante 6 h. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para proporcionar 21.
40

Ejemplo 12 - Síntesis de (2-oxo-2-(piridin-2-ilamino-2)etil)fosfonato de dietilo

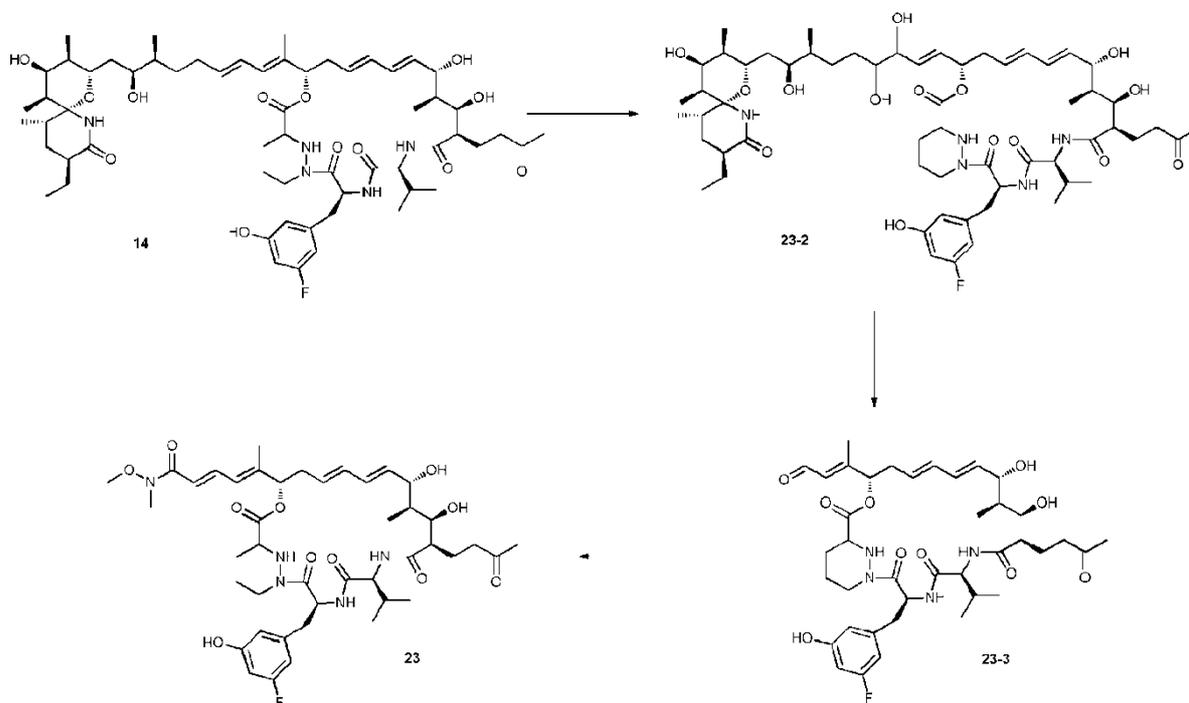


A una disolución de 22-1 (1 g, 10,6 mmol), Et₃N (1,075 g, 10,6 mmol) en cloruro de metileno seco (50 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (1,2 g, 10,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para proporcionar 22-2.
50

Se agitó una mezcla de 22-2 (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 cromatografía ultrarrápida para

proporcionar 22.

Ejemplo 13 - Preparación de compuesto 23



5

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

15

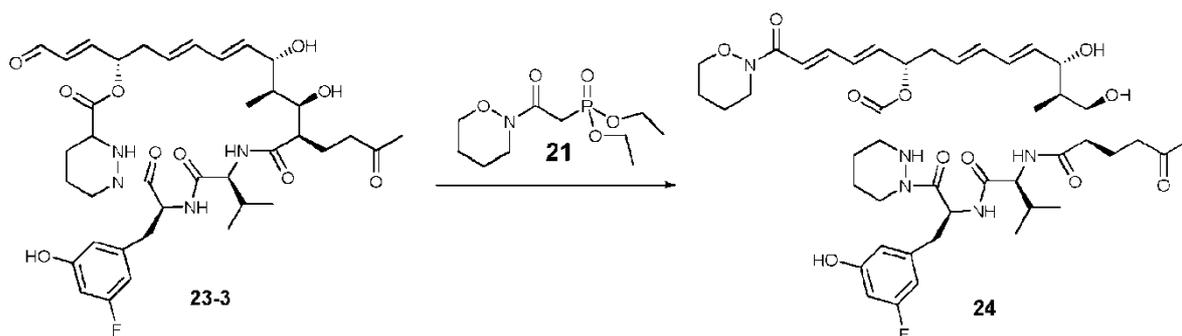
A una disolución con agitación de 23-2 (240 mg, 0,21 mmol) en 24 ml de una mezcla 2:1 de THF y agua se le añadió peryodato de sodio (91 mg, 0,42 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h, y después se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se extrajo esta mezcla con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

20

A una disolución de (2-(metoxi(metil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (91 mg, 0,368 mmol) en THF (5,0 ml) se le añadió NaH (2,8 mg, 0,1104 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 23-3 (70 mg, 0,092 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 30 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 23 como un sólido blanco.

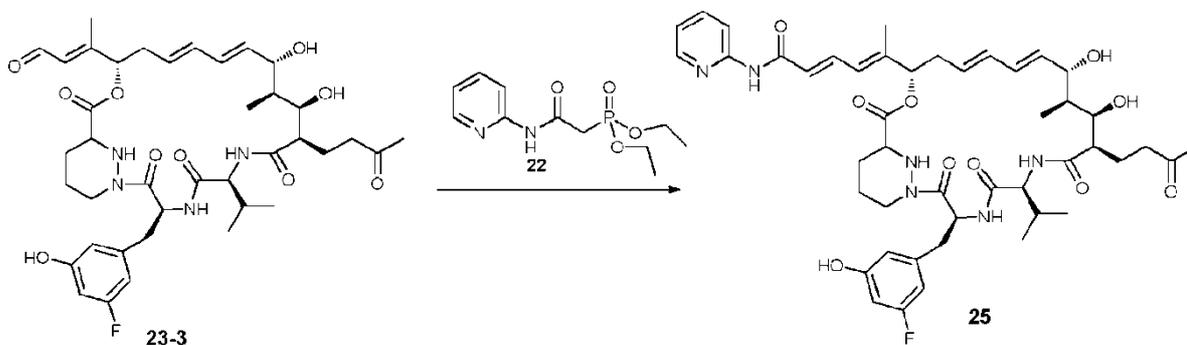
25

30 *Ejemplo 14 - Preparación de compuesto 24*



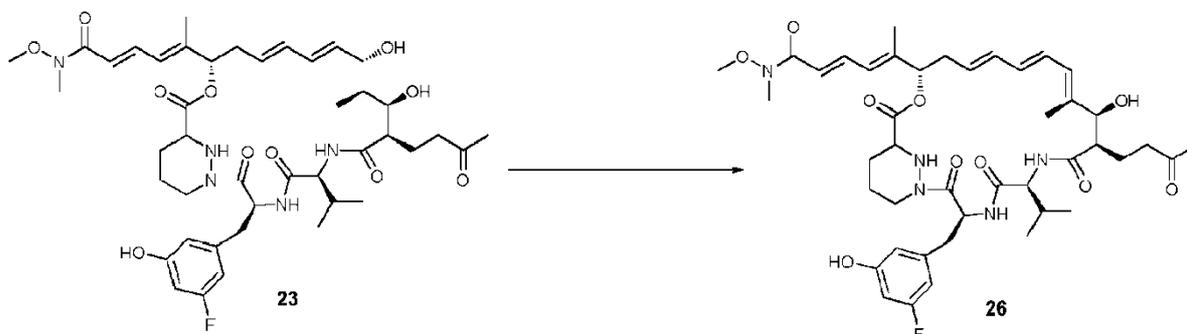
5 A una disolución de 21 (42 mg, 0,168 mmol) en THF (2,0 ml) se le añadió NaH (1,2 mg, 0,05 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 23-3 (30 mg, 0,042 mmol) a la disolución transparente y se agitó la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

10 *Ejemplo 15 - Preparación de compuesto 25*



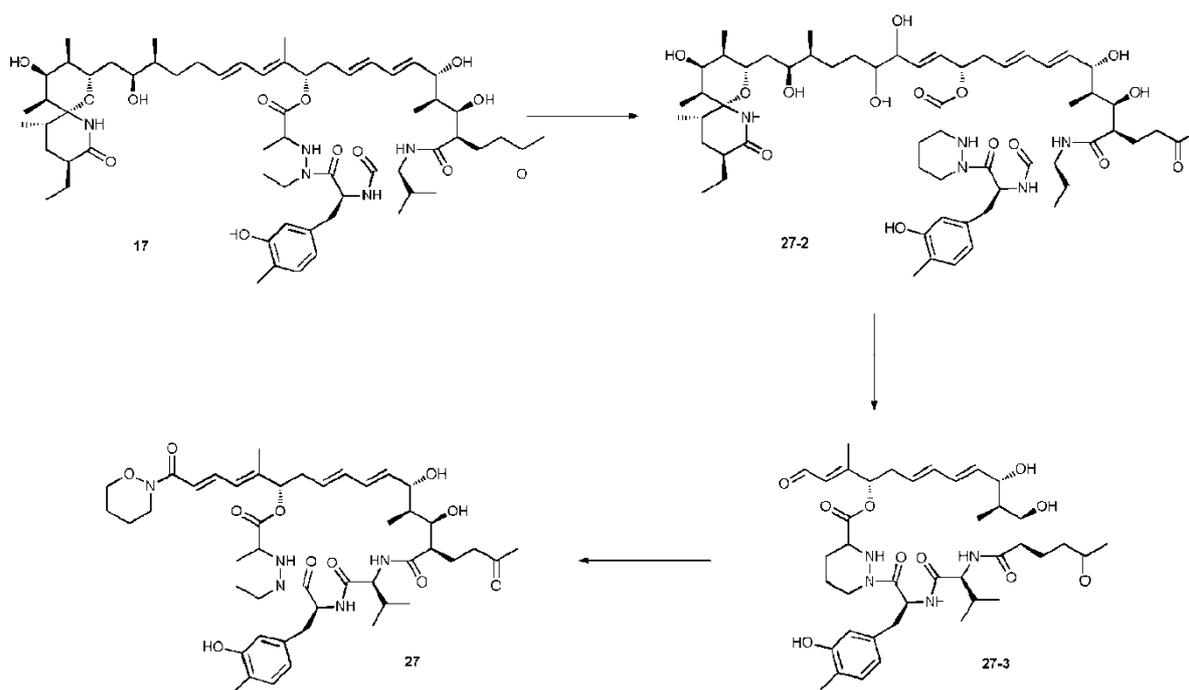
15 A una disolución de 22 (48 mg, 0,168 mmol) en THF (2,0 ml) se le añadió NaH (1,2 mg, 0,05 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 23-3 (30 mg, 0,042 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 25 como un sólido blanco.

20 *Ejemplo 16 - Preparación de compuesto 26*



25 A una disolución de 23 (13 mg, 0,015 mmol) disuelto en dioxano (1 ml) se le añadió disolución acuosa de HCl (2 M, 0,080 ml, 0,16 mmol). Se agitó la reacción a 20°C durante 24 h 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 preparativa para obtener 26 como un sólido blanco.

30 *Ejemplo 17 - Preparación de compuesto 27*

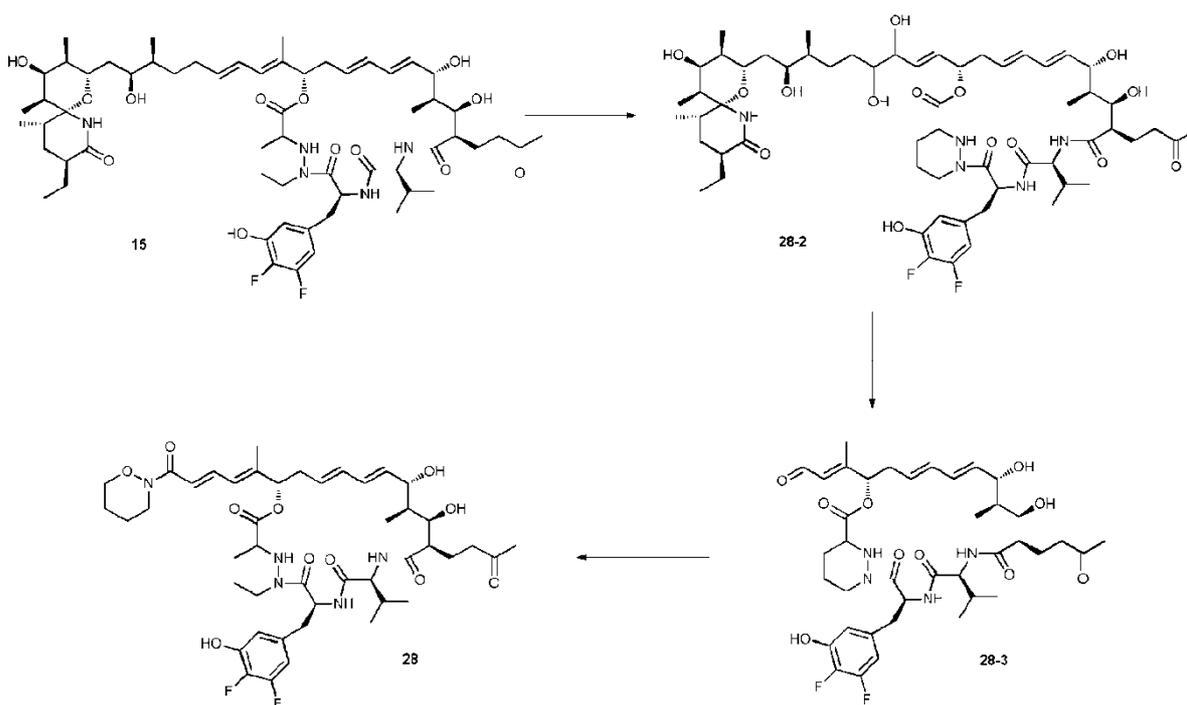


5 A una disolución con agitación de 17 (99 mg, 0,09 mmol), (DHQ)₂PHAL (4,2 mg, 0,0054 mmol), tetraóxido de osmio (0,034 ml, 0,0027 mmol) en alcohol terc-butílico (al 2,5% en peso, 0,079 mmol/ml) y metanosulfonamida (18 mg, 0,18 mmol) en 5 ml de alcohol terc-butílico se le añadió, a temperatura ambiente, una disolución de ferricianuro de potasio (90 mg, 0,27 mmol) y carbonato de potasio (37 mg, 0,27 mmol) en 5 ml de agua, dando como resultado una emulsión marrón. Tras 2 h se añadió una disolución de sulfito de sodio y se continuó la agitación durante 20 min. Se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para proporcionar 27-2 como un sólido blanco.

15 A una disolución con agitación de 27-2 (40 mg, 0,035 mmol) en 3 ml de una mezcla 2:1 de THF y agua se le añadió peryodato de sodio (15 mg, 0,07 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h, y después se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se extrajo esta mezcla con tres partes de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con una parte de agua y dos partes de salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para proporcionar 27-3 como un sólido blanco.

20 A una disolución de 21 (28 mg, 0,104 mmol) en THF (2,0 ml) se le añadió NaH (0,75 mg, 0,0312 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 27-3 (19,6 mg, 0,026 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 27 como un sólido blanco.

25 *Ejemplo 18 - Preparación de compuesto 28*

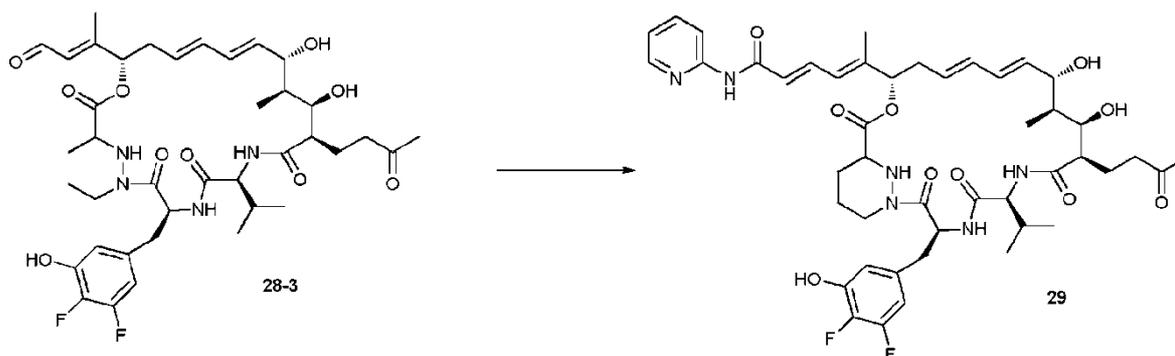


5 A una disolución con agitación de 15 (349 mg, 0,31 mmol), (DHQ)₂PHAL (14 mg, 0,0186 mmol), tetraóxido de osmio (0,117 ml, 0,0093 mmol) en alcohol terc-butílico (al 2,5% en peso, 0,079 mmol/ml) y metanosulfonamida (59 mg, 0,62 mmol) en 15 ml de alcohol terc-butílico se le añadió, a temperatura ambiente, una disolución de ferricianuro de potasio (128 mg, 0,93 mmol) y carbonato de potasio (306 mg, 0,93 mmol) en 15 ml de agua, dando como resultado una emulsión marrón. Tras 2 h se añadió una disolución de sulfito de sodio y se continuó la agitación durante 20 min. Se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo (3 x 50 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida, se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para proporcionar 28-2 como un sólido blanco.

15 A una disolución con agitación de 28-2 (170 mg, 0,1466 mmol) en 15 ml de una mezcla 2:1 de THF y agua se le añadió peryodato de sodio (62 mg, 0,2931 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 3 h, y después se añadió bicarbonato de sodio acuoso saturado. Se extrajo esta mezcla con tres partes de acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con una parte de agua y dos partes de salmuera saturada, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida de fase inversa para proporcionar 28-3 como un sólido blanco.

20 A una disolución de 21 (41 mg, 0,155 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (2,3 mg, 0,0575 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 28-3 (30 mg, 0,0387 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 28 como un sólido blanco.

25 *Ejemplo 19 - Preparación de compuesto 29*

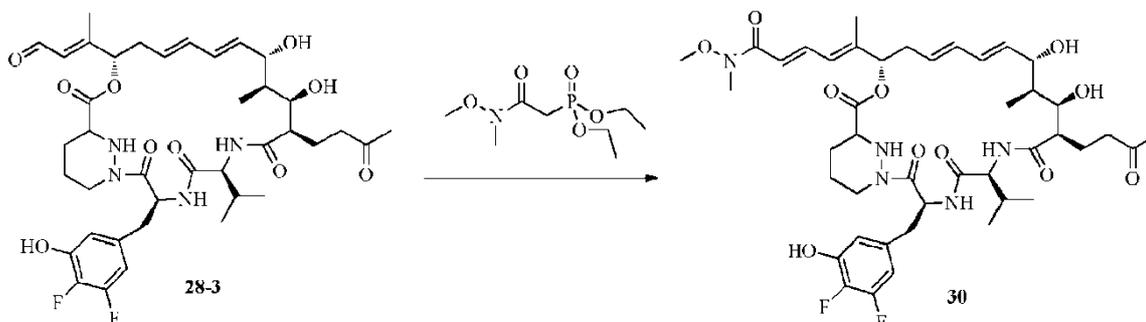


30 A una disolución de 22 (42 mg, 0,155 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (2,3 mg, 0,0575 mmol) en THF

anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 28-3 (30 mg, 0,0387 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 29 como un sólido blanco.

