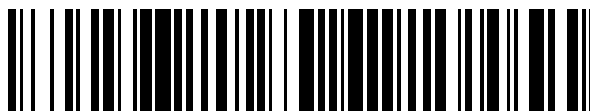


19



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

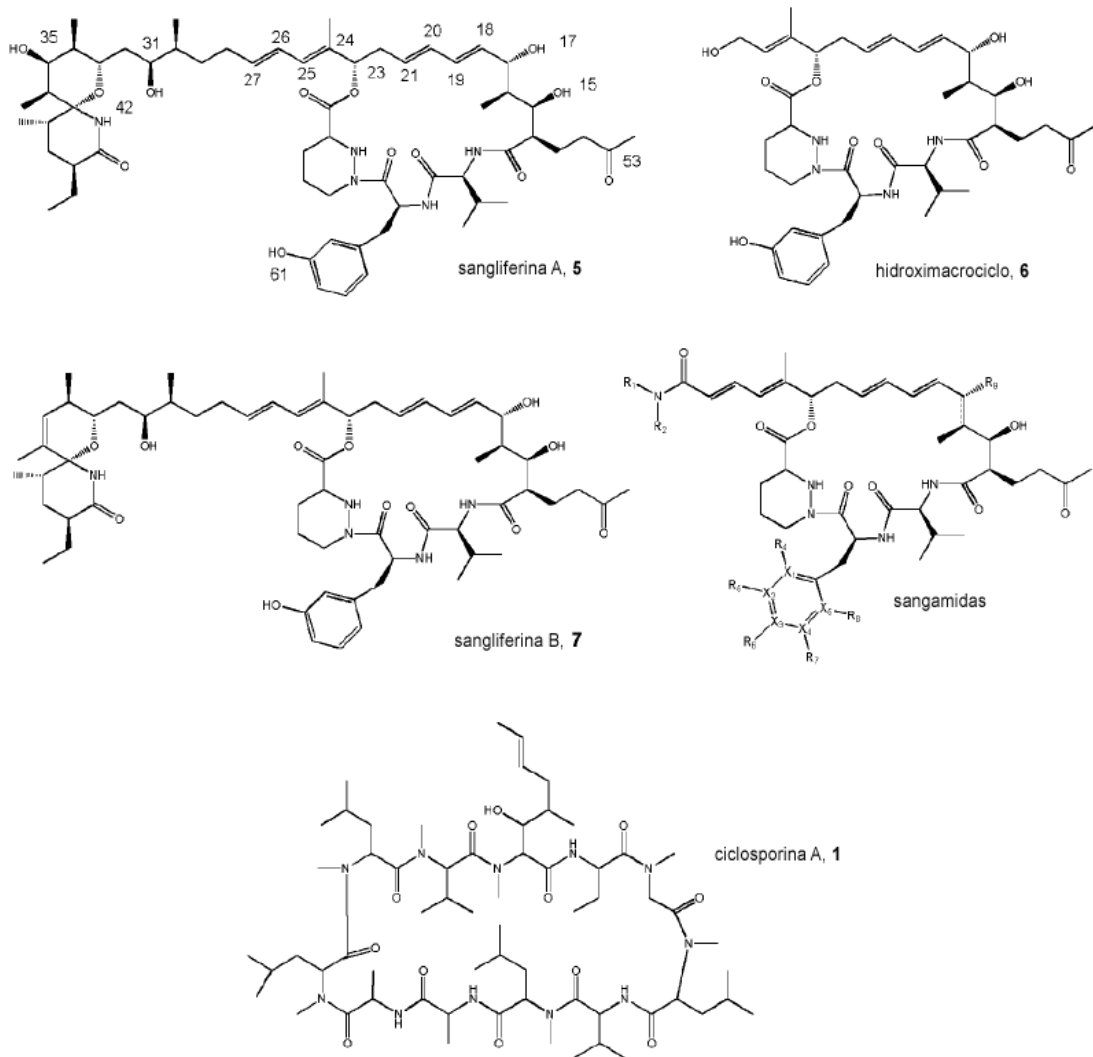
**5 Introducción**

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  $\geq 1$  log<sub>10</sub> 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  $\mu$ M), mientras que Xie *et al.*, 2007 describieron algo de actividad de CsA frente a VHB (CI50 >1,3  $\mu$ 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  $\text{Ca}^{2+}$  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 C<sub>1-6</sub>. "Alquenilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene dos o más carbonos (por ejemplo 2-10 carbonos, por ejemplo un grupo alquenilo C<sub>2-6</sub>) que está insaturado con uno o más dobles enlaces.

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

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 C<sub>1-4</sub>), hidroxilo, CF<sub>3</sub>, halógeno, alcoxilo (por ejemplo, alcoxilo C<sub>1-4</sub>), nitro, -SO<sub>2</sub>Me, ciano y -CONH<sub>2</sub>.

Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen (excepto cuando 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.

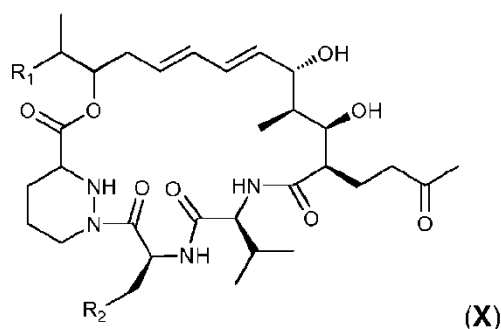
30 En una realización, el principio activo (por ejemplo en forma de polvo) está contenido dentro de un comprimido, estando dicho comprimido dotado de un recubrimiento entérico.