5

Ejemplo 20 - Preparación de compuesto 30



10

A una disolución de (2-(metoxi(metil)amino)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo (37 mg, 0,155 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (2,3 mg, 0,0575 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 28-3 (30 mg, 0,0387 mmol) a la disolución transparente y se agitó la mezcla a 20°C durante 2 h. Se extinguió la mezcla con agua (10 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 30 como un sólido blanco.

15

Ejemplo 21 - Datos biológicos - biodisponibilidad oral *in vivo*

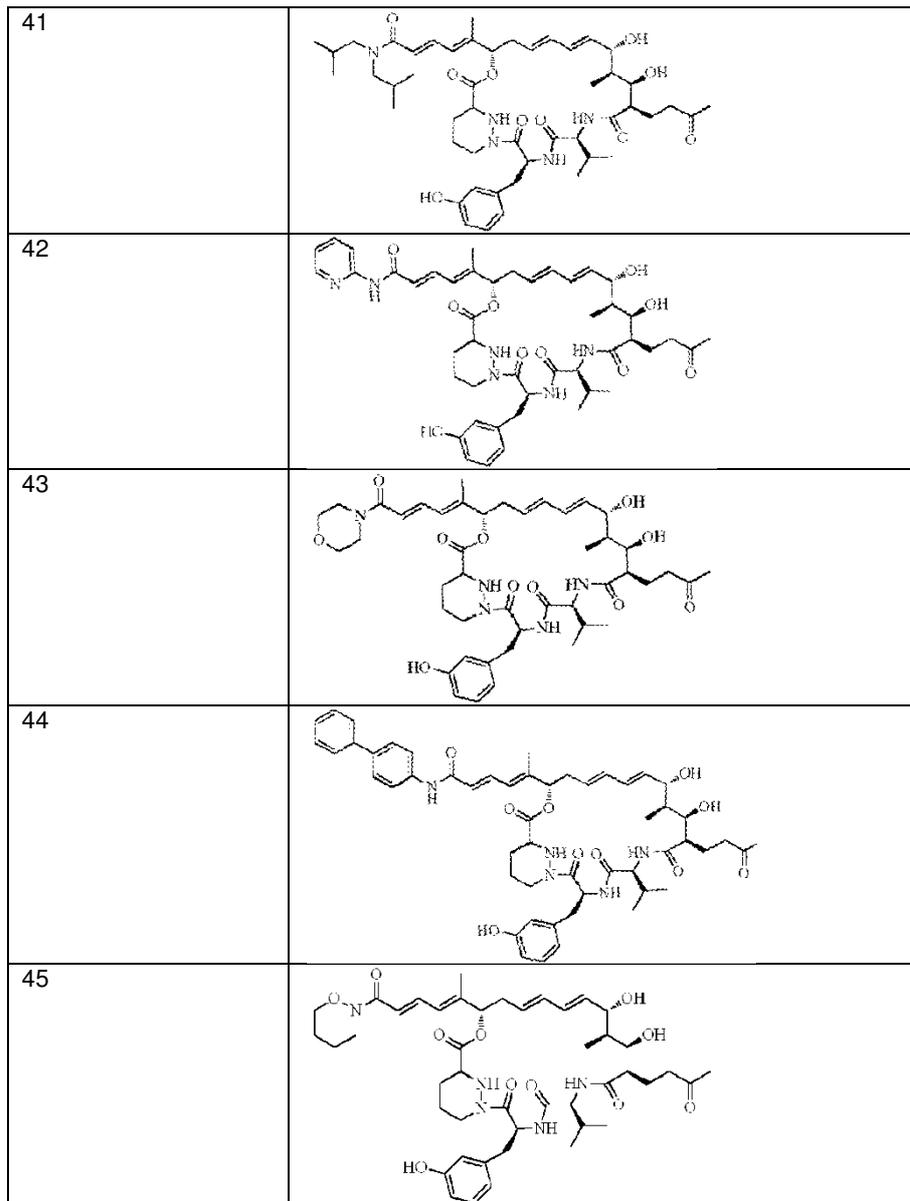
Para evaluar la farmacocinética de los compuestos en un entorno *in vivo*, se administraron dosis de compuestos v.o. a 10 ó 5 mg/kg e i.v. a 1 mg/kg a grupos de ratones CD1. Los compuestos sometidos a prueba se mencionaron anteriormente o se indican en la siguiente tabla:

25

Lista de compuestos sometidos a prueba que están publicados*

Número de compuesto	
31	
32	
33	

34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	



*véanse los documentos WO2011/098809, WO2011/098808 y WO2011/098805 para una divulgación y métodos de preparación, estos documentos se incorporan en su totalidad en el presente documento.

5 Se llevó a cabo el análisis farmacocinético tal como se describe en los métodos generales.

Compuesto	AUC _{última} tras dosis i.v. de 1 mg/kg	AUC _{última} tras dosis v.o. de 5 mg/kg	AUC _{última} tras dosis v.o. de 10 mg/kg	Biodisponibilidad oral F%
Ciclosporina A, 1	1010		8793	90,8
Sangliferina A, 5	16473		2839	1,4
Sangliferina B, 7	14067		5693	3,9
Sangliferina C, 31	1257		25	0,2
Sangliferina D, 32	2157		19,8	0,03
33	14333		2203	1,6
34	14033		800	0,1
35	813		11,3	0,1
36	4923		17,8	0,04
37	1218		4,76	0,04
38	5793		3090	5,5
39	1660		111	0,9
40	4910		3877	7,8

41	1943		453	2,4
42	11658		919	0,7
43	9801		8983	9,2
44	2497		0	0
45	15100		4837	3,2
23	22867	2760		2,4
24	45467	8223		3,6
26	5503	421		1,5

Tal como puede observarse, las sangliferinas tienen una baja biodisponibilidad oral, tal como se muestra mediante un valor de F% bajo.

5 *Ejemplo 22 - Datos biológicos - estabilidad in vitro en diferentes matrices*

Se analizó la estabilidad de compuestos en fluido gástrico simulado, pH 1,2 (SGF) y solución salina tamponada con fosfato, pH 7,3 (PBS). Véase la figura 1 para los perfiles de HPLC para incubaciones en PBS y SGF de 24. El tiempo de retención de 24 es de 11,1-11,3 minutos.

10

Compuesto	t _{1/2} en SGF (h)	SGF, % restante tras 1 hora	SGF + pepsina, % restante tras 1 hora	SGF + pepsina desnaturalizada, % restante tras 1 hora	t _{1/2} de PBS (h)	PBS, % restante tras 1 hora
CsA, 1	>24	100%	-	-	>24	-
SfA, 5	~1	52%	41%	49%	~3	76%
33	0,66	-	25%	-	>24	-
45	<0,33	13%	17%	15%	>24	100%
24	<0,33	18%	23%	30%	>24	100%

Tal como puede observarse, todas las sangliferinas son más estables en PBS que en SGF con o sin pepsina, mientras que el otro inhibidor de ciclofilina de una clase química diferente, ciclosporina A, es estable en todas las matrices sometidas a prueba. A partir de este experimento puede concluirse que las sangliferinas se degradan en condiciones ácidas (como modelo de ácido estomacal) pero son estables a pH neutro o alcalino.

15

Ejemplo 23 - Datos biológicos - generación de cápsulas con recubrimiento entérico y estudios de disolución.

Se pesaron aproximadamente 5 mg de 24 en cápsulas de gelatina de tamaño "3" que después se colocaron en una cápsula de gelatina de tamaño "0". Después se logró el recubrimiento de la mitad de las cápsulas sumergiendo individualmente cada cápsula en la disolución de recubrimiento (el 5% p/p de disolución de recubrimiento entérico Opadry, el 95% p/p de diclorometano:metanol 40:60) y dejándolas secar al aire ambiental durante al menos 6 horas o durante la noche. Se recubrieron las cápsulas sumergiendo en primer lugar el cuerpo de cápsula en la disolución y después dejándolo secar al aire colocándolo en un soporte de tal manera que el cuerpo estaba dirigido hacia arriba y la tapa en contacto con el soporte. Una vez seca, entonces se sumergió la tapa de cápsula en la disolución de recubrimiento y se secó de la misma manera que la descrita anteriormente con el cuerpo en contacto con el soporte. Tras recubrir tanto el cuerpo como la tapa de la cápsula, esto se consideró 1 ciclo de recubrimiento. Tras un secado suficiente, se midieron los pesos de las cápsulas y se compararon con los valores iniciales. Se repitió este procedimiento varias veces hasta que se logró el aumento de peso deseado (11 mg) para la cápsula.

20

25

30

Después se llevaron a cabo estudios de disolución en medios ácido (pH1,0) y de tampón a pH 6,8 de la siguiente manera:

Etapa ácida: se colocaron 750 ml de HCl 0,1 M en un recipiente de 1 l y se ensambló el aparato. Se dejó equilibrarse el medio hasta una temperatura de 37 ± 0,5°C. Se colocó una cápsula (con recubrimiento o sin recubrimiento) en el aparato, se cubrió el recipiente y se agitó con paletas la mezcla a 50 rpm. Se extrajo una alícuota del líquido a T=0, tras 30 minutos (T=30 min) y tras 60 minutos (T=60 min) de funcionamiento en HCl 0,1 M y se procedió inmediatamente tal como se indica en la etapa de tampón. Se realiza un análisis de la alícuota usando un método de ensayo adecuado.

35

40

Etapa de tampón: Inmediatamente tras completarse la etapa ácida, se añadieron 250 ml de una disolución 0,2 M de fosfato de trisodio dodecahidratado (con Tween 80 al 2%) equilibrada hasta 37 ± 0,5°C. Esto se ajustó según fue necesario con HCl 2 N o NaOH 2 M a un pH de 6,8 ± 0,05 en el plazo de 5 minutos. Después se continuó el estudio durante 90 minutos adicionales, agitando la mezcla con paletas a 75 rpm, extrayéndose alícuotas del líquido a T=0, 15, 30, 45, 60 y 90 min.

45

Usando los métodos descritos anteriormente, se compararon cápsulas con recubrimiento entérico con cápsulas sin recubrimiento, y se analizaron las alícuotas extraídas mediante HPLC para determinar los niveles de 24.

La figura 2 y la siguiente tabla muestran los resultados del estudio. Las cápsulas sin recubrimiento se disolvieron completamente tras aproximadamente 5 minutos en el medio ácido, mientras que las cápsulas recubiertas todavía permanecían intactas tras 1 hora. Esta observación se respaldó por los resultados de HPLC que mostraron que a los 60 minutos no se detectó ninguna liberación de 24 para las cápsulas recubiertas. Dado que las cápsulas sin recubrimiento se habían disuelto completamente tras 5 minutos en el medio ácido permitiendo que 24 se dispersara completamente en el medio, la liberación de 24 a partir de estas cápsulas debe ser mucho mayor a los 60 minutos. Este valor bajo de liberación se debía lo más probablemente a la degradación de 24 en el medio ácido. Esta hipótesis está respaldada por los valores de liberación en porcentaje tras 90 minutos en el medio básico que mostraron que sólo se detectó una liberación de aproximadamente el 12% de 24 para las cápsulas sin recubrimiento en comparación con una liberación de aproximadamente el 63% para las cápsulas recubiertas. Esto sugiere que una cantidad sustancial de 24 procedente de las cápsulas sin recubrimiento se había degradado en el medio ácido antes de la etapa básica. Tras el cambio al medio básico, las cápsulas recubiertas se disolvieron completamente en 5 minutos permitiendo que 24 se dispersara totalmente en el medio. La liberación del API aumentó gradualmente y al final del estudio (90 min en el medio básico) el porcentaje de liberación era de aproximadamente el 63%.

Tiempo (min)	Cápsulas con recubrimiento entérico		Cápsulas sin recubrimiento		pH
	24 en disolución (n=3) (% de la cantidad dosificada)	Desv. est.	24 en disolución (n=3) (%de la cantidad dosificada)	Desv. est.	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0
30	0,0	0,0	4,6	1,1	1,0
60	0,0	0,0	7,3	2,1	1,0
75	5,0	3,3	12,0	3,7	6,8
90	17,2	7,1	9,5	4,7	6,8
105	30,3	6,2	11,8	3,1	6,8
120	41,2	6,1	17,7	4,1	6,8
150	63,2	4,9	12,2	0,9	6,8

Estos datos respaldan la hipótesis de que las cápsulas con recubrimiento entérico aumentan la cantidad de sangliferina disponible en el compartimento intestinal, y por tanto pueden mejorar la biodisponibilidad oral y/o reducir la variabilidad de análogos de sangliferina cuando se administran en dosis a pacientes.

Ejemplo 24 - Datos biológicos – comparación de la farmacocinética in vivo en perros o pacientes humanos tras la administración de dosis orales de comprimidos con recubrimiento entérico y sin recubrimiento entérico

Se llena 24 en comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico y sin recubrimiento entérico, opcionalmente con excipientes para ayudar a la solubilidad y/o permeabilidad intestinal. Después se administran dosis de 2 mg/kg de 24 en cada forma (con recubrimiento entérico y sin recubrimiento entérico) a grupos de 3 pacientes humanos o perros Beagle sometidos a exposición previa dentro de un entorno de ensayo clínico regulado. Se extraen muestras de sangre tras 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 horas, y se calcula la concentración de 24 en sangre completa mediante CL-EM/EM usando hidroximacrociclo como patrón interno. Después se calcula el AUC_{última} para cada comprimido. Se espera que la biodisponibilidad oral sea superior en el grupo al que se le administran dosis de comprimidos con recubrimiento entérico y/o se espera que la variabilidad entre animales/pacientes sea menor en el grupo al que se le administran dosis de comprimidos con recubrimiento entérico.

Bibliografía

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

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

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

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

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

Dolinski, K., S. Muir, *et al.* (1997). "All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 13093-8.

- E. Lawitz, R. R., T. Nguyen, M. Huang, J. Ke, J. Praestgaard, D. Serra, M. Koziel, T. Evans (2009). "Safety And Antiviral Efficacy Of 14 Days Of The Cyclophilin Inhibitor Nim811 In Combination With Pegylated Interferon .2a In Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S379.
- 5 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.
- 10 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 (Tokyo)* 52(5): 474-9.
- 15 Flisiak, R., A. Horban, *et al.* (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus." *Hematology* 47(3): 817-26.
- Furniss, B. S., Furniss, A.I., Vogel, A.I., Ed. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- Gregory, M.A., Bobardt, M., *et al.* (2011) "Preclinical Characterization of Naturally Occurring Polyketide Cyclophilin Inhibitors from the Sanglifehrin Family" *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(5)1975-1981.
- 35 Hanouille, X., Badillo A, Wieruszkeski JM, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G (2009). "Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase activity of Cyclophilins A and B." *J Biol Chem.*
- 40 Hartel, C., P. Iblher, *et al.* (2006). "Immunosuppressive activity of the immunophilin-binding drug Sanglifehrin A in human whole blood: potent inhibition of interleukin-6 produced by lymphocytes and monocytes." *Scand J Immunol* 63(1): 26-34.
- Herrler, M., H. Bang, *et al.* (1994). "Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene which encodes a cyclosporin A-sensitive peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." *Mol Microbiol* 11(6): 1073-83.
- 45 Hite, M., Turner, S., Federici, C. (2003). "Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs". *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer*. Summer 2003 issue.
- 50 Immecke, S.N., Baal, N, *et al.* (2011). "The Cyclophilin-Binding Agent Sanglifehrin A Is a Dendritic Cell Chemokine and Migration Inhibitor." *PLOS one* 6(3):e18406.
- Inoue, K., K. Sekiyama, *et al.* (2003). "Combined interferon alpha2b and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial." *J Gastroenterol* 38(6): 567-72.
- 55 Inoue, K., T. Umehara, *et al.* (2007). "Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus-infected chimeric mice *in vivo*." *Hepatology* 45(4): 921-8.
- Ishii, N., K. Watashi, *et al.* (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication." *J Virol* 80(9): 4510-20.
- 60 Ke, J., E. L., R. Rozier, T. Marbury, N. Nguyen, D. Serra, K. Dole, J. Praestgaard, M. Huang, T. Evans (2009). "Safety, And Tolerability Of Nim811, A Novel Cyclophilin Inhibitor For Hcv, Following Single And Multiple Ascending Doses In Healthy Volunteers And Hcv-Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S229.
- 65 Jacobson, I., McHutchison, JG, Sulkowski, M. (2007). *Gastroenterol & Hepatol* 3(S34): 1-10.
- Kallen, J., R. Sedrani, *et al.* (2005). "Structure of human cyclophilin A in complex with the novel immunosuppressant

- sanglifehrin A at 1.6 Å resolution." *J Biol Chem* 280(23): 21965-71.
- Kawasaki, H., E. S. Mocarski, *et al.* (2007). "Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus infection via a cyclophilin-independent pathway specifically in neural stem/progenitor cells." *J Virol* 81(17): 9013-23.
- 5 Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz and M. F. Fromm (2010), *Drug Metab Dispos*, 39, 1097-1102.
- 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.
- 10 Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbach, *et al.* (1999). "Macrolide Analogues of the Novel Immunosuppressant Sanglifehrin: New Application of the Ring-Closing Metathesis Reaction." *Angew Chem Int Ed Engl* 38(16): 2443-2446.
- 15 Mathy, J. E., S. Ma, *et al.* (2008). "Combinations of cyclophilin inhibitor NIM811 with hepatitis C Virus NS3-4A Protease or NS5B polymerase inhibitors enhance antiviral activity and suppress the emergence of resistance." *Antimicrob Agents Chemother* 52(9): 3267-75.
- Melnikova, I. (2008). "Hepatitis C therapies." *Nature Rev Drug Disc* 7: 799-800.
- 20 Metternich, R., Denni, D., Thai, B, Sedrani, R. (1999). "Toward a Total Synthesis of the Immunosuppressant Sanglifehrin A. Preparation of Two Relay Compounds by Degradation and Their Use in the Reassembly of the Natural Product." *J. Org. Chem.* 64: 9632-9639.
- 25 Millay, D. P., M. A. Sargent, *et al.* (2008). "Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy." *Nat Med* 14(4): 442-7.
- Moss, S. *et al.*, "Sangamides, a new class of cyclophilin-inhibiting host-targeted antivirals for treatment of HCV infection." *Med. Chem. Commun.*, DOI:10.1039/C1 MD00227A.
- 30 Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D., and P. Groscurin, Porchet, H., Crabbe, R. (2009). "Efficacy And Safety Of The Cyclophilin Inhibitor Debio 025 In Combination With Pegylated Interferon Alpha-2a And Ribavirin In Previously Null-Responder Genotype 1 Hcv Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S40.
- 35 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.
- 40 Paeshuyse, J., A. Kaul, *et al.* (2006). "The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication *in vitro*." *Hepatology* 43(4): 761-70.
- Parfieniuk, A., J. Jaroszewicz, *et al.* (2007). "Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus." *World J Gastroenterol* 13(43): 5673-81.
- 45 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.
- Pawlotsky, J. M. (2006). "Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets." *J Hepatol* 44(1 Suppl): S10-3.
- 50 Pemberton, T. J. and J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A." *FEBS Lett* 555(2): 335-40.
- Pockros, P. (2008). "Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus." *Gastroenterol and Hepatology* 4(10): 729-734.
- 55 Ptak, R. G., P. A. Gallay, *et al.* (2008). "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent." *Antimicrob Agents Chemother* 52(4): 1302-17.
- 60 Qu, X., Jiang, N. *et al.*, (2011). "Cloning, sequencing and characterization of the biosynthetic gene cluster of sanglifehrin A, a potent cyclophilin inhibitor." *Mol. Biosyst.* 7:852-861.
- 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.
- 65 Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y. and Ribeill

(2009). "Safety, plasma pharmacokinetics, and anti-viral activity of SCY-635 in adult patients with chronic hepatitis C virus infection." *Journal of Hepatology* 50(S1): S36.

5 Sanglier, J. J., V. Quesniaux, *et al.* (1999). "Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activity." *J Antibiot (Tokyo)* 52(5): 466-73.

Schneider, M. D. (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." *Sci STKE* 2005(287): pe26.

10 Sedrani, R., J. Kallen, *et al.* (2003). "Sanglifehrin-cyclophilin interaction: degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data." *J Am Chem Soc* 125(13): 3849-59.

Seden, K. D. Back and S. Khoo (2010), *J Antimicrob Chemother*, 65, 1079-1085.

15 Smith, M. B. a. M., J. , Ed. (2001). *March's advanced organic chemistry*, John Wiley and Sons Inc., UK.

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.

20 Strader, D. B., T. Wright, *et al.* (2004). "Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C." *Hepatology* 39(4): 1147-71.

Tropschug, M., I. B. Barthelmess, *et al.* (1989). "Sensitivity to cyclosporin A is mediated by cyclophilin in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*." *Nature* 342(6252): 953-5.

25 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.

Wring, S., C. Wille, C. Rewerts, R. Randolph, A. Scribner and S. Hopkins (2010), *Journal of Hepatology*, 52, S263.

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. and E. Herrmann (2002). "Dynamics of hepatitis C virus infection." *Ann Hepatol* 1(2): 56-63.

40 Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." *J Immunol* 166(9): 5611-8.

45 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las siguientes reivindicaciones, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y sus variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros mencionado pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Lista de secuencias

50 <110> NeuroVive Pharmaceutical AB
Gregory, Matthew Alan
Moss, Steven, James

<120> FORMA DE DOSIFICACIÓN NOVEDOSA

55 <130> P012160PCTEP1

<150> Documento GB1118334.0
<151> 24-10-2012

60 <160> 3

<170> Patentin versión 3.3

65 <210> 1
<211> 77
<212> ADN

ES 2 639 918 T3

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
5	<400> 1		
	cgctctgtgg cgcttggtt ccaagcggct cgcggaccgg caccggcaca tgcataatta	60	
	accctcacta aagggcg	77	
10	<210> 2		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Cebador		
15	<400> 2		
	tggatgtatc gtgcgaggac gcccagaatt cacctgcgac gtcctccaga tgcattaata	60	
	cgactcacta tagggctc	78	
20	<210> 3		
	<211> 46596		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
25	<223> Cósmido		
	<400> 3		
	acaccggcca caccggcggc ggcttgcgtg tgcccgatgt tggacttcac cgaaccgagc	60	
	cacagcggct cgtcccgtc ctgcccgtag gtggcgagca ggcctgcgc ctcgatcggg	120	
	tcgcccagcc gcgtgccgt accgtgcgcc tccaccgct ccacgtccgc gggcgtgagc	180	
	ccggcaccgg agagcgctg acggatcacc cgctgctgcg aaggaccgtt cggggccgtc	240	
	agaccgttcg acgcgccgtc ctggttgatc gcggtgccgc gtacgacggc cagtacctgg	300	

ES 2 639 918 T3

tggccgtggc ggcgggcgtc ggagagccgt tccacgagga gcatgccggc gccctcggac 360
 cagccgggtgc cgtcggccgc ggcggcgaag gacttgcagc ggccgtccac ggccaggccg 420
 cgctggcggg agaagtcgac gaagacgtcg ggggcggaca tgacggtgac accgccggcc 480
 agcgccatcg agcactcgcc gctgcgcagc gcctggatcg cccagtgcag ggcgaccagc 540
 gacgccgagc acgcgggtgc cacggtgacc gcagggcctt ccaggccgag gacgtaggcg 600
 atgcggccccg acagcacgct ggcggagttg ccgatgccga cgtagccctc cgcgctctcg 660
 acggtcctgc gcacgagctg ggcatagtcc tggccgttgg tgccgaggtg gacgccgacg 720
 tccgcgccgc gcagggactt cgggtcgatg ccggcgcggt cgacggcctc ccaggcggtc 780
 tccagggccca gccgctgctg cgggtccatc gccagcgcct cgcgcggcga gatcccgaag 840
 aagtccgcgt cgaacccggc gacgtccgcg aggaagccgc cctcccgcac gtacgacgtg 900
 cccgcgtgct ccgatccgg gtggaagagg cccgcgaggt cccagccccg gtcgtcgggg 960
 aacggggtga gcgcgtcgcg ctcgtcggcg agcagccgcc acaggtcctc gggcgaggtc 1020
 acgccgccgg ggtaccggca cgccatgccg acgatcgcga tgggatcgtc gtcggcgggg 1080
 cgggcgacgg cgggcaccgg cgccgtctcc tcggcgcggt cgccgaggag ttcggccagc 1140
 aggtggccgg ccagggagcg cgggttgggg tggtcgaaca cgagggtcgc gggcaggcgc 1200
 agccccgtgg cggcggacag ccggttgcgg agttcgacgg cggtcagcga gtcgaagccc 1260
 agttccttga acgccccgcc gggggtcacg gcggtgtcgt cgggtgtggc gaggaccacg 1320
 gcggcgtgcg agcggacgag cgtgagcagg gtccgttcgc gttccgcggc ggtgagtccg 1380
 gtgagctttc cggccagggt gtccggtccg gcgcccgcgg tggcggcgcg ccggacgggg 1440
 ccacggacca gccggcgcac cagcgcgggt acggcgggtg cggcgggtggc gaacgaggtg 1500
 aggtccagcc aggcggggac gacgacgggg gcggagccgg cggtggcgcg gtcgaacagg 1560
 gcgagcgcgt cgggcgtcgg cagcggcacc acgcccgcgc gggccgcgcg ccgcaggtcg 1620
 gcgcccacca ggtggccggt catgccgctg gcgtgcgccc acaggcccca cacctgggag 1680
 gtggcgggca ggccctgggc gcggcgggtg gccgcgagcg cgtccacgaa ggcggtgccc 1740
 gccgcgtagt tgccctgtcc gggcgccccc aagaggccgg aggtggagga gaacagcacg 1800
 aagacggccg gccggtgcgg ggcggtgagt tcgtgcaggt tccaggcggc gtcgacctg 1860
 gggcggagca ccttggcgag ccgctcgggg gtctgggagg cgatgacgcc gtcgtccagg 1920
 acgccggcgg cgtggacgac tccggtcagg ggggtgctcgg cggtgatccg gtcgagcagg 1980
 gcggccagtt cgggtcggtc ggcggcgtcg caggcggcga cggtcacctc ggcgccgagg 2040
 gcgcgcagtt cgccggcgag ggtcacggcg tcgggggccc cgtcgcgcgc ccgtccggcc 2100
 aggaccagcc ggcgtacgcc gtgctcgggtg accagggtggc gggcgcagag ggcgccgagc 2160

ES 2 639 918 T3

gtgccggtgc cgccggtgac gaggacgacg ccgtcggacg gccacagggc cgcctggctc 2220
 gtgggctcgt cgggtgcgcg ggcgcgacc agccggggtg cgaggaccg gccggagcgc 2280
 acggcgatct cgggttcgcc ggtggcgagg acagcgggca gctggtgcag tgcgtcgggg 2340
 ccgtcgatgt cgaccagcac cagcctgccg ggggtgttcgg cgcgggcgga gcggatcagg 2400
 cccacacagg gcgctgggc gaggtcggtg acgtcctcgt gctcgaccgg gaccgcgccg 2460
 tgggtgagga cggccagacg ggtgccggcc agtcgctcgt cggcgagcca ctctgaaga 2520
 gcggtcagca cgcgccgggc gccggcgtgg gccgcgccgg cgggtgctgc ggccgactgc 2580
 tgccgacacg gcagcacgag ggtgccgggc acggtgtcca gggcggcgac ggcggcgagg 2640
 tcggggcagg aggggtatcc gggcagcggg aggccgccga gcacggcgat gccgtcgacg 2700
 tcggcccgcg gcagcggcac gggcgtccac tcgaccgggt acagctcgtg gtcgcgccg 2760
 gggccggccg tggccggcg gcgcagggtc accgcgtcga cggtgagcac ggcggctccg 2820
 ctgtcgtcgg tggcgtgcag ggtgaccgtg tgctcgcccg cggggtgcag gcgtaccgc 2880
 agccgggtgg cgccacggc gtgcagggtg acgccgtgcc aggcgcggg gaccaggccg 2940
 ggggtgtacg ccgcgagggc gtcggtgagc agggcggggt gtacgcccc ggcgcggcg 3000
 gtctcgtcgg tcagctcaac ggtcacgtcg gtcagctcga cggtcacgtc ggtgtccggg 3060
 tcccctggcg cggcggccgg ggcggtgccg gtgtgcggga ggaggacgcc ggtcgcgtgc 3120
 cgggtccagg gctggtcgtc gtcggcgtcg gcggggcggg agtggacggc gaccgggcgg 3180
 gcgccgtcct cgttctccgc gccaggggtg acctggaggc ggcgggcttc gccgacggtg 3240
 tcgagcggtg cctcctcggc cagttcgccg agcgtcctgc cgtcggccgc gtcagggcc 3300
 aggtcgagta cggcgccggc cggcagctcg gtgccggccg gcacgcgcc ggtgaacacc 3360
 tgtccgccgg atccggcgag cggggtgacg gcgccgagca gcgggtgcc ggcgcggtc 3420
 aggccaggc cggcggcgtc ggaggcacc gggccgctgg gccagaagcg gcggcgctgg 3480
 aaggcgtagg tgggcaggtc gacgtggcgt ccgtcggggc agcccaccgt ccagtcgacg 3540
 gacacgccgt ggacggcggc ctccggcagc gaggtgagga ggcggcgcg gccgtcctcg 3600
 tcgcgccgga gggtgccgac gacgacggcg gtccgctcgg tggcctccgc cgtctcctgc 3660
 acggcgcccg tcagcaccgg gtgcgggctg atctccacga acacggcgtg gccggagtcg 3720
 agcaggccgc gcaccacggg ctcaaccgt acgggctccc gcaggttgcg gtaccagtag 3780
 ccggcgtcga gccgtgtctc gccgaggggg ccgccagca gggtgagtg gaaggcgatg 3840
 ccggcctcac cgggccgag ttccggcagc gcggcgcgca actcggcttc gagggactcg 3900
 acatgggccc agtgggaggc gtagtcgacc gcgatgcggc gcagtcgtac ccgtcggcc 3960
 gaccaggcgg ccatcacctc gtccagcga tcggggctgc cgtgaggac caccgacgac 4020
 gggccggtga gggcggcgac gcaaaccgct ccggaccacg gtgcgagccg ccgtgtgacg 4080

ES 2 639 918 T3

gtggcctcgg gcagggcgac ggagaccatg ccgccgcgcc cggccagccg ctcggggatg 4140
 agccgcgacc gcagggcgac gatccggggc ccgtccgcc a ggcacagcac acccgccaca 4200
 caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac 4260
 gaacgccaca cctccgcaa cgacaccatc accgcccaca acaccggctg aacgacatcc 4320
 acccgctcca acgccaccgg atcaccacag acaccacgca acgaccagcc cacgaacggc 4380
 tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga 4440
 tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc tgaccgggga acacgaacac caccggcccc 4500
 tcaccggca acccggaac acccgacacc acaccctcca ccggctcccc cgcggccaac 4560
 gccgccagag aagcccgcgc accggccaca tcagcggcca ccaccaccgc acgatgcggc 4620
 aacaacgccc gcgacgcggc aaggaccag gagaggtcca ccgggtccag gccgggggtg 4680
 gtgtcgaggt gggcggcgag ccgggtggcc tgctcggcga gggcggcctg ggagcggcg 4740
 gagagcagcc acggcaccca gcgcggcgcg gcgccgcgcg cgggcgcggc cggttccgcc 4800
 gggcctcct ccaggatgag gtgggcgttg gtgccgctgg cccgaacga cgacacgccc 4860
 gcgcggcgcg gccggtcggc cgggggcccag acggcggcgc cggtgacgag ttcgacggag 4920
 ccggaggccc agtcgatgtg cggtgagggg gcgtccacgt gcaggggtgc gggcacttcg 4980
 ccggcgcgca gcgcgagcac cgtcttgatc acgccggcca cccccccgc ggggccggtg 5040
 tggccgatgt tggacttcag cgagcccagc cgcagcggct gtgcgcggtc ctggccgtag 5100
 gtggccagca gggcgttggc ctcgatgggg tcgccgaggg tggtgccggc gccgtgtgcc 5160
 tccacgacgt cgacgtcggc ggccggtgagg ccggcggcgg ccagcgcgga gcggatgacc 5220
 cgctgctggg cggagccgtt gggggcggtg agcccggagg aggcgcctc ctggttgatc 5280
 gccgagccgc ggaccacggc cagcacgggg tggccgttgc ggccggcgtc ggacagccgc 5340
 tccagcacga ccacgcccgc gccctcggac cagccgatgc cgtccgcggc ggcggcgaac 5400
 gccttgacg ggcctcggg ggccgagccg cgtgcgggg agaactccac gaaggcacgc 5460
 ggggtcgaca tgaccatcac gccgccggcg agggccagcg agcattcgc gctgcgcagg 5520
 gactggccgg ccaggtgcag ggcgacgagc gaggacgagc aggcgggtgc cacgctgacg 5580
 gccgggcctt ccaggccgag ggtgtaggcc acccgccgg agagcacgct ggcgtagttc 5640
 ccggtgccga gcagcccctc gtccacgcc gcgaccgcgc cgtgccgtga gtcgtagcgc 5700
 tggtcgggtga cgcgccgaa gacgccggtg gcgctgccgc gcaggccgtg cggatcgacg 5760
 ccggcgtgct cgaacgcctc ccaggcgact tcgaggaaca gccgctgctg cgggtccatc 5820
 gccagcgcct cgcgcgggct gatgccgaag aagtcggcgt cgaagccggc ggcgtcgttc 5880
 aggaagccgc cctggcgag gtaggtgtgt ccggcccggc ccgggtcggg gtcgtagagg 5940

ES 2 639 918 T3

ccgtcgaggt cccagccgcg gtcggcgggg aagtcgccga tgacgtcacg gccttcggcg 6000
 aggagctgcc acaggtcgtc gggcgaggcc actccgccgg ggaagcggca ggccatgccg 6060
 accacggcca gcggctcgtc ggccgggggtg gcgcggacgg cggggcgggc cgggacgggc 6120
 gcgccgtcga gccgggtgag cagatggtcg gtgagggcgg ccgggttcgg gtggtcgaag 6180
 acgacgtgc tggccagcgt caggccggtc gcctcggcca gcgcggtgcg cagccgcagg 6240
 gaggcgaggg agtcgaagcc gagggcggcg aaaccgcggt gcggttcgat cgcggcgggg 6300
 tcggcgtggc cgagcacggc ggcggtccgc agccgtacca ggtccatgac gcggtgccgg 6360
 cgttcggcgg gggtcagccc ggccagctcg tcgcgccagg gcgtgccctc gtcggcggtc 6420
 cgctgcgcgg ggagcgcgac gggggtggcg gccgggggca gcgggcgggc cgctgcgtcc 6480
 acgggcggcc agtaccggtc gcgctggaag gcgtacgtcg gcaggtcggc cgggtgggct 6540
 ccggtgcccc ggaagaaggc ggtccagtcg atgcgcacgc cgtgcgtgtg cgcctcggcc 6600
 aggttggtca gcagggtcgg caggccggcc cggtcgcgct ggagggtgcc gacgaccgcg 6660
 gctccggtct ccgtgcgctc gacggtctcc tgggtgccga cggtcagtac ggggtgcgga 6720
 ctgacctcga tgaagccccg gtggccctgg gcgagcaggg cggcgacggc gtcggcgtag 6780
 cggacggggt cgcgcagggt gcggtaccag tagccggcgt ccagcgcctg gccgtccgcc 6840
 cactcccccg tcacggtgga gaacagcggc accgtgccct caccggcccg caccgctcc 6900
 agatcagcca gcagagcctc acgcaccggc tccaccagca ccgaatgcga ggcatagtcg 6960
 acagcgatac gccggggccc cccccccga cccccgcaat gagccaggaa ctccctccagc 7020
 gccaccccct caccgcgac gacgaccgac tcaggaccgt tgaccgcagc caccgccaac 7080
 cggcccggcc agcccaccaa cagctcctcg acaccggacg gcccggcagc gaccgacacc 7140
 atccccccac tgcccgcag cgccgtcaa gccctgctgc gcagggcgac gaccggggcg 7200
 ccgtccgcca gcgacaacac acccgccaca caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga 7260
 ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac gaacgcaca cctccgcaa cgacaccatc 7320
 accgcccaca acaccggctg aacgacatcc acccgctcca acgccaccgg atcacccagc 7380
 acaccacgca acgaccagcc cacgaacggc tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc 7440
 cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc 7500
 tgaccgggga acacgaagac ggcgcggccc tcgccgacgg cgcggccgcg caccacgtcg 7560
 gccgactcgg cgccttcgc cagggcggtc aggcggcga gcaggggtgc gtggtccgcg 7620
 ccgaggacga ccacgcggtg ttcgaaggcc gtacgggtgg tggcgagggc gagggccacg 7680
 tcgtgggggg cggcgtcgtg cgcgggccgg tgggcgagga ggcgttcggc ctgggcgcgc 7740
 agtccggccg ccgtccggga ggacagcgtc cacgggacga ccggcagggg gcggtccgtg 7800
 gcctcgtcgg tgggctcggg ccgggcgggt gcctgctcca ggatggcgtg ggcgttgggtg 7860

ES 2 639 918 T3

ccggacacgc cgaacgacga cacgcccgcg cggcgcggct gctccccgcc cggccagtcc 7920
 cgctcctcgg tgagcagttc cacggcgccg gcgggtccagt cgacgtgagg tgacgcctcg 7980
 tccacgtgga gcgtgcgagg cagcgtgccg tggcgcattg cctgcacat cttgatcaca 8040
 ccggccacac cggcggcggc ctgcgtgtgc ccgatgttg acttcaccga accgagccac 8100
 agcggctcgt cccgctcctg gccgtagggt gcgaggagg cctgcgcctc gatcgggtcg 8160
 cccagccggg tgcccgtacc gtgcgcctcc acggcgtcga cctggctcgc ggccaggcgg 8220
 gcgtcggcca gcgcctggcg gatcacgcgc tgctgggcga gtccgttggg ggcggtgagt 8280
 ccgctgctcg ccccgtcctg gttgatggcg gtgccgcgga ccacggccag cacgggggtg 8340
 ccggtgaggc gggcgtccga gagccgttcc aggacgagca tgcccgcgcc ctgggcgaag 8400
 ccgaacccgt cggccgcccg ggcgaaacgc ttgcagcggc cgtcggccgc gagggcccgc 8460
 tgccggctgt actcgtgtaa cacgcccggc gtggacagca cggtcgcccc gccggtgagc 8520
 gccagcgtgc actccccggc gcgcagcag cggaccgcga ggtgcagggc gaccagggac 8580
 gaggagcagg cgggtgtccac ggagagggcg gggccctcca ggccgagggt gtaggcgacc 8640
 cggccggaga gcacgctggg cgaggtgccg gtgacgacgt acccctccag ctgggtggcc 8700
 accgggcccg tgatgtcggg gtagtcctcg ctgctgaagc cgacgaacac gccggtggcg 8760
 gtggagcgcg gcccgggccg gtcgatgcca gcccgtcca gggcctcca tgaggtctcc 8820
 agcaccagcc gctgctgagg gtccatggcc agcgcctcgc gcgggctgat gccgaagaag 8880
 ccggcgtcga agtccgcggc gccgtcagg aatccgcctt cgcgggcgta ggaggttccg 8940
 ggccggtcgg ggtccgggtc gtagaccgag gccatgtccc agccgcggtc ggcggggaac 9000
 gccgagaccg cgtcgtccc atcgttcacc agccgccaca ggtcctcggg cgaggtcacg 9060
 ccgccggggg agcggcaggc catgcccacg atcgcgatcg gttcgcggtc gcgggcctcg 9120
 gcctcgcgca gccggcgccg ggcgacctgg agatgcccc tgacctgctt gaggtagtcg 9180
 agcagtttg cctcgtcagc catcgtgca cccccgtcgc gttcgttcgg cgcgggtcac 9240
 gagacgcccc ggtcgtatcag gtcgaagagt tcgtcggcgg tgacgccgtc cagagcggcc 9300
 cgctcgggtg tgccgtcggc cgtgccggcg tcccagcggg ccgcgaggtc ccgcaggtgc 9360
 gccgccacc gccgcgggtc ggtgccgtcg gccggcagtg cgcgagcgc gctctccacg 9420
 cgggccaagt cggcgtatgat ccggtcggcg ctgcctcgc cggactcgtc cggcaggagc 9480
 gcgtcagagg ggtggtcggc gagcgcggcc gggttcgggt ggtcgaacac gatggtggtg 9540
 ggcagtcgca ggccggtggc ggtgccgagg cggttgcgca gttccacggc ggtcagcag 9600
 tcgaagccca gttcctttaa gccgcggtcg ggtgccaccg cgtcgcgtcc ccggtgtccc 9660
 aggacgtcgg cgacctggcc gcggacgag tcgagcaggg cgggggcgcg ctggggcgcg 9720

ES 2 639 918 T3

ggcagcccgg tgatccgcgc caccagggcc gccgcaccgg gcaccgggcg ggcggcggcc 9780
 gggccggccg ggggtggcgac caggccgcgc agcagcggcg ggggtggcgc ggcggaggcg 9840
 gtggcgaggt ccaggcgcgc ggtgacggtc acggcgctgc cggtgccggg ggcggtgtcg 9900
 aacagggcca gtccttcggc ggcggccatc ggcacgatgc ggttgccggc ggcgcgggcg 9960
 acgtcggcgg cgtccagggt ccgggtgagg ccgggtggcgt cggcccacag gccccaggcc 10020
 gcggcgggtc cgggcaggcc ggcggcgcgg cgccgttcgg cgagcgcgtc gaggaaggcg 10080
 ttggcggcgg cgtagttggc ctgcgcgggg gtgccgaggg tggccgccgc ggaggagaac 10140
 agcacgaagg cggacaggtc cttgtcctcg gtgagttcgt gcagggtcca ggcggcgtcg 10200
 gccttcgggc gcagtacgcc cggcagccgg ccggcgcgca gttcggtcag cacgcggtcg 10260
 tcgagggcgc ccgcgggtgt caccaccgcg gtcagcgggg cctcggcggg cagcttggcg 10320
 agcagcgcgt cgagggcggc gcggtcgggt acgtcgcagg tctcgaagcg gacggtggcg 10380
 cccgcgcggg ccagttcggc gaccaggctc gcgctgccgg gggcggcggc gccgcgccgg 10440
 ctggccagca ccaggtcacg ggcgcctgtt tcggacacca gatgccgggc gagcatgccg 10500
 ccgagcacgc cggcgcgggt gatcaggacg gtgccgtcgg cgtaccgggc gacggtgagc 10560
 acgatcttgc cgggtgtccg ggcctgggcc atgaaccgga acgcggtgcg cgcgtcggcg 10620
 aggggcccagg tccgggtggg cagcccggtc agctcgcgccc cctcggcgtg ggcgacgacc 10680
 tcggtcagca ggctctggac gcggtcgggg ccggcgtcca gcagcaggtc gaacgggagg 10740
 tagtcgacac cgggcaggcc ggcggggtcg cggcggtcgg tcttgccgag ttccacgaac 10800
 cgtccgccgg gacgggagcag tcgcagcgac gcgtccacga actcaccctg gagggagttc 10860
 agcacgacgt ccactctcgg gaaccgctgc gcgaactccg tatcccgcga cgacgccaca 10920
 cgcgcctcgt ccagaccggc cgcccgcagc acctcgtgct tgccgggact cgccgtcgca 10980
 tacacctcgg cgcccagcag ccgcgccacc cgcaccgcgg ccatgcccac accaccggcc 11040
 gccgcgtgca ccagcaccgg ctccccgcc cgcaccccgg ccacatcgcg cagcgcgaac 11100
 caggcgggtg cgaacacgga cggcagggcc gcggcgcgga cccaggacca gccggcggga 11160
 acgggaccca cgagccgccg gtccaccacg gcgaggggtc cgaagccgcc cggcaccatg 11220
 ccgaggactc ggtcggcgac ggcgaggtcg gtgacgtccg gggcgaccgc gaccacgggtg 11280
 cccgcggcct cggagccgat cgcgtcgacc tcgtccgggt acatgtcgag cgcgcacagc 11340
 acgtcgcgga agttcaggcc cgccgcgcgg acggcgtatc ggacctggcc gggtgccagg 11400
 ggggcgggtg cgtcgggagc ggcgacggcg tcgacgccgt cgatgctgcc gggccggacc 11460
 acgtcgacgc gccaggcgtc ggcgccgacg ggcgggcgca gcgcggtctc agcggcccgg 11520
 gtgagccggg cgacgaggcg ttcgccgtcg cggagcgcgg tctgcggctc gtcgccgacg 11580
 gccggcacag cgtccaggga ggcgggtgtg ccgtcgggtg cgacgagcag gaaccgggtc 11640

ES 2 639 918 T3

ggggtgctcgg tctgcgcgga ggcaccagg ccccagaccg cggcggcggc cgggtcgggt 11700
 tctctgcccg gccgggcggc gacggcgtgc cgggtgacga tcgcgagccg ggcctgcccg 11760
 aaccggtcgt cggcgagcca ctctgtcagc agttccagca cctgggcggg ggcgccgtgg 11820
 gcggcggcga ccacatcggc tctgtgtctg acgggagcga ggacgaggtc caccgcgccg 11880
 gcgtcgatgt cggcgagggc ggtgctcagg ggcgcggcga ggccttcggg tccgtcgccc 11940
 aggacggcgc agcgcgcggc ggccgggtgc tcggcgtcgg gggctctcca ggtcacgcgg 12000
 aacagcgcgt cgcgcgtgcc ggccggcggc acggcgcgga gctgcccggc cgacgcgggc 12060
 cgcagccgca gcgcggccag ctccacgacg ggccggccct cgcggtcggg cgcggtgagg 12120
 ctacagcgtgt cggcgtctc ccgggcggcg cgcaccgca ggaccgggc cgggccgggg 12180
 tgcacggtca cggcgtcca ggtgaacggc agcagcagcg gcgcgtctc gggctcggcg 12240
 gcgggcaagg cctgggtgac ggcgtcagc agcgcgggt gcacgagatg gcggcggtg 12300
 tcgacggtgt cggggagtgc gacctcggcg tagacctcgg tgtcccggcg ccacagggcg 12360
 cgcaggccct ggaaggcggg cccgtagccg tagccgcggg cggcgaaacg gtcgtacacg 12420
 ccgtccaccg ggaccggctc agcgcgccgc gggggccacg cgcgggtctc gggctcggcc 12480
 ggctcggccg gctcggcccg tgccaggacg cccgtggcgt gccgggtcca gccgtcgccg 12540
 gagtgggagt ggacggcgc cgtgcggcgg ccggaccctg cggcgccgtg cacggtgacg 12600
 cgcagggtca ggccgtcggc ggggacccg atgggcgcgg ccagggtcag ctctcgatc 12660
 tgggcgcggg cgagccgggt gccggcgtgg gccaccatct ccaggacggc ggtgccgggc 12720
 agcagggcgg tgcccagcac ggtgtgctcg gtcagccagg ggtgcgtctc ggggctgatc 12780
 cggccgggtga ggagcaggcc gtcctcgtcg gggagtccg cctcggcggc gagcagcgga 12840
 tgccctccgg cggtgaggcc gacggcggtc aggtcgcgg cggcggcctg gggggtgagc 12900
 cagtagcgtc cgcgctgaa ggggtaggcg ggcagttcga ccgggcgggc gccggtggcg 12960
 tcgaacaggg ggcgccagtc gaccggcagc ccgtcggcgg ccacctcggc cagtgcgggtg 13020
 gtcaggcgca gccggtcgtc ctctcgcgg cgcagggtgg cggcgaccgg cagttcgggtg 13080
 ccgcgcgct cggcggctg ctgcatggcg accgtgagca cggggtgcgg gctgatctcc 13140
 acgaagccgt ggtggccggc ggcgagcaga tcgctgatcg cgttctgaa gagcacgggc 13200
 tcgcgcaggt tgccgtacca gtagcggcg cccagttcgc tgccgtcgat ccagtcggcg 13260
 gtgacgggtg agtagagggg cacgtcggcg tcccgggggc ggatgccctt gaggtcggcg 13320
 agcagccgct gccgtacggc ctccacctgc ggggagtgc aggcgtagtc ggcggcgacg 13380
 cggccggcgc gcagccctc gtcgtcgcag aggtcgagca gtcctccag ggcacgcggg 13440
 tcgcccgcga cgaccagcga gcgggggctg ttggcagcgg cgatgccgag ccggccgggc 13500

ES 2 639 918 T3

cagcgctcca gcatccgctc gacgttcgcc gcgggggcg cgacgaaggc catgccgcag 13560
 cggccgggca ggtcggcgac ggccttggcg cgcagcgcga cggctctcgc ggcgtcgtcc 13620
 aggggtgaggg cgcggcgac gcagggcgcg gcatctcgc cctgggagtg gcgaccacg 13680
 gccgccggca cgacgccgtg ggagcgccac accgcggcca gcgagaccat gagcgcaac 13740
 agcaccggct gcaccacgtc gacgcggctg agcggcgcg cgtcctcggc tccgcgcagc 13800
 acgtccacga ccgaccagtc caggtagggg gcgagggcg gctcgcactc ggccatgcgc 13860
 gcggcgaaca ccgggtgggt gtcgagcagt tccacgcca tgccgagcca ctgtccgcc 13920
 tggccggcga agacgaagac gacgctgccg tcggctcgg cggtgcccg gacgacggcc 13980
 gggtcggcgc cccccggc gagcacgtcg agcgcggcga gcagttcggc gcgggtcccgg 14040
 cccacgacgg cggcgcgggt ctcgaaacgc gtgcggcggg tggccagggt gaaccgcagc 14100
 gaggcgggct cgaggccggg gtcggcgcg acgaaactgc gcagccgggc ggctgttcg 14160
 agcagcgcgg cctcgggtcg cgcggacagc tgccagggca cggggagcgc accggccggc 14220
 ggcgccgtcg ctctcggg ttcgggcgcc tccgccacga tcacatgggc gttggtgccg 14280
 ctgacgccga acgaggacac gccggccccg cggggacgct cccccggg ccacgggcgg 14340
 gcctcggta gcagccgtac gtcgccggac acccagtcca cgtgcggggg gggctcgtcg 14400
 acgtgcagcg tcttcgggag cagtccgtgc cggagcgcga gcaccgtctt gatcactccg 14460
 ccgacgccgg cggcggcctg ggcgtggccg aggttgact tcagcgagcc cagccacagc 14520
 ggccggtcgc ggtcctggcc gtaggaggag aggagtgcct gggcctcgat ggggtcgccc 14580
 agggcggtgc cggtgccgtg gccctccacg gcgtccacgt cggcgggacg cagtccggcg 14640
 tcggccagtg cctgccggac cacgcgtgc tgggcggcgc cgtcggcgc ggtgaggccg 14700
 ttggaggcgc cgtcctggt gacggcggtg ccgggcagca gggcgagcac cgggtggccg 14760
 tttcgccggg cgtcggagag ccgctccagc aggagcatgc cgacgcctc ggaccagccg 14820
 agtccgtcgg cggccttggc gtacgagcgg cagcgaccgt cctoggacag gccgcctgc 14880
 ttggtgaagt cgacgaacag ctccggcgtc ggcattgacg tcacaaccgc ggccagcgcg 14940
 aggggtgctc cccccgagc cagcgaccgc accgcctggt gcagggcgac gaggaggac 15000
 gagcagggcg tgtccaccgt gaagggcggg ccttccaggc cgaggacgta ggagatgcgg 15060
 ccggccacca cgtggccag gcggccggtc agggcgtgcc cgtcgcgcc ttcgggatg 15120
 ccggcgagca gcgaggagta ggactggcg ttggcgccga cgaacacgcc gacgcgtccg 15180
 cccccccacg agccgggtgc gacgccggc cgtccagcg cctccagct ggtctccagc 15240
 agcagccgct gctgggggtc catcagctgg gcctcgcgc ggctgatgcc gaagaagccg 15300
 gcgtcgaaca gggcgacgtc gtcgaggaat ccgccgtgcc gggtgccggt ggccgagggg 15360
 ccgtccgggt cggcgagggc ggcgaggtcc cagcccggt cggcgggaa cggcgtgatg 15420

ES 2 639 918 T3

gcgtcgcgct cctccagcac gagccgccac agctcgtcgg gggtggtcac accgcccggg 15480
aagcggcagg ccatgccgac cacggcgacc gggtcgtcgt cggccgcgcg ctgtacgggc 15540
tcgtcgtcct cggcgagccg gacgtgccgg ccggaggcgg cgtcgaccag gacgtccgcc 15600
agggcgcggg cgggtggggtg gtcgtagatg gcggtggtgg gcagcttcac gccggtgccg 15660
cggctgagcc gcagcagcag ttgtacggcg gtcagcgagc gcagtccgag ttcccggatc 15720
gcccggtccg gcggtacgtc ggcggcggtg ccgaggtcga gcacctccgc gacctgtgtc 15780
cggaccaggt ccaggacgac gcgccggcgc tcgggttcgg gcagaccggc gagccggtgc 15840
gcgagcgcgg gcggctgagc agccttcggg tcggtcagcg gctcagtcac gggtggtccc 15900
ctccagcggg tccggtgctg gcagtgcgga gacgggcagg ccgggttcgg cgagtgcggc 15960
ctgtagcagc gcggcggtgc cggccagcag gccgtccacg acgcgtcggc cgagggcggc 16020
ggcgcgggtg acgacgtgtc cggtgaggcc gccgtcgggg tcctcgacca ggtgcacctc 16080
gaggtgccag cgggcgtacg cctggtggcc cgtgaactgc tcgacgcggg cggcaggcag 16140
gccgagttcg ccgagttcga cgttgacgag ctggaacacg acgtcgacca gcggctgttc 16200
ggggtccagg ccgaggcctt cgacgacgcg tcccaggggc agggcctggt gggcgtaggc 16260
gtcgagggcg gtgtcccgga cccgctccag caggccggcg aaggacgggt cgcgctgag 16320
gtcgacgcgc aggggcacga agttggcgaa gaagccgatc agcccctcga cctcggcccg 16380
ggtgcggccc gccaccgggg agccgacggc gaggtcgtcc gtgcccggcc agcgggcgag 16440
cgtggccgtg aacgcggcca gcagggtcat gtagagggtg gcgtcgtgct cggcgccgac 16500
ccggcggggc gtggcgacca ggccggcggg cagccgccac tcggtcagca cgccggtggc 16560
gtcgtggggc gcgtcggccg ggacgcccgg cagggcgagg ggccgcaggc cgtccagccg 16620
gcggcgccag tggccgagct gggcgtcgag cgcggctccg gtcagccagg accgctgcca 16680
gaaggcgaag tcgccgtact ggacgggcag ttcgggcagc tcggccggac ggttctctcg 16740
tagtgcccg taggcgccgg acagttcggg ccagagcacg ccctgggacc agccgtcggg 16800
ggcgatgtgg tgcaccgtca gcagcaggac gtggtcgtcg ggggcgatcc gcagcagtgc 16860
gggcccgcag accggtcccc ggacgaggtc gaacggcccg gccgctgcct cgtcggccag 16920
ggcgcggggc gcggtctcgt cggccacgtc caccgggtcc agcacgatgt ccgtggcggg 16980
caggatcacc gacgccggct cgtcgccggg cacgaagacc gtgcgcagcg cctcgtgccg 17040
gcgcacgacc tcggtcaggg cgcggcccag caggcccgcg tccagttcgc cgggtgatccg 17100
cacggccagc gggatcgtcc agaccgggtc gccggggctg gcctcgtgca gccgccacag 17160
ccgcagctgg ccagcgcaca gcggcagggg ctctgcccgg gacaccggca ccaggggcgg 17220
tacggccgtg cgcggggcca cggcgacgac ctcggcgagg gcgcgcgggg tgcggtgctg 17280

ES 2 639 918 T3

gaacagctcc cgcagggaca cctcggcgcc cagcgcctcg cggatccggg cgaccgtgcg 17340
 ggcgcgacc agcagtgcc cgccgagcgc gaagaagtcg tcgtcgatgc cgaccccgcc 17400
 ggtctccagc acctcggcga acacctcgca cagcgtctgc tccgcaccgg tacggggtgc 17460
 ggtgaagccg gtgtcgagcg tggcgcgag gtccggggcg ggcagcgcgg cccggtcgat 17520
 cttgccggtg gtggtcagcg ggaacgcgtc cagcgcgacg agcgcgacg gcaccatgta 17580
 gtccggtacg gcgtcggcca ggtggcgcg cagccgggcc ggcagccctc cgtcgggtacc 17640
 ggggacgggc acgacgtagc cgacgagccg cttgacgccc ggggctcct cgcgggagac 17700
 gatgacggcg cgggtgacct cggggtggcg cagcaggacg gcctcgacct cgcccagctc 17760
 cccccgaag ccccgatct tgacctggtg gtcgagccgg cccaggtatt ccaggctgcc 17820
 gtcgggccc cagcggcca ggtccccggt gcggtagagg cgggagccgg gcgggcccga 17880
 cgggtcgggc acgaacttct gcgccgtcag ttccggcttg ccgacgtagc cgcgggagcg 17940
 tccggggccg gcgaagcaga gttcgccggc cagcccacg gggaccggcc gcagccggtc 18000
 gtccaggacg taggcgcggg agttgtcgac cggctcgccc aggtgtgagg tccggggcca 18060
 gtcggcgacg tcagcgggca ggtgaagga ggtgacgacc tggatctcgg tggagccgta 18120
 gtggttgtgc agacgcagac gggcccgggc ggcgcagAAC tcgcgcagca cgggtgtccag 18180
 cgacagcggc tcgcccgcct gggagatgtg ccgacgcgag gtgagccggg cccggccggc 18240
 gccggcctcc tcggcgagcg cgcggatcat caggttgggc acgaatatct gctcgacggc 18300
 ccgttcgtcg agccagcggg cgaagcgggc cgggtcgcgg cgggtctcct cgggtgggat 18360
 gaccagcgtc tcgccgtaca ggagcgcgga gagcacctcc tgcacatgca cgtcgaaggt 18420
 gagggcgggtg aactgggagg tgccggtgcc ggtccgccc ggtaccgtct tcttctgcc 18480
 ggcgagcatg ttgaccacac accgggaggc catggcgatg cccttgggca cgccggtgga 18540
 gccggagggtg tagacgacgt aggcgagggg gtccggggcc ggtcgtccgg cggccgttgc 18600
 cgcgggaggc tcctgcccg cggggcgtc cagcaggacg agggcgggtgc cctcggcga 18660
 gacgtccgcg tgagcccggc cgggtgacggc gacggtcatc cgggcgtcgt cgacgatgag 18720
 ccggatccgg tcccgggggt ggctcgggtc gatcggcaca tagggggcgc cggccttgag 18780
 gatgccgatc agagcggcca tctgcacggt gccgcgctcc aggcagaggc cgacgaggtc 18840
 gtccggcccc acgccctggg cccgcagccc ggcggcgatc cgctcggcct cgtggtccag 18900
 cgcggcgtag gtgaggacgt cgtcctcgca ctccacggcg cgggcgcccgg ggggtgcgggc 18960
 gacctgctcg gcgaacagct ccacgagcgg gacgtcccgg tacgggaggg cgggtgtcgtt 19020
 ccaccgctcc agcagcaggc gccggtcgtc gtcgtccagc agcagagcgg cggacagcgg 19080
 cgcgtccggg tcggcgaggg cggcgcgag cagcacctgt tgggtgatgca gcaggcggcg 19140
 gaccgtgtcc gcctcgaaca gcgcggtgga gtgcagcacg gtgccgcgca cccggtcggc 19200

ES 2 639 918 T3

gtccctcgggtg aggtgcactt cgaggtcgac gcggggtgaag gcgtgctcgt ccagcagcgg 19260
 ttccaggcgg gcgggcgccga ggcggtcgcc cttgtccccg ggcgcccga tcagctggaa 19320
 gaccacctgg accagcgggt tgcgggacag gtcccgtcgt ggtgccaggg tctccaccag 19380
 gtgctcgaag ggcaggtcct ggtggtccat ggcgcccacc accgtctcgc gcacccggcc 19440
 cagcaggtcg cggaaggtcg ggtcgccgga gacgtcgggtg cgcagcacca gcatgttgac 19500
 gaagaagccg atcagccgct ccacctcggg gcgggtaacgg cctgccacgg gggcgccgac 19560
 ggcgacgtcc tcggtgccgg cgaaccgtgc caggaccacg gtgaaggcgg tcagcagcgt 19620
 catgtagagg gtggcgccct cggtgtcgcc gaacgcgcgc gcggcccgga ccaggtcctc 19680
 gggcagttcc cacggctggg aggcgcccgc cgagccggcg accgcggggc ggggccggtc 19740
 caggggaagt tcagggggc gcagcccggc gagccgcgcc cgccagtagg tgaggtaccg 19800
 ctccagttcg gcgccggtga gccggccctg ctgccagacg gcgaagtgc cgtactggac 19860
 aggcagttcg ggcagttcgg cggggtcgcc ggacagttcg gcgcggtagg cctcggccag 19920
 ctgccccag aacacggcgt gcgaccagcc gtccgtgacc gcgtggtgcg cggtgatcag 19980
 gacggcgtgg tcctcggccg cgaggcgcag cacgcgggcg cgcagcagcg gtccccggc 20040
 caggtcgaag gggcgcgcg cgctccgcctc ggccagggcg cgtacctcgg cctcgtcggc 20100
 gacgtccgtg acctccaggc ggagcgggggt cgcggggcgt acgacggcca taggctcgcc 20160
 ggcgtcggcg gcgaagacgg tgcgcagcgc ctcgtggcgg gagaccacca gggacagtgc 20220
 ccggccgagg gcgtcgacgt cgagcggggc gtgggcgcgt acgcccacgc ccacgttcca 20280
 gaagccgctg tcgggggtga gccgggtccag gaaccacagg cgcctggtgg aggacgacag 20340
 cggaagcgcg gcgccgtccc ggcgggcccgg ccggatgacg tccgtggccg tgccgggctc 20400
 gccgagggtc tcggccagcc ggcgcgggga gcgccgttcg aacaccgcct ggagcggcac 20460
 gtcgggcccg aagcggggc gcgatccgggc gatggcgcgg gtggccagca gcgagtgcc 20520
 gcccagggcg aagaagtctg cgtcggcgcc caccgggtgg acgtccagca cctcggcgaa 20580
 gatctcgcac agcacccgct ccgcctcgggt cgcgggcggg acgtaccgc tctcggcgac 20640
 cgagcgggtg tcgggcgcg gcagggcccg gcggtcgatc ttgccggtgg tggacagcgg 20700
 gaacgcgtcg agcgcgacga acgcccagcg caccatgtag tcgggtacgg agcccgcggc 20760
 gtgggcgcgc agggcgggca gcacgctcgc gccggcctcc ggctccagca ccacataggc 20820
 gaccagggcg ttgtcgcccg ggatgtcctc gcgcacggcg acggtgacct gcgagaccgc 20880
 cgggtgccgc agcagcgcgg cctcgacctc gccgggctcc acccggaagc cgcggatctt 20940
 gacctggacg tcggcgcggc cgaggaactc cagcgcgcgg ccgggcagcc accgtacgac 21000
 gtcgcccgta cggtacatcc gctcgcccgg ccgcgccac ggtccggca cgaacttctc 21060

ES 2 639 918 T3

ggcggtcagg tggggccggc ccaggtagcc gcgcgccacc cggggcccgc cgatgaccag 21120
 ttcccccgcc acgcccagcg gcgccgggcg gagggtgtcg tcgaggacgt acacccgggt 21180
 gttgtcgatc ggcgcgccga tgggcacccg ggagccggcg agccggaagc cgggttccat 21240
 cgggaacagc gtggtgaacg cggtcgcctc ggtcgggccc taggcgtcgg ccacggtcag 21300
 gtgcgggtgg gcggccatca cctgggcgac ggtctcgccg gacacggcct cggcccggt 21360
 gagcacctcg cgcagcccgc cgaagcactc catgcactcc tcggccagga ggctgaacag 21420
 ggggtcgggc aggcacatcg cggtgacgcc gtgctcgccg atgagccggt cgaaggtgtg 21480
 cggttcgacg tgctcgtcgg tggcgacgac gatctgcttg ccggtcagca ggaacggcca 21540
 cagctcgtag gtggagatgt cggtggccag cggatagtgc agcagcacc gttcgtggtt 21600
 gccgttgctc cagcggcggt cggcggccag cacgacgacg ttgcggtggg tcacggccac 21660
 gcccttgggc tcgccgctgg acccgagggt gtagatgacg tacgccgtgg tgtcggggtg 21720
 cgggtcgata ccggggtcgg tgtcgggccc ggggcccggg tcggtgacgt cgaggacggt 21780
 gatgccgtcg gtgccgggca ccgggcggtc ggcgatgacg acgcgcagcc ccgaggtggc 21840
 cacgatgcgc tcggtgcggc ccgggggggt gcgcgggtcg agcggcacgt aggcggcgcc 21900
 gccttgagc acgccgagca cggcggccac catgccggtg gagcgtccgg tggcgacgcc 21960
 gaccggttcg tcggcgccga cggcgtgggc cagcaggagg tgggcgaagc ggttggcccg 22020
 ccggtccagt tcggcgtagg tgaccgctc gtcgcccgag atcagggcga cggcgtcggg 22080
 ggtgcgggcg gcctgctcgg cgtagagccg gggcacgcag ccgtccggca gcggtgcggc 22140
 cgtgtcgttc caggcgacca gggtgcggtg ccggtcggtc tcgtcgagca tggtcgccgc 22200
 ggagaccggc cggtcggggt cggcgagcac ctccgccagg accaccgaca cgtggtgcat 22260
 cagctggcgg acggtgtcgg cgtcgaacag gtcggcccgcg tacaggacgg tcgcgccgac 22320
 ctcgtcgccg gtctcgacgg cgtgcacctc cagggtccatc cgggtgtacg cgtggtcgat 22380
 gtcgaacggc tcggcccggg cggcctgcca ccagggccgc cggggcgcgt cggcgagcag 22440
 ctggaacgcc acctgcacga gcgggttgcg ggacaggtcg cgctcggggc gcagccgttc 22500
 caccaggtgc tcgaagggga cgtcctggtg ctccagggcg ccgaccaccg actcccgtac 22560
 ccggcccagg agttcccgga aggtcgggtc gccggacagg tcggtgcgga cggcgacgac 22620
 gttgacgaag aagccgatca gcgcctcggc ctccggcgcgg gtccggcccg ccgtcggcga 22680
 gccacggcg atgtcctcgg tgcgggctga ccgggacagg acgaggtga acgcggccag 22740
 gagcaccatg tagagcgtgg ctccctcgcg ggcggcgacg gcccgggcgt cccggatcag 22800
 ctccgggggc agctgccagg gcaggggtgc cggccgcccg gtggcgacgg cgggcccggc 22860
 cttgtccagc ggcagttcca gcggggcgag gccggccagc cggccggtcc agtagccggc 22920
 ccggcgctcc agcacctcgc cggtcagcca ggaccgctgc catacggcgt ggtcggcgt 22980

ES 2 639 918 T3

ctggacgggc agttcgggca gcggggcgcc gtcgtacgcg gcggcgatct cggcccacag 23040
 cagggcctgg gaccagccgt cggtcgcat gtggtgcacg gcgacgacga ggacgtggtc 23100
 gtcgggggcg agccggagca gcgtggcgcg cagcagcggg ccccgcgtca ggtcgaacct 23160
 ggtggacagc tcggcggagg ccgcggcgcg tgccgcgtcg gcgtcgggta cgtcagcagat 23220
 ccgcggggcg accggggcg cggcgccgat gaccgcggcg ggcacgccgt cggcgaccgt 23280
 gaaggtggtg cgcagggctc cgtgccgggc gacgaccgcc gacagggcgc cggccagccg 23340
 ctccgggtcc agcggctccg gcacgcgcag ggctccgccg gaggtgtacg aggcgctgcc 23400
 gggggcgagc tgggtccagga accacatccg ctgctgggcg aaggacagcg gcagcagccg 23460
 gtcgcgggtcc gcgggcacca gcggcggcgc cgggtcggcc gggagcgcgg cgcggcgac 23520
 caccgaggcc agggctcgcg gggcgcggtg ctggaacacc tcgcgcagcg ggacctcggc 23580
 gccgaaggcg cgggcgattc gggcgacgag gcgggtggcg agcagcaggt ggccgcgcg 23640
 tacgaagaag tcgtcctcgg cgcggaacgc gtcggcgtcg agcagctcgg cgaagatctc 23700
 gcacagcgc ccgctcggcgt cggcgcgcg ggccggccagg ccggcgtccg ccgtctccgc 23760
 cggggcgggc agcgcggcgc ggtcgcacct gccgggtggcg gtcagcggca gcgcgtcggc 23820
 gaggacgaag gccgagggca ccaggtagtc gggcagggcc gccgcggcgt gggcgcgcag 23880
 ggcggcggtg tcgggtggtg ggcggcgcg cgggacgacg tgggcgacga gccgcttgcc 23940
 ggccgggccc tcaccgcgca ccacgacggc ggcgtgcgcg acggcggggc gggcggccag 24000
 gacggcctcg acctcggcgg gctcgaaccg gaggccgcgc agcttcgcct ggtcgtcggc 24060
 gcggccgagg aactccagga cgcctcggg gcggcggcgc accacgtcgc cggcgcggtg 24120
 catgcggctg cccgccggtc cggacgggtc gggcaggaag cgtcggcggc tggccgccgg 24180
 ccggccggcg tagcccggg ccagggcgcg gccgccgacg tacagttcgc cgggcacgcc 24240
 gaacgggacg ggccgcagcc ggtcgtcag gacgtgggcg cgggtggtgt ccagggggct 24300
 gccgatgggc acccggccgc cgggggcccg gtcggccggc gcgatcgggt ggaggggtggc 24360
 gaaggtggtg gtctcgggtg ggcgtagcc gttgacgacc gtcaggtccg ggtgggcgcc 24420
 gcgcacgcgg gccacggctc ccggggacac ggtgtcggc ccgacgacga gttcgcggac 24480
 gccggccagg caggtgacgt cctcctcgc cagcaggtcg aagaggccgg aggtcagcca 24540
 cagcgcgggt acgccctggt cggcgacgac acgggcgagg gcggcgggtc cgagggcgcc 24600
 gggcggggcc accacgacgc ggcggccgga cagcagcggg gaccacagtt cgtaggtgga 24660
 ggcgtcgaac gcctgcgggg agtgcagcag gacccttcg tgggcgccgc cggaccagcg 24720
 ccgggtggagg gcgagggcg ccacggcgcg gtgggtcgtg gcgacggcct tgggcgtgcc 24780
 ggtggaaccg gaggtggaca tcacgtacgc gaggccgtcc gggccgacgg tggtcggcaa 24840

ES 2 639 918 T3

agccgtgtcg ggggctgtgc cggggacggc gcgcaggtct acggccggca ggtgctcggc 24900
 gccggcgggt gcgggaccgc cgtcggtcag cagcagcgcg gcaccgggtg cggcgaggac 24960
 ggcgcgggtc cgggcggccg ggttgccggc gtcgagcggc aggtaggcgc cgccggcctt 25020
 gaggaccgcg agcacggcga cgaccaggtg ggcggaacgt tccgtcgcca gcgcgacgac 25080
 gctctcgggt ccggctccgt ggccggccag gacatgggcg agccggttgg cggcgcggtc 25140
 cagctgggcg taggtgaggt gttccgtccc gtcggccacg gcgacggcgt cgggggtgcg 25200
 ggcggcctgg gcggcgaaca gctcgggcag cgaggcctcg ggcagcggta cgccgggtgc 25260
 ccgggcggcc cggctccagg ccgcgtcctc gcccgcgctg gtcacgtca gccgggacag 25320
 cggccgggtc ggctcggcgc aggcggcgcg cagcagggcc gtcaggtggc gggccagccg 25380
 ctcgacggtc tcccggtcga acagggcgcg gctgtagttg atcagtcctt cgacgccgcc 25440
 ctggcggtcc tcgccgaggt agacctccag gtccatgcgg gtgaaggcgc ggtcgcccgc 25500
 gaagggttcg gcggtggtgc cggggaacgg cgcggggcgc gcggcgggcc ggggcacgta 25560
 ctggaagacg acctgggcca gcgggtgcg ggacaggtcg cgctcgggga ccagccgctc 25620
 caccaggtac tcgaacggca cgtcctggtg cgccatctcg tccaccgagg cggcgcgac 25680
 gcgttcgacg agttccgcga aggtggggtc gccgccgagg tcggtgcggg tgacgacggt 25740
 gttgacgaag aatccgatga gttgctcgac ctcggccagg ggccggccgg cgaccggctg 25800
 ggcgacggcg acgtcctcgg tgcgggcgtg ccgcccgagg acccgctga acgcggccag 25860
 cagggtcatg tgcagggtcg cgccctgccg tgcggcgacg gcccgggcgg cggcgacggc 25920
 gtccgccggc agccgccagg tgacgacgcc gccctcggcg gaggcgacgg cggggcgggg 25980
 ccggtcgagc ggcaggtcca gcgggggcag gccggccagc cggctcctgcc agtacgccag 26040
 ccgccgctcc agcacggcgg gcgacagggt acggcgctgc caggcggcga agtcggcgta 26100
 ctgcaccggc agttccggca gcgcgggctg ccggccgtcg gccagggcgg tgtaggccgc 26160
 ggtcagctcg gccacagca ggccgtgcga ccagccgtcg gtggcgatgt gatgcaccgt 26220
 cagcagcagg acgtggtcgt cgtcggcgag ccgcagcagg cgggcgcgga gcagggggcc 26280
 cttggtgagg tcgaaggggc gcgcggcctc ctgcgccggc agccgctcgg cgtcggcctc 26340
 gtccaccggc tcggtcacgg gaacgggcac cggctccggc ggcaggacga cggcgccggc 26400
 cacgccctcg tggtcggcga agacgggtgc cagggtctcg tgccgggcca cgacacagct 26460
 cagcgcggcgg gccagcaggc cggcgccgag cgggccggcg acgcgcacgg cggtgccgaa 26520
 gttgtagaag gcgctgtccg gcatcagccg gtcgaggaac cacagccgct gctgggcgaa 26580
 cgacagctcc agcggccggc cgcgggggac ccggtgatg ccccggggtg tcgtgccggc 26640
 cctcgccgtg cgctcccgga gccggttgag tgccgagtc agtcccggcc gtcgcgagct 26700
 cccctgcgtc atccggctgt ctcccgtcc tcgtcggctt cggtgagtc gcggtcgcgc 26760

ES 2 639 918 T3

atcacgctgg ccagggcgcg gtgggtgccg gactcgcttg cttcgaactg ctcgaccacg 26820
 cgccgccgca tcggggcggg cttctcctgg ctgagcttga acatcgctcg cacggaatcg 26880
 acccgaggg tgaaggcgcc cacgccgggc gcgatctggc ggaagtagtc gagggaggac 26940
 tcctggtccc agccgcgccc gaagccggac tccagccgcc gggcggtgtc ggagacgatg 27000
 tccagcacgg cggcggggtc ggcggtgggc tccactgtgc cgttcacgtg gacggcgatg 27060
 aagtcccagg tgggggccgc gggcgtgacc ccgtagaccg tcggcgagac atagccgtgc 27120
 gggccctgga agacgatgag cgcgccggtc ccggagcgca tccggcgcca ctgcgggttc 27180
 tcgacgttca tgtggccgat cagggtggag ccggcgagcg ggacggtgcc cgcggcgacg 27240
 gcctcggcgt cggcgccgtc ggtccgtgc cggaacagca ccggcgcggtg ggtggccacc 27300
 gggacgtcgt cgtgcgaggt gacgaccatt gccagtgggt tgtgtcgag aaacgccagg 27360
 acgacgccgt cgcaatcctc ccggtacagc ggacgttcgt aacttcagc ccctgttccc 27420
 cgctgctgcc ttgcttccgg tggagcggtc cgggtcgcac cggccgcccg tgatcgaccg 27480
 ggcgatctcg cccgcgcgga ccgccaccat ggacagcagg gtggaggcga tgccgtgggt 27540
 cgcctcgggt gcgccctgga cgtagatgcc gcaccgaaa tccccggtgg tgccgagccg 27600
 gtagtcgcgg ccgatcagca actccccgc ctcgtcccgg cggagggcgc cggagacgcc 27660
 gccgagcagt tcggccgggt cgggtggagtc gtaccgggtg gcgtacacga ccaggtcggc 27720
 gtccaggtcg gtgtgttcgc ccgtgggagc gaactccacg cgtacggcgg cggattcctg 27780
 gcgcggttcg acggacacca ggcgggaggc gttcatcacc cgcagccgcg gggcgccgga 27840
 caccttctgc tcgtactggc ggcggtagag gccctggagg acgtcctcgt cgacgacggc 27900
 gtagttgggt ccgccgtggt agcgcgatgat ggctgcttg acctcgggcg gggcgaagta 27960
 gaagtcgtcc acggcgccg ggtcgaagac gcggttggcg aacgggctgg agtcggcgac 28020
 gctgtagccg tagcgggca acaccgcgca cacctcggcc tcgggtagc ggtccatgag 28080
 gtgcgcggcg acctcggccg cgtctggcc ggcgccgacc acgacggccc ggcggggcgg 28140
 gcgttcgtcg aacgcgggca gccggtgcag caactgggag ctgtgccaga cgcgttcgcc 28200
 ggtctccgcg ccctcgggca gccggggcg caggccggag gcgaggacga ggtttctggt 28260
 ccgggcgacc acccggtccc cggcgagcac gtcgagcgcg acgacctcac cggcttcggt 28320
 caccggccgc acaccggtg cctccacgcc gtactcgacc aggtggttca gccggtcggc 28380
 ggcccactgg aggtagtcgt ggtactcgat ccgggagggc agcagggtgt gctggttgat 28440
 gaagtcgacc agccggtcct tctcctggag ataggacagg aatccgaaat cactggtggg 28500
 attgcgcatc gtggcgatgt ccttgagaaa ggacacctgg agcgaggagc ccccaggag 28560
 catccccga tgccagccga attccttctg cttctccagg aaaaggcct tcccggcggc 28620

ES 2 639 918 T3

ttcggattca tggagcgcca ccgccagggc gagattcgcg gcaccgaatc cgattccggt 28680
 gacgtccagt acttctgatt ccgggctctg ctgcgcagtg gatgattgct ctgcgagccg 28740
 ggtcatatat caaccgccat tagtttttca atggatgtat cgtcgcagga cgcccagaat 28800
 tcacctgca cgtcctccag atgcgtgagg gaacgcgcgc tgtaaaaggt ggtctggtac 28860
 tgggttatgt cgtagtcgac gtgggcatg tcggcgatgt ccagcggccg gatctccgcg 28920
 gaacggaagt gctccagctc gccgtaggag gagacgacgc tggcgccgta ggcccggggc 28980
 ccgtcggcgg cgtccagcag gccgcattcg agcgtgaacc agaaggtctt ggcgacgaac 29040
 tggacggcgt cctcggactc caccctgcgc acggcctcgc cggccaggcg gtacaggtg 29100
 gcgaaccggt cgtcggccag ggcgctgccg tgcccgatga cctcgtgcag gatgtccggt 29160
 tccgtcgagt agaaggggtg cgcgctgtcg cggaggtact ggggtggagtg gaagtaccgg 29220
 tcggccagag agccgcagaa cagggcgaag ggaaccacgc cggacgcggg gcgtaggcgg 29280
 aatccggtca gctggtcgag ccggtcggac acttcacgca actgcgggac gccgtcgccg 29340
 cccacctcga gccgctccgc cgctcgcagc aactccggcg ccgccatgtg ccggtgccgg 29400
 tccgcgagcc gcttgaaac cagggccac agagcgtgct cggcgtccgt gtactcgacc 29460
 tctggaatgg gctcgcggg cacataggcg gcagcgcttg cggcgatttg gtcacgccgc 29520
 tgctgataca ccgacgacgc ggttaattcg ggcgcgccc agccgatttc cacgaaactc 29580
 cccctacttc catcgacaga aggcagcagt tgctgtccga agctattttg gttcggacgc 29640
 ccgcatcaac cttcccttgt ccagccgatt cattaggacc ctacaagca cccgcagcac 29700
 tcgcaagagt tttctatgcg ccgctatgt acccttttg gcagactcac cggaaattat 29760
 cgtcatccgc accgccgaa ccggagtcaa gcgttggtc ggcagggcg cttcaagttc 29820
 ccgataggag cgggccctag gcgattcctc agatccggcc ggcgcgttcg ggtgtgtccc 29880
 aatcactgg cctaaatcct tcatgaggac ccgtcagctt gccgacggac gctctttcgc 29940
 ttgtggtgcc gggcgtttcg gtgtccgggc aggcgcgcgc ggagcgcccc aactgccgcg 30000
 tcgggctgtc gcgtcgggtg ggcgcgggt tccacggctc cgggagtcct tcgacagggc 30060
 ccggcgaata tctccaggac caagccgtgg gcggtgaggt ggtcggcgag ggcggtgagt 30120
 tcggcggcgt tgcgaccgag ccgcttcgc tcgtacaccg tgaagatgac acggcagtgt 30180
 gggcggtgcg ccttgacctc ccgcgcgcgc ctcagcgct cctcccggaa cttcgggctg 30240
 cccgcgccc ggggtctgat cttctgcgc aagatgtagt cgcgcgagat gccgtgtttg 30300
 gcgagcgcgt cgagctggga gtcacttcgc ctgcatccgc ccgcgcgcgg agtgggtgcg 30360
 catcgtggca gcgcgcgtca gatgcgcggc gtcgccccca ggtgaactcc gtccgccctg 30420
 gggcagggtg ggcggagttc accgcgtcgt gcggttcaac ggggtccaatg gaggtcgca 30480
 tacggtccgc ccggcgcgcg ggcgcgcatc atcattccgg cggggcgag ccgtcagtc 30540

ES 2 639 918 T3

ttgacggtga acgtggcgcc ttggggcgcg aaggtcgtgt cgtggtcctt ggcggtggcc 30600
 agcacggata cgtgccagac gcccttgggc aacgcggcgg cttccttggc cgagctcttc 30660
 acggtgtagg tgcacaccga ggccgtcgcg gaagtcgcct tgcacgtggc ttcctcgaca 30720
 tcccgcattc cgcccgcctt gggcgcaagg cccgaactcg ccggccaggc gagcaccgcg 30780
 aggctcttga ttccggagtt gtcggccacg gtggcgctga aggtgagcga ggcgctccca 30840
 ccggccgtac tgggtgtagtg ggcggtggcc tttgagatct ccggcttggc cggcacagcg 30900
 gcgtcggccg aggagacgaa caccacggtg ccggcaacga cggctgcggc cacggcgagc 30960
 gacgagacga caaggcgctt ggacatgaag tatcccctca tagatgaccg ctactggtct 31020
 cttcgccgag cgctctgcgc accgcggcgt tgtgtacaca gcctgtctcg acggccctgc 31080
 ccctcacatg ggcagaacta ctcaaccgaa gtactcagac gccctgagct tgtcgttcaa 31140
 cctcgtctcc gttgggggcg ggtattgagc aggcgctttt cgaatgtggc gtccagcacc 31200
 gccgtccagg atgtgcagcc ggtctgcaag cttcgtcgcg atcaggacct tcagcagatc 31260
 cagcgcgtcg tccaccgccc gcgacgtgag gtacaccgcc gcggccagca gcgttgtgag 31320
 gctgcgagag tccgagtgcc ggcgcggcaa cgacacctg tcgtccgccc cgtaccgca 31380
 ccactctgcg ccgccccgtc acccgtaccg gtccgcggcg cagccggtcc agctccacca 31440
 ggcggcccga cgagcagaga atccagcacc gcccgctgca cgacgcgcgg catcccgcac 31500
 aaggcgtccc aaaacgccga ttccgcccct cccacaccga tcccacagga caggccggac 31560
 agctcgcgcc cagcagcagc ggctactgtc acccgttcgg cggcggggcg gacagagccc 31620
 gtgacaacca gattgtgacg ttcggtgatc gtgacaccaa ttcggagctg gcccgctgac 31680
 ctgtgacagc ggactggcct cgaagggtga ccgaatgcag ttcttgacag caaagacgga 31740
 ccgccgcagc tcaggggccc agtgcccgcc cgcagcacag tcggttcagg gctcgacgcc 31800
 ggctacggac agacgtggat cgccggtcgc ggtcagcgcg aacgctgtcc ggtgaagagg 31860
 cggtagcaga ggagcacgat caccgagccg acgaccgagg cgatccatgt cgagaggtgg 31920
 aagaagccgt tgatggagtg cacgccgaag atcaccttgc cgagccagcc gccgagcaga 31980
 ccgccgacga tgccgatgag catcgtgacg aggcagccgc ccgggtcctt gccgggcatg 32040
 agtgccttgg cgatggcgcc cgcgatgagg ccgatgagaa tccaggcgat gatgccacg 32100
 gtgtgcgtcc tttgctgtag gtggtgccga ggaaggcccg acgaggctcc gccggggctg 32160
 cccgccggtc gctccgcgcg gacgaccggc gacatacggg tatccgctcc ggaacactcc 32220
 acacgggtca aaggtcccgt ttctccgac cgaccaccc gccatccgat ccgtcggccc 32280
 atccggtcga cggcggattc ggtgactggt caaccttcga tggcgctcga tcaaggttcg 32340
 ctgtcacagg tcatccgccc tcagtccctc aggtcgcgcc tcggaaggcg tccaccagag 32400

ES 2 639 918 T3

gtcaggcggg tccattcctc cggatcccca gctgcctcac agggtgctgg ggacccgggg 32460
 acggccctcg gtgttatgga taagccgaag ctcaggacgt tctcacggcg acgccggatg 32520
 agctggcgag gagggcgtgc cgaggcagtt cggttgtcac cgaggaggca tcccacttct 32580
 cacgctgctt cattcggcgg acttcctgtc accggcgccg acgagccgga gttcccgggc 32640
 tccccggctg ggccccggctg agggctgagc ccttccacgg cgaggcggaa gaggcggctcg 32700
 gcctgggtgt cggggtctgt gtgggtgctcg gtggccaggg cgatgccgac ggcgagggtc 32760
 agcaggtcgt gaaaggtgac gtgcggtgca accgccttgt cgcggatggc ccgctggagc 32820
 aagggagttg cggctgcttc gattacgcc cgcagctct tcggggaggg ttcttcgggtg 32880
 ggcggctcgt agctgaggat atgggcgaat ccgcgggctg agacggcgtg gcggacgaag 32940
 gcgtggaacc actccagcag tgcggtgctg ccgtcctcgg acgcactcag ccgatgggcg 33000
 cgctcgcaca ggccccgaat gcgctcctgg aagacggctt cgaggagcgc ccggcgggtg 33060
 gggaaagtac ggcgcacggg cgcgaaccg acgcctgca tgcggcgat ctgctcctgg 33120
 gatgcctcgg cgcctgctgc ggcgacttcg gcttcggcga cggcgaggat gcgctgatag 33180
 ttgogtcggg cgtccgagcg ctggccagtc atggtctcct cgttgctaag tggcgggccc 33240
 cgccatatct tagcggcaca cgaaacggcg ggccccgccc ttttgtctct ccggcccttg 33300
 aggagcagca ccatgccag cagcagcgt accgtcctgg tcaccggcgc caccggccag 33360
 caaggcgggg ccacggctcg cgcgcttttg gccccaagg tgcctgtacg tgcgctcgtg 33420
 cgcgatccct cgtcgaagtc cgcggggcg atcgaggcgc tgggcgcgga actggtacgc 33480
 gcggatcttt ccgaccgggc ctccctcgac ccggcggctg agggggtccg cgcggtgttc 33540
 tcggtgcaga tgccgccat gaccgagacc agcgtggact tcgcgagcga actcgcccag 33600
 gccaccaacc tgggtggacgc ggcgaagata gggggagtac ggcagttcgt acagtcctcg 33660
 accagtggag tcggtgaaca caccgggtc gccggctggg ccgagggccg ctgggcggcg 33720
 atggcggagt acttcacac caagcaggcg atcatggagg cgtgctgtgg tgcgggtttc 33780
 gccgctgga cgggtgatca gccgccttc ttcattggaga acctgcccct gctggcacc 33840
 aaggggcccc gcggcgact gctgacggtg ctgaagccgg acaccgaact ggccttgggtg 33900
 gccgtgcggg acatcggcac ggcgcggca cacgcctcc gagaccccga ccggttcac 33960
 caggtggaac tggaactggc tggtagcctt cgcacgatgg agcagatcgc gcagacctg 34020
 tccgccgctt ggggcgtgcc cgtgaccgcg cctccctga gcgtggaaga ggcccttgcc 34080
 gcgggcatgc cgaagtggg agccggacac gagtggaca acgtggtcct ccagcccgcc 34140
 cgcccacat tcgccgga gttgggcatc ccgctacca ccttcgccga gtgggcggat 34200
 gagcagttga cacatgtgtc tgattagggg tgtggcggca agggcgccc attgaccct 34260
 acggggagcg cggcggttgc ccgagaggg cattgcggtc ggggggcatc ggtgccggtc 34320

ES 2 639 918 T3

ccctggacgg gctgcaatga gcaggacagc gcagaggggt ggacacgaga tccttgaggt 34380
 gcacgacgtg gccatcaggg ggtcggggcg tacgggatgg ggatgatgta gcgcgggtgt 34440
 ggaggcatcg gcccagtgcg ctgcttcgcg tgttcgcgcg ggtgccggca gcctgttcgt 34500
 tggagtgcgc gtggcttcgg agcccgtccg ggaagtacac gccgtgggcg ctggcccatg 34560
 ctgcccgggt gtcgctcgcg tgggggaacg agtaccgcaa ggacgcgggc gatgcccgtt 34620
 cggcggcctc cctcgggtcc tcgcoctctt cctcgtcgtt ctcgttccag tcgagagcgc 34680
 ggccgggtcc cgcccatccg cacgagcaca ccgcgcgcaa cgctgccgcc cgcgggtccgc 34740
 catgaggccg gccgtcgtag acgctccgct ccgatagcca cctggcctcc gctccggaag 34800
 agctgaggaa gagcacagga tccgggacgg tgccatcggc cagcaacacc ccgaccgcac 34860
 ccacgtggga cgacccgaac tcctccgtcg tccacgtctc cctctcacct tcacccatcg 34920
 tctcggccct ctctcatcg ccgcatccgc acccggccga acgcacggat acagacgatt 34980
 ccggagtcca aggttcgcga cagcgagatc ctcgaaaagg tgacctcgca cctccaccgt 35040
 gcaccaggcc tcaaagccca cgacgagccg accgagcgcg gaccaccgaa gacgaagcgc 35100
 atcggcgtt cccagtgcgc tggttgatga ggttcaggaa agcggggtca cttctctaca 35160
 tcggacagct accgcagctt gccgcgcccg ccgcccggag cggcggttgc tcggcgcccg 35220
 cgtgcgggtc ggaagcggag gctcggccgg cgaggttcgc cgtcgatgcc ggcggcacga 35280
 cgggccagct ctccgatctt ctctcgggc agtccggaca tcctgacggc ctggcgcact 35340
 gcggcccggc agtcggggcg tgagcagtcg gccgacgata ccggccgtcc gaccgtcggg 35400
 tgctcgggcg gcaggtagat cgctgcgcag ccgacgcaca gatagattga tcgcaaggcg 35460
 cttccccttc gtcagctgag gccgctgccg tggcaggtat tgcaggagcc ggtccagcta 35520
 cgggagcagg gcttctggtt ccgctcotta tcgacttcga cagagtgtc ggtgtgctca 35580
 gtgactccgg atccgctgca agcggagcaa ggcacgtcag acatthtccc aggatgcccg 35640
 attctgtggg gccgtgtcag tcgtcccgcg aactcgcgc gctaccggac cgggcccggc 35700
 catcccgaga atctcccgcc tgcatacagg cggcgccaac ggcgagcccg aacctctggg 35760
 ccacgcggtc gtcgcgccgc ccggtgggcg acctcgtgcc gccacgttcc cactgcgcgc 35820
 tgttcgcga ctccccgcc cccagggcg agtccctcgt gcgctcgcag tactgccgca 35880
 cgagcaggtc gccgctccc ggagaggccc cagcatcacg gcccgtaag gtgctccgga 35940
 tcggtggtgg ccgttgtgaa ccgccacgcg ccgcccggct cgtcggcctg gccatcggc 36000
 ggctggtcc cgctcaggat gccggggcg tcaggacggc cttggcagcc agccggaat 36060
 tcctgatcat cggattcggg tcgcocttgc ggctgaccag gacgaccgg ctggggggag 36120
 cgccctcgac cgggacggtg acgaggtcgg gacgcagtg gctgcgccga tcgccgaccg 36180

ES 2 639 918 T3

gtagcacggc gatggccctg ccgctcgcga cgagttcgag cttgtcctcg tagctctcga 36240
 tcggcggcac gccgggtccc aggaactggt aggaagccca gcctgcggtc tcgaacgcac 36300
 acggcgcgcg ctcttcgcg gccagttctt ccgcggtcac cgacgcgcgg tcggccagag 36360
 gatggccgcg cgggaccacg agcatccggg gctcctcgta cagcggggtg gtgaacacgt 36420
 cgtcggcgac gagcggcagc ggggcccgcg cgatcagggc gtcgacgcgc ctgtcggaca 36480
 gtgccccgac gtcgcggcag tgcagatgcc ggggtggcgat ctccggcgtcg gggtaacggc 36540
 ggcgcagttc ccgcacggcg gcagtgatca ccaggtcttc gacgtagccg atggcgattc 36600
 gttcgggtccg ggcttgttca cgcacggcca gctcggcctg gcgggcggcc cgcagcaggg 36660
 cctgggcccg ggggaggaac gtccggccgg ccggagtgag ccgggtgcc tggggggtgc 36720
 ggtccagcag tcgtgtgccc agatatttct cgagccgttg gatctgacgg ctcagcgcgcg 36780
 gctgggctac gtgcaggtcg gcggcggccc ggccgaagtg ctggtgcgcc gccaccacgg 36840
 tgaagtagcg caccagccgc agttccaggt cctgcccgag atcgttcacc ctgcaggggt 36900
 acgcgtcatg ccgtttcggg atggtcagat tgccgaaccg gtcttgacg gccatgccgt 36960
 cccgggcttt gactgaagga gcaacgtttc cccgagaaag cgacaggcgc gatgaaggcg 37020
 atccagatcc acgaagcggg tgggcccggaa gttctgcggt acgacgaggt gccggctccc 37080
 gagatcggcc cgggcgaggt gctcgtccgg gtgcacgcgg cgggcatcaa cccgccggac 37140
 tggtacctgc gtgaagggat gaaggatcatg ccggccggga tgaggccggc gctggagttc 37200
 cctctgatcc ccggaacgga catgtcgggc gtggtccagg ccgtcgtcc ggacgtgccg 37260
 gggttcggcg tcggcgacga ggtcttcggc atgctgcggt tccccgatt cgacggcccg 37320
 acgtacgcc agtaoctggc cgcgccggct tctgacctgg ctcaaacgcc ggccggtatc 37380
 gaccacgtgc aggcggcccg ggcgccgatg gccgtgctca cggcctggca gtacctggtc 37440
 gacctcggcc acgaggtgcc gtctcctttc accggccagg tgcaccagcc ggtgccgatc 37500
 acgccgggga tgacctgct ggtcaacggg gccgccggtg gagtgggcca tttcgcggtg 37560
 caattggcga aatggaaggg ggcacacgtc atcgcggtgg cctcaagtgc gcacgagcgg 37620
 ttctcgcgcg agctcgggtc cgatgagttc atcgactaca ccacgacgca ggccgcggac 37680
 gtggtcagcg gtgtcgacct ggtgatcgac accgtcggcg gcccgacgg ctcacgcttc 37740
 ctgaccgtac tcaagcgcgg cggcaccctg ctcccgggtg tcttcgccga gtacgacccg 37800
 gaagagacgg cgagtctgga catcacctgc tcgaacattc aggtacgttc ccacggcccc 37860
 cagctcgcgc agatcgggcg cctgttcgac gagggcacac tccgggtcgg ggtggacagc 37920
 acctaccgc tgtccgaagc ggtcagcgca cacacgcgag ccgcgcaggg ccacatccaa 37980
 ggcaagatcg tgctgacggg ggcctcgtga tcgccgaaac tccagcaggc ggtggcgaac 38040
 tacgcccacg ccttgacgga gttgcatata cccgagctgg aaacggtcct ggccgaagac 38100

ES 2 639 918 T3

accacctgga ccgtcacgat gcccgacag gggatgctcg gccccgtcgc cggacgcgcg 38160
 gccgcggcgg tgctcgactt catcttcate ccccgtgtca gctcgggtgag cgggtgtcca 38220
 gaccggcccc ggacctcagc agttgccag ccgaccgat gagcgcgggc gccgagttgc 38280
 ccgcgagcag ccgcggcgcc atcttgacgg gcaggccag tcgcgctgcc gcgtcggatt 38340
 cacgccggtt tcctcgggtc gctgtcggcc aagtcagcgg tcattgtgcc acccgtcca 38400
 ctccggaaga cgctgaccgc cgctccccg atcctggatg cggcggcttt cacggcacgc 38460
 tgctccgctg ccgtgccgac gaggtctccg gacggctgag ccgtgctgcg catgccgcgc 38520
 cgcctcggcg accgatcgcc gcgcagcgtc agatgcgccg gactttcgcc acggcaaggg 38580
 cgtccgcgac ctcccggacg acacgcttcg cgtcgtcggg gctgttcacc acgtcgggtc 38640
 ggttcatgtc gatcacgag acatcgtcgg cggaatagt ctcgtgcacc cagtogtct 38700
 acccgccca aagcgtccgg tagtactcga cgagactttg gtccctgctc aagtcacgcc 38760
 cccgcagtcc gatgcggcgc agcaccgtct cgaagtcgc tctgagatac accatgagat 38820
 cgggtgcctt gcgatagggc aggccgtcga tctcacgcat catctccgcg agcaaccct 38880
 cgtacacctg catctccag gaactgatcc tgccgaggtc gtgattgact ttggcgaagt 38940
 accagtcctc gtagatcgac cggtcgagga cgttgcgtc ctgtttgtac gcctccttga 39000
 tcgcggcgaa tcgcgtctgc aagaagtaga gctggagaag gaaggatag cgcttcgccg 39060
 ctatctcctc aggaccggcg gtgtagaaga gcggcaggat cgggttgtcc tccacgtct 39120
 cgtagaagac catgctcccc agctcttgg cgatcagctc ggccacgctt gtcttcccga 39180
 tcccgatcat gccgccgacg cagatcactg ccatacctcg cttcttccc gggacaccgt 39240
 ccgcgggcgc gattcccgcg caccggctct tccacggcac acgcaccgcc gcggagcgca 39300
 gtcgtggaag cgtcccaggc gcaggtgacg agcctggcct ccgtcggacg accgaagcgg 39360
 catcatatcg gcacggaggg gtgttcgaat ctacgtgctc gtgccctgga tggaaagcgc 39420
 tggtagaccg ggtagcggga tcatcgagg tgatcatgta gcgggtgggc ggaacgcgc 39480
 ggaacgcgc agtggtggga caggggccac tgacgcacgt atccgcagcc gcgctggagt 39540
 cgcgcacctc cacaggttca ctctaccgg tgaccaagga aagatcgccc gcatgccagg 39600
 ctgcgccgct cctccccgga acagcgcgta caccgatcag gagaacgacg ccgcgacccc 39660
 gagcagcag ccgagcctgt gtggacgcc aacgtgtcgg ttaccactcg acgaccagcc 39720
 ttgacacacc gcgcgtcgcg aggccctccc gccatacag ggcctcgtcc cccggtgcga 39780
 gtcgcaggcc ggggaagcgc tgccacaagc gggtcagcgc gatcttcate tggagaagaa 39840
 ccagtggcgc gcccatgcac cgggtggcgc cgtgtccgaa tgtgaggtgt gcaggccggc 39900
 gggcgtgct ctccgcacct gatgtgcaa atacttcggc gtcattgatt ccgtgcagca 39960

ES 2 639 918 T3

acgagacgat gacggcctct ccttggcgca ccgtcgtccc gcccaggaca aggtcctcga 40020
 tggccactcg gggaaaactg ataggtgtgg acggcgtctt gcggagcagc tcctcaacca 40080
 gatcctccac ggattgcccg tcgagcgcgt caccggtgag cagttcgagt atggcaaggc 40140
 tcaattgatg ggcgggtggc tcgtaaccgg ccatgagaag tgccagtcgg aggttgatca 40200
 actcgatgcg ggatatctca cccgactgct caaccgcgac cagcgcgctc aggagatcct 40260
 gcccgggcgc atccctcttt ctttcgatca gtgaggacat gtacttgata agagtcagga 40320
 tatggcggcc tcttctgcgg gttccctgag gcgtcatgtc gaacagcgcga gtcacggcgg 40380
 cgtcgaaaac gggccgctcc gccgccggca cgcggagcag tgagctcaac gcgaccatgg 40440
 gaaggggcca agcataaccg ctgaccaggt cggcgcctgg ccccgcaacc tgtagccgat 40500
 ccagcagtgc gtcggcggcc tcctcgatca ccgctgcctg tgcggtgact cgggcgctgg 40560
 tgaacgctgc tccggcgacc cggcgcagcc gggcgtggc cgcaccgtcc agactcatga 40620
 tcgagttggg tgagaggtcg acggatcccc atttcggagc atcggggtgg gtggccgcag 40680
 ctctgctgag acgtgtgtcg gcgagcgcgg cgcgccccac ggcgtagtcg gtgaccagcc 40740
 acatgtgatc accagtgggc atccgcaccc gtttgacggc ctcaactgat ggcgctgcca 40800
 ggaagggcgg cagggggccg accctgtggt gatcgaaagt gccggacatg gtcgattact 40860
 cctgttcggt cggaaacgcc gcggggtgtc tgtctcccct gccgccgacg gccgtgggag 40920
 acgaccatc ggggtggcggc cgggtcgggc gagcgggctt tttccaccgc ccggaaggcg 40980
 gcccgctggt cggctctgcac gctgttcggg ctgcccggt tcggcggaca gaccggcttt 41040
 ggcgacaga ccggctgccg gatgttcgtc acgtagcgcg cacggtgtgt tcctgcctc 41100
 tcagcgcac ccgccgtcgc ggctgacgc gttggacgcc tgtggtctca gccgagcgtg 41160
 ggcaccgaac tgcgtcggcc cgtcgacctg cgctctgcgg gacaggacga ggtcccggag 41220
 tcgctgtggc agggcgtcgt caaagcggag gtggtccggc accgtgacgc cggcgttgcg 41280
 cagcggcgtc gcgatctcgc ggcaggtggt gctgagccag ttgaggaccg cgggatctcc 41340
 cgagcggccc gcgaccggcg tccaggtggc cacttccggc tgccggaggc cggcgtcgag 41400
 gaacgtccgg gtgaggcggg ggccgaagtc ggggacggcg ccggcccca ggaaggggcc 41460
 gggccacagc gcgtagtact cgtcccactc cggcagcggc ggacgtgacg gcgacgtgtt 41520
 ggtgaagtcc atctcgtgca tgacgacgat cccgtccggt ttcagcaggg acgtcagacg 41580
 gcgcagtgcg gatgcgggat cgggcaggta catcaggatg tacctgccga ccaggacgtc 41640
 gaacttcac gccaggtga agtcggccag gtccgcggct tcgtaccgca ccgagtcgc 41700
 gagccccgcc tcctgtgcca ggatccgcgc cttgtggacg gttccggggt cgcgctcgat 41760
 tcccacgacg tgtccgccgg gcccgaccag ttgggcggcc agcagagaga cgtatcccag 41820
 tccggcaccg atgtcgagga cgctcatccc cggacgtact ccggccgacc gcagggtgcg 41880

ES 2 639 918 T3

ttcgggtgaac ggcgagatcg cctcgttctg aagggtcagc ctttgggtgct cgctatcgga 41940
 gtaaccgagc aggtatgCGT cgtgcgccat gcgaggcctc cagggccggt cgtgCGGGGA 42000
 gttccccacg gcaggtggcc agggggctcc gcggtgtctg gagcactgag tgcctgtag 42060
 cggcCGTgcg gtgtggtccg gtgttccggg tatgtcacgc accggagcgg gacatgtacg 42120
 tgtccgaagg cggcgggCGG cgcagagcct tgccgctgga ggtgcgtgCG atcccCGCGC 42180
 gcgcacgaa ctcgatcgtg tcgggtgtga tgcccagctc ggccaccaca cgtgCGCGGA 42240
 tgtgttgcgt cgtggcacga cggctcgcct cgtcgtgCGG cgtcgtctcg acgacgagcc 42300
 cgaggCGGCC tcctcgtcg ctccagatct gctcggccag gacgCGTgg acgaggaggc 42360
 cgggtgtgtc ccgcacgacc gcctcgatgt cgtcCGCCA gtggttcgCG ccgaagacga 42420
 tgatcacctc tttcgtgCGG cccacgatgt acagctcGCC gtcgtgCCac aggccaggt 42480
 caccggtcgc caaccagCGG cccggaagga ggacCGGacg gctctcttcg gggTggCGGT 42540
 cgtaccCGGT gtcgtgacg gacgcccccc ggacctcgac ggCGCCgacc gtgCGGGCa 42600
 cggcCGGTgc gccgctcCGG gtggtgagcc ggacctCGGT acgCGcacc ggcgttccca 42660
 cactgaccag ttcgCGacac ggcccCGGCG cggacGGcacc cggTacgTaa cggccccCGGT 42720
 tcagttcgtc ccggtcGGca cgcagcacct tggccGGGCG gccgagggga gggaaGGCGa 42780
 ccGCCagggT cgcctccGCC agtccgtagg ccggcagga gacgttctcg gacagtccGG 42840
 cgggCGCGaa acgctcGGCG aaggcgtcct gaagccGCCG gtcgaccGGC tcggCGCGT 42900
 tcaccCGGat gcGCCagCGG gagagatCGa ggccGGCCGG cggCGCCCGG tcCGCGctca 42960
 ggacgtagCG gtagccGGag tcaggagcca tggTgaaggT cccccCGc cgccccatGG 43020
 cccGGatcca gtcaccCGGa ctgCGcaggt agtcctccGG tgtcagcaga tggatgtCGa 43080
 cgtcgtgCag cagCGgtgtc aagaaggaac cGatcagGCC catgtcgtGG aagagggGCa 43140
 gccaggtGca gccgacgtCG gtCctggCGa gccgtgtGCC atgggCGatg gccGCCacc 43200
 cggcCGCCac gttgCGgtGG ctgagcagCa cGccccCGGG ttcgctgctc gtgccccagCg 43260
 tgtactgaac gacggccGGG tccgacGCCG cccCGCGcacc gtgggCGCGG gacggctcGG 43320
 ccacctcCGG caccaggagT acgtcGaccG ggCGGGCGCC gtcGGacagT ccaggaccGa 43380
 gcagCGGGCG catggCCGGa gccgtcagCa cggTccGTac ccgagagCGG cgcagggCGG 43440
 cggaggtGCG ccggagatag gcgtcGGacG accCGaaggG cGCGGGaccG ggcagCGGCa 43500
 ccCGcaccGC gcccCGCGCC agcacGCCGa agaaggCGCG cGCGaagtCC accgacgtCG 43560
 gcaggacGag ggCGaccCGC tcGCCgggtc gacccccCGG cGacagcagC cccCGGGcCa 43620
 cccGCCCGGC ctCGGCGaag aggtcGctgt aggacagCGC gtcCGcctCC tggccccGGC 43680
 gcagcacgtG catgccccGT ccggagcctt gtCGGGCGac gCGGCCgagC gcggCGaaca 43740

ES 2 639 918 T3

gggtcacgac agcggttccg tgccggcctc cgcgatcacc ttggtgatcg cggcccgcaa 43800
 ctcccgcacg gtgctcgtct cgaagacgat gcggtcctcc acctcgatgt cgtagtgctg 43860
 ctcgatctcc agcacgatct ggagcgcgtg gatcgagtcg aagcgcggca aggagcgcag 43920
 atcgggtgcc acgcccacct cctcgacacc gatgcgcagt tgctcggcga cggatcggcg 43980
 gacggctctgt tcgatgtcgg tgacactcgc ctgtgacatg gcgtggtgtt gtccctgttct 44040
 gtgaggccgg cgcgtcgggg cgcggcggga ggcggacgcc gggactgacg gtcagcgcagc 44100
 gccgggcccg cgggccaggg cgcgcagctt ggctttgatg tcccgcgggg tctccaacga 44160
 gtcgtcgtcc gccaggagcc ggacgatcga catcaccttg gcgtccgcgg cgtccaccga 44220
 gtcgtgctgg atggtctcga tacggcggat gccggccgtg gatgtggaat gcgggtagaa 44280
 catgcccgcc ggggtgcttga cgcggttgc acggtccgcg agccagatgt aggccatgcg 44340
 cagcgcggcg gcctgatggg ccggatcgtt gtcgcacagt tcccgcataga agacggagaa 44400
 cgcacggcag tgccgggcct cgtcgcgggc caggagccgc cagattctgc ggatcaccgg 44460
 ctccgacaca tgggcggcga gcgccttga gagggcggac gcgcgtgact ccgagatcac 44520
 gttcatcatg aggggtggcg agcgcacgtc gccctgcgga tacggctctc gttttagag 44580
 cgcgtgcttc gaacggagtg agaccccgat ccggtccagg tagcgggcct ggaccagtga 44640
 gtgccgggat tcctccgcac cccattgcag tgcccaggag gagaagctga cctcgtcctg 44700
 ccattcccgc aggaagttgt gagcgcggg tagggtgccg aactcgatga cggccgcctc 44760
 ggtgaggaag tccacggctc gttcgtcgcag catgccgtgc tcgatgcggc ccaggctccac 44820
 ctcgggtccag tcccagcgcg tcgtctcga ccagtcgaag atcttgttga aggtcatgctc 44880
 gaggtagtag tcggtgtaga ggtcgtccgt catcagcgcg cgggtgcgcc gcagggccag 44940
 ttcgaccgag gtggtgaacc ctccgggcgc caccgcggcg ggccggacga tgtcctogac 45000
 gtccagtgtc tccgcccagc cgggaaccgg gcccgccgta tcgggcccga cgacgtacac 45060
 ccgggtccgg ttgaacttcg agtgcgaccg cagcgcggcg acggcgggca gcggctoggc 45120
 gtcgccccg atccacaccg ccgcgagctc ggatgacggc tcgaactcgt gcaggtagcg 45180
 gtgccagtcg gcgtgtgccg gccggtccac ggtgacgtcg ccgaaggcgg ggacgggtgag 45240
 ctttcggcg ggggagactg cgggtggtgg tgccagcagg gcgatggtgt gcgggggcac 45300
 ggagggcgct ctctctgtcg gtctgcgcag gccgtcggcg agcaccttgc cgcgcgttgt 45360
 gtggggctcg gctccgtaac acgtgcgtgc cgcgacgtca gagccgcccg tactccgcgg 45420
 cagggccgag gactacgggc aggcctcga tgctgttgc gacgaacgag ggcacgggccc 45480
 gcacgggtcca cgtgtcggac ggggccagcc gcacgtcggg gaaccgggtg aagaatccgg 45540
 ccagtgccgt ctccagctgg agacgggcca ggtgtgtccc gatacagaag tgcgggccgt 45600
 gcccgaaacc gaggtggccg gcctgccgcc ggcggacgtc gaagaggtcc gcgtccggcc 45660

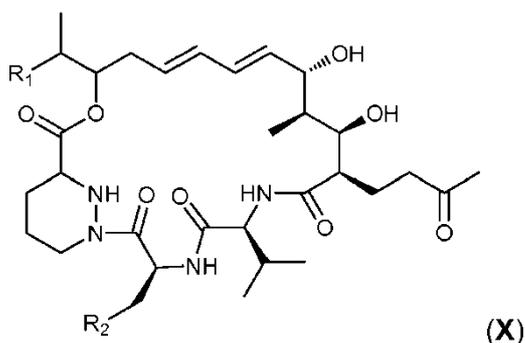
ES 2 639 918 T3

cgtggtgcbc cgggtcccgc cccgccgagc cgaaggacgc gaggatggct tctccccggt 45720
 ggatcgtctg gccggcgatg acgacgtcct cggtcgggta gcgcatcggg aactggttca 45780
 ccgcgccggt ccagcgcacg gtctcctcga ccaccgcact ccacgggacc tccccggcgc 45840
 gggcggaggc cagttgctcg gggtaggtga gcagcgcgtg gcagggcgtg acgagtacgt 45900
 tgatgacgct ctggtggccg gcgaagaaca tcagcaggat catgccgtgc agttcgtctg 45960
 cggtagaccg gtctctccg tcctggcgtg ccgtgagcag gacgctgatg aggtcgtccc 46020
 gggggacgtc gcgacgttcg gcgacgatct cccggagcag cgcttcgatc cgtccgtcga 46080
 tctcctggac ctgttcgggg gagttgttcg tacgggtctg catgccggtg agcacgtgca 46140
 gcagacgccg cttgcgctgc gggatcccca gcaggtccga gatgacggtg gtggggatgg 46200
 ggtaggcgaag agccttgccg agatccaccg gccggctctc cggccgtgtg gcgagctggt 46260
 cgaggagccc gtcgacgagg cgttcacccc cggggcgcac gccctccacc cgttcggggg 46320
 tcagtgcctg gtcgaccagt ccgcgcagcc gccggatgat cgcgccgtgc gaattgatga 46380
 cgctgtcggg cgcgacgaag cccatcaacg gccaccgctc cggcacttcg ccgcgggccc 46440
 ctgcctcca gtgcgtgatt cccttggcga ccctgggatc cgtcagcact cggcgcaggt 46500
 cctcgtggtg cggaatcgcc cacgcccgca caccgccggg gagttggacc ggaacggctc 46560
 tccccgccgc ccgcaggcgg gcgttctccg cgtgct 46596

REIVINDICACIONES

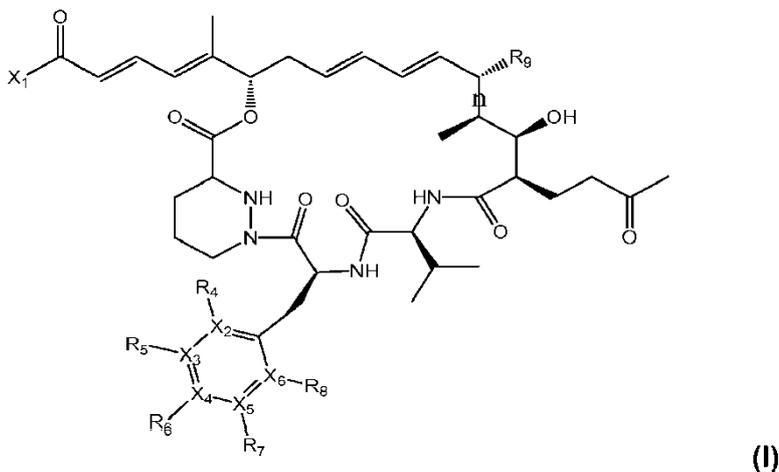
1. Forma de dosificación farmacéutica para administración oral que comprende una sangliferina como principio activo en la que el principio activo de sangliferina está protegido frente a degradación ácida proporcionando una capa de recubrimiento entérico, siendo dicho recubrimiento entérico estable en el entorno ácido del estómago, y adaptado para liberar el principio activo en el entorno de pH superior del intestino delgado, y en la que el principio activo de sangliferina se selecciona de

A. un compuesto de fórmula (X) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la que R_1 representa un resto orgánico y R_2 representa un grupo arilo o heteroarilo opcionalmente sustituido; incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación del ceto en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol;

B. un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la que:

el resto X_1 representa $-OR_1$, $-NR_1R_2$ o R_3 ;

R_1 , R_2 y R_3 representan independientemente alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquilcicloalquenilo, alquenilcicloalquilo, alquenilcicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 , R_2 y R_3 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 , R_2 y R_3 están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

o R_1 y R_2 están unidos de tal manera que NR_1R_2 representa un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno especificado y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo adicional seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente

sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo;

5 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R_1 , R_2 y R_3 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

o R_1 y/o R_2 representa hidrógeno;

10 R_9 representa H u OH;

n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R_9 representa H;

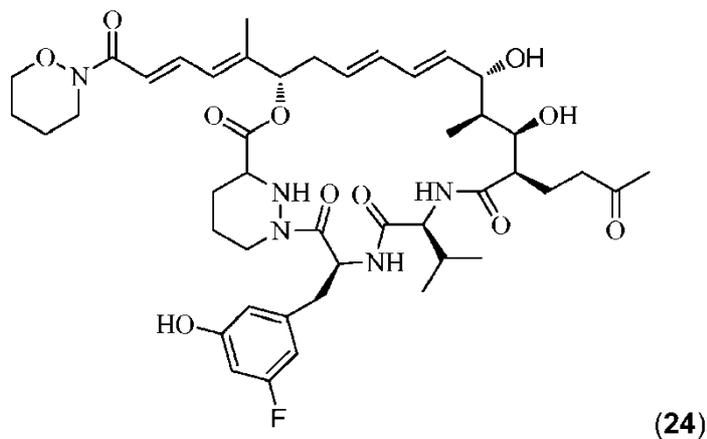
15 R_4 , R_5 , R_6 , R_7 y R_8 representan independientemente H, F, Cl, Br, alquenoilo o alquilo en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

20 X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

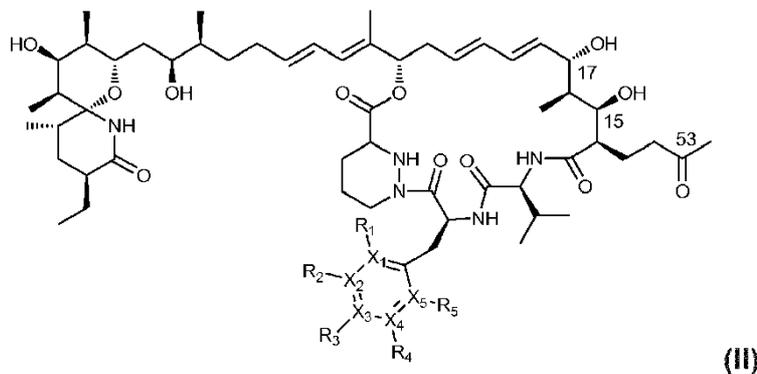
con la condición de que cuando todos de R_4 , R_6 , R_7 y R_8 representan H y todos de X_2 , X_3 , X_4 , X_5 y X_6 representan C, entonces R_5 no puede representar OH, -O-alquilo u -O(CO)-alquilo;

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

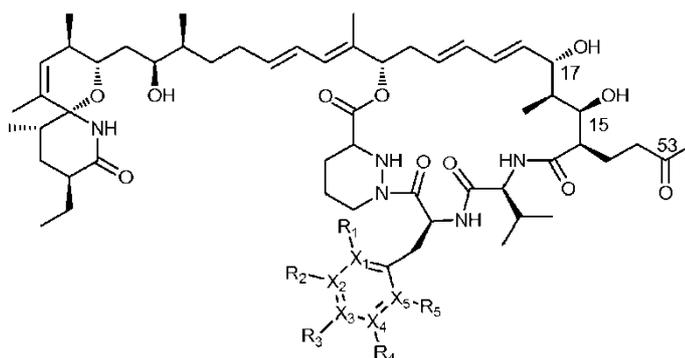
30 C. compuesto 24 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



D. un compuesto de fórmula (II) o (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



35



(III)

en la que:

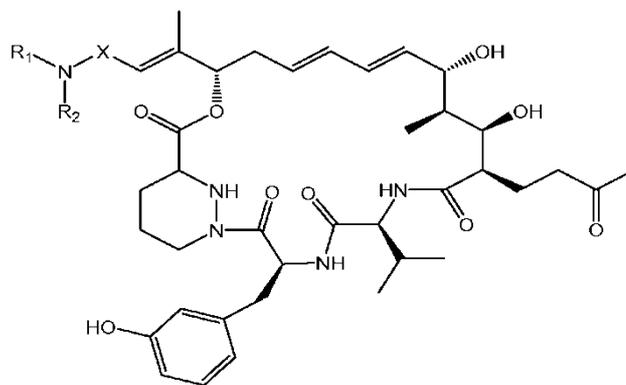
5 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C_{2-6} o alquilo C_{1-10} en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más átomos de halógeno;

10 X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

15 con la condición de que cuando todos de R_1 , R_3 , R_4 y R_5 representan H y todos de X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 representan C, entonces R_2 no puede representar OH;

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

E. un compuesto de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(IV)

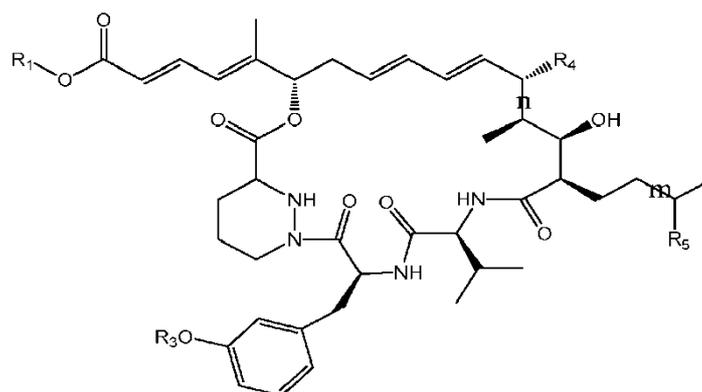
25 en la que:

X representa CH₂ o CO

30 R_1 y R_2 representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alqueno que pueden estar opcionalmente unidos 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 R_1 y/o R_2 están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p 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 opcionalmente sustituidos por carbonilo; o uno de R_1 y R_2 representa -alquilarilo, -alquenilarilo, -alquilheteroarilo o -alquilheteroarilo y el otro representa H, alquilo o alqueno;

35 incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un acetal mediante la combinación del ceto en C-53 y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol;

40 F. un compuesto de fórmula (V) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(V)

en la que:

5 R₁ representa alquilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilcicloalquilo, alquilcicloalquenilo, alquenilcicloalquilo, alquenilcicloalquenilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenilheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

10 o R₁ representa hidrógeno;

y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

15 siempre que R₁ no represente metilo o -CHMe₂;

y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R₁ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

20 R₃ representa H o (CO)_x-alquilo;

R₄ representa H u OH;

25 R₅ representa H, OH o =O;

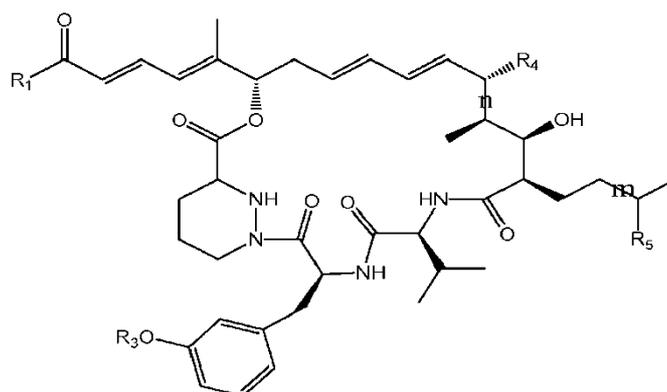
n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R₄ representa H; y

30 m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R₅ representa H;

x representa 0 ó 1;

35 incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del ceto en C-53 (si está presente) y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol;

40 G. un compuesto de fórmula (VI) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(VI)

en la que:

5 R_1 representa alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquenicicloalquilo, alquenicicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquilarilo o alquiliheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

10 y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 salvo porque el átomo adyacente al grupo carbonilo al que está unido R_1 no es O ni N y en la que uno o más átomos de carbono de R_1 están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

15 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R_1 pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

R_3 representa H o (CO)_x-alquilo;

20 R_4 representa H u OH;

R_5 representa H, OH o =O;

25 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R_4 representa H; y

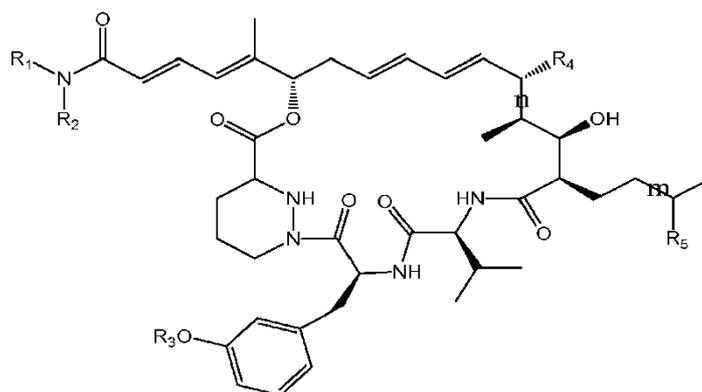
m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R_5 representa H;

30 x representa 0 ó 1;

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

35

H. un compuesto de fórmula (VII) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(VII)

en la que:

5 R₁ y R₂ representan independientemente alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilcicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

10 o R₁ representa hidrógeno; y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R₁ y/o R₂ están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

15 o R₁ y R₂ están unidos 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 opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo;

20 y en la que uno o más átomos de carbono de un grupo R₁ y/o R₂ pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

R₃ representa H, -(CO)_x-alquilo;

25 R₄ representa H u OH;

R₅ representa H, OH o =O;

30 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R₄ representa H; y

m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R₅ representa H;

35 x representa 0 ó 1;

incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, 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 del cetol en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

40 2. Forma de dosificación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el principio activo está particulado y el recubrimiento entérico se aplica a las partículas de principio activo.

45 3. Forma de dosificación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el principio activo está en forma de un granulado, y el recubrimiento entérico se aplica a los gránulos de principio activo.

4. Forma de dosificación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el principio activo se recubre sobre una perla y el recubrimiento entérico se aplica a la perla recubierta.

50 5. Forma de dosificación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el principio activo está contenido dentro de una cápsula, estando dicha cápsula dotada de un recubrimiento entérico.

6. Forma de dosificación farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el principio activo está contenido dentro de un comprimido, estando dicho comprimido dotado de un recubrimiento entérico.

55 7. Forma de dosificación farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de infecciones virales, especialmente infecciones por virus de ARN, tales como infección por VHC o VIH, o para su uso como agente antiinflamatorio o para la profilaxis de rechazo de trasplante de órgano, mediante administración oral.

60

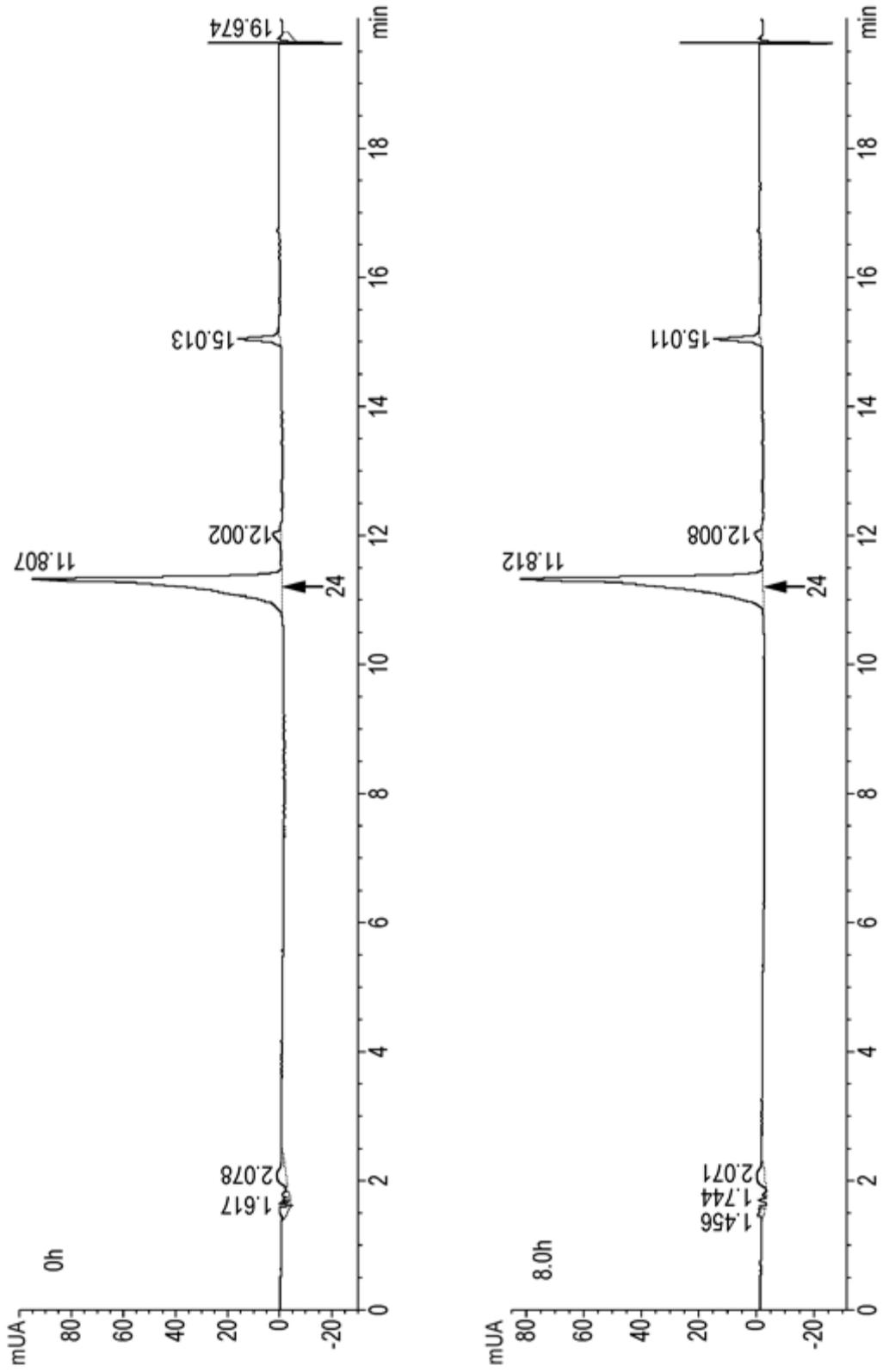


FIG. 1A

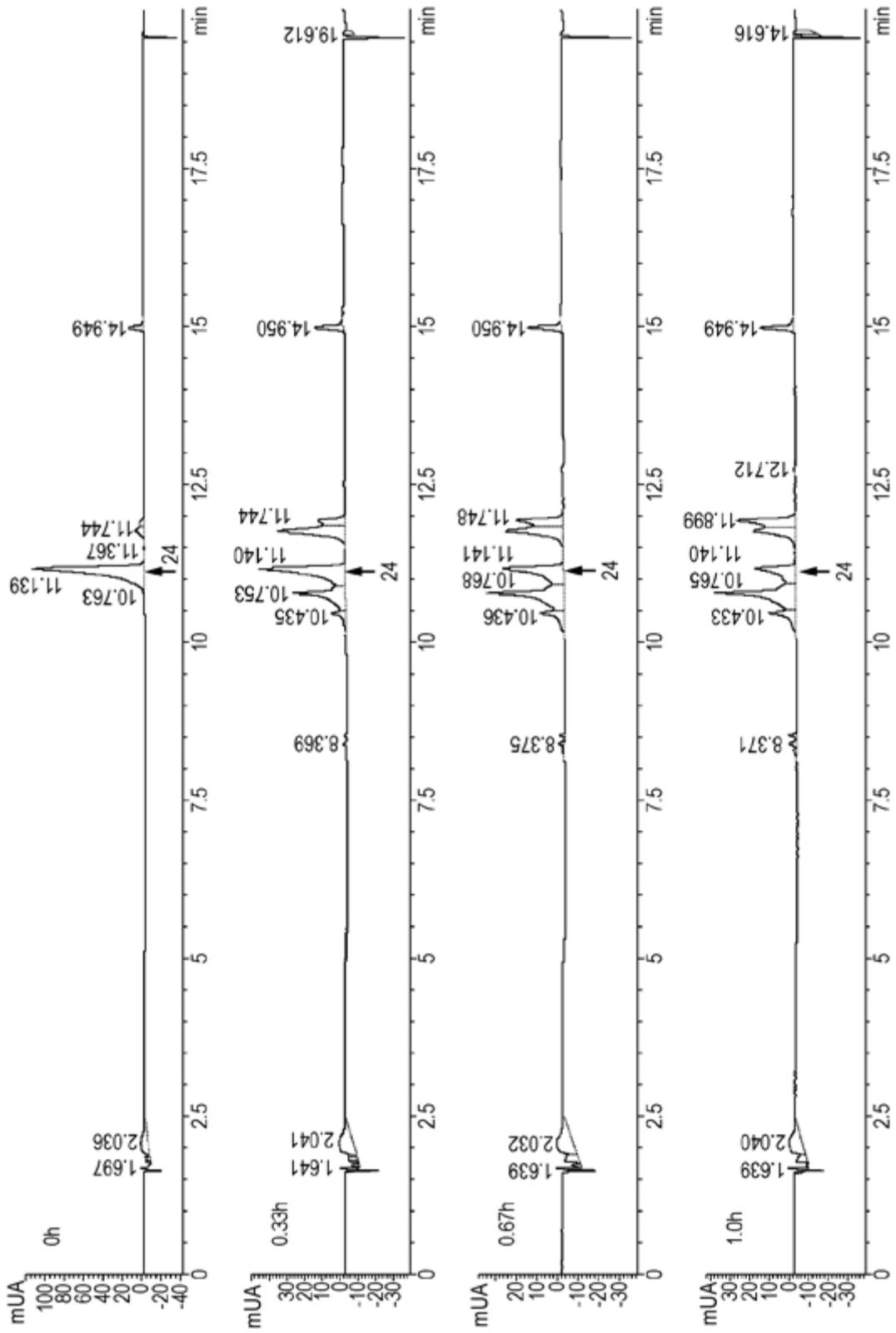


FIG. 1B

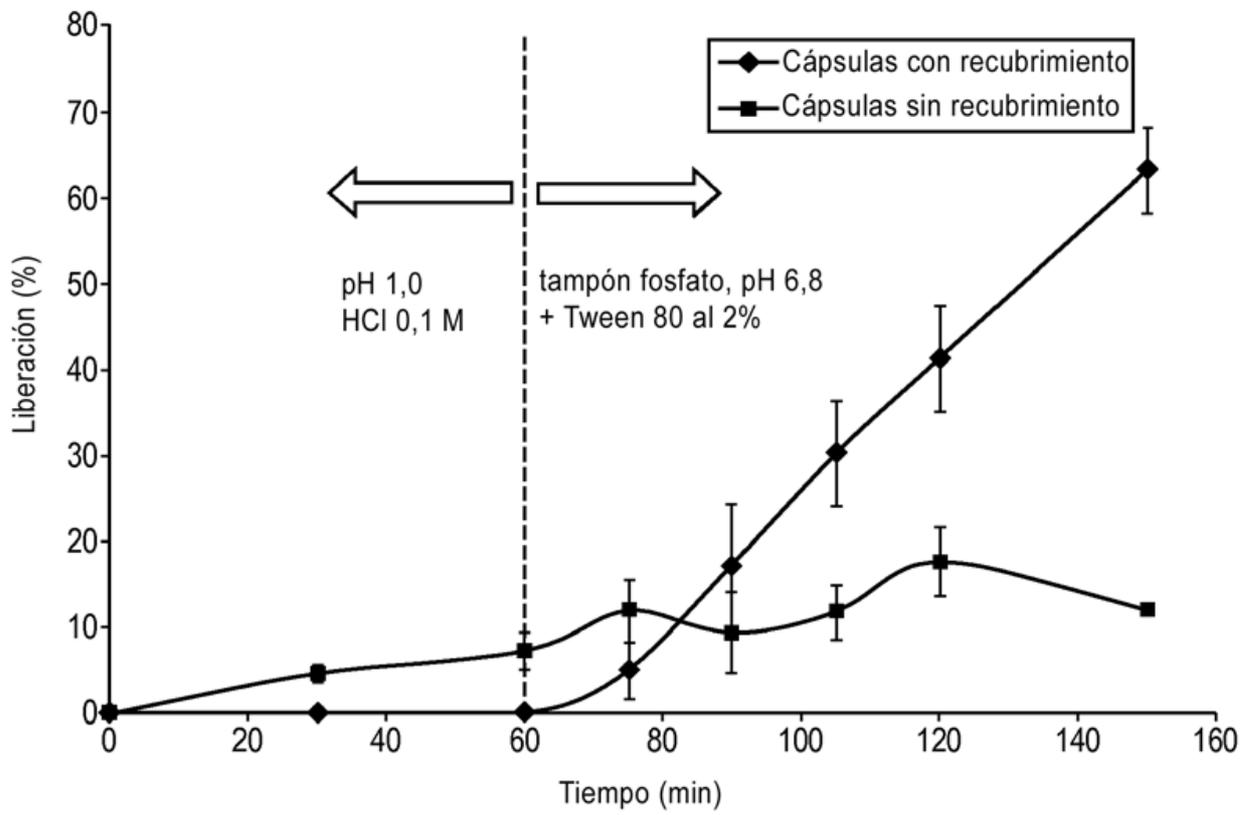


FIG. 2