*Sangliferinas*

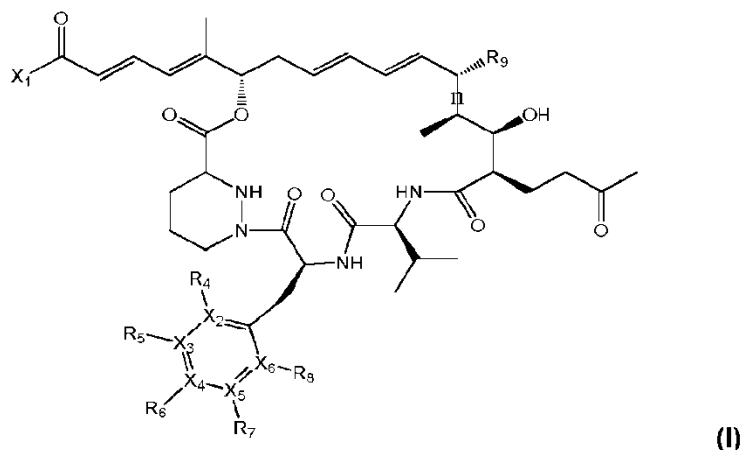
35 En una realización, la sangliferina es una sangliferina natural tal como sangliferina A, B, C o D.

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 cetel mediante la combinación del cetol 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;
- 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;
- 35 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;
- 40



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

$R_9$  representa H u OH;

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

10  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  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)<sub>p</sub> 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;

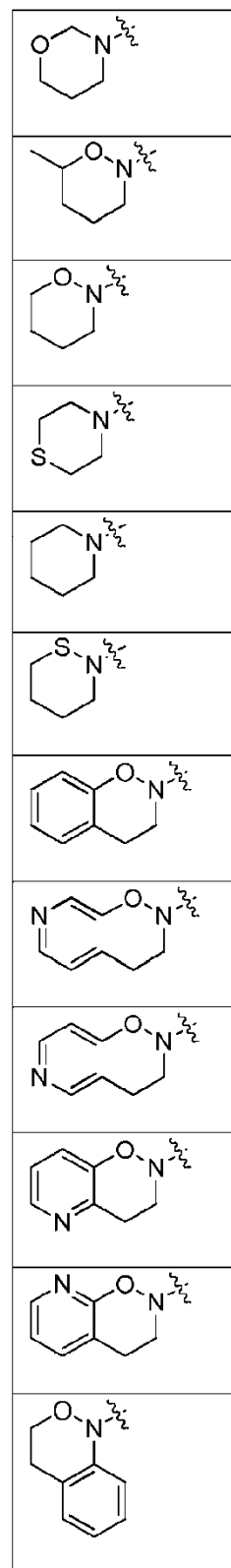
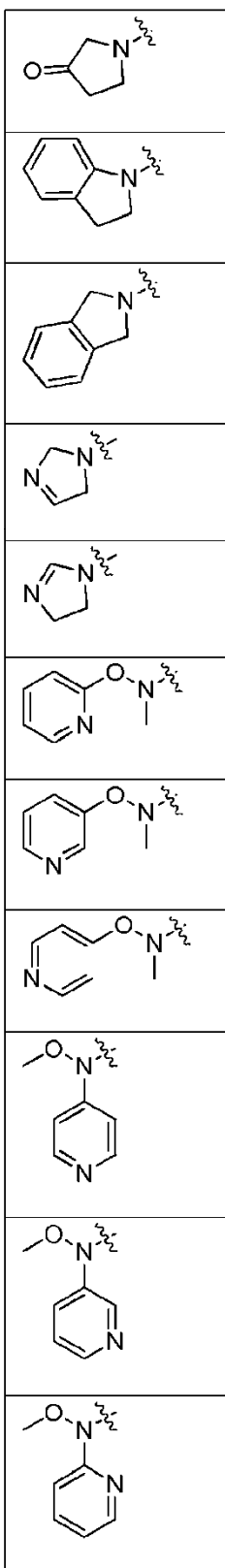
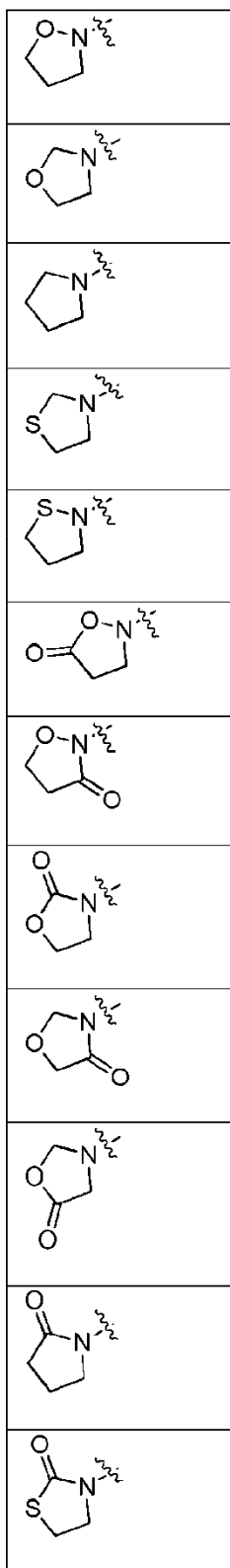
15  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$  representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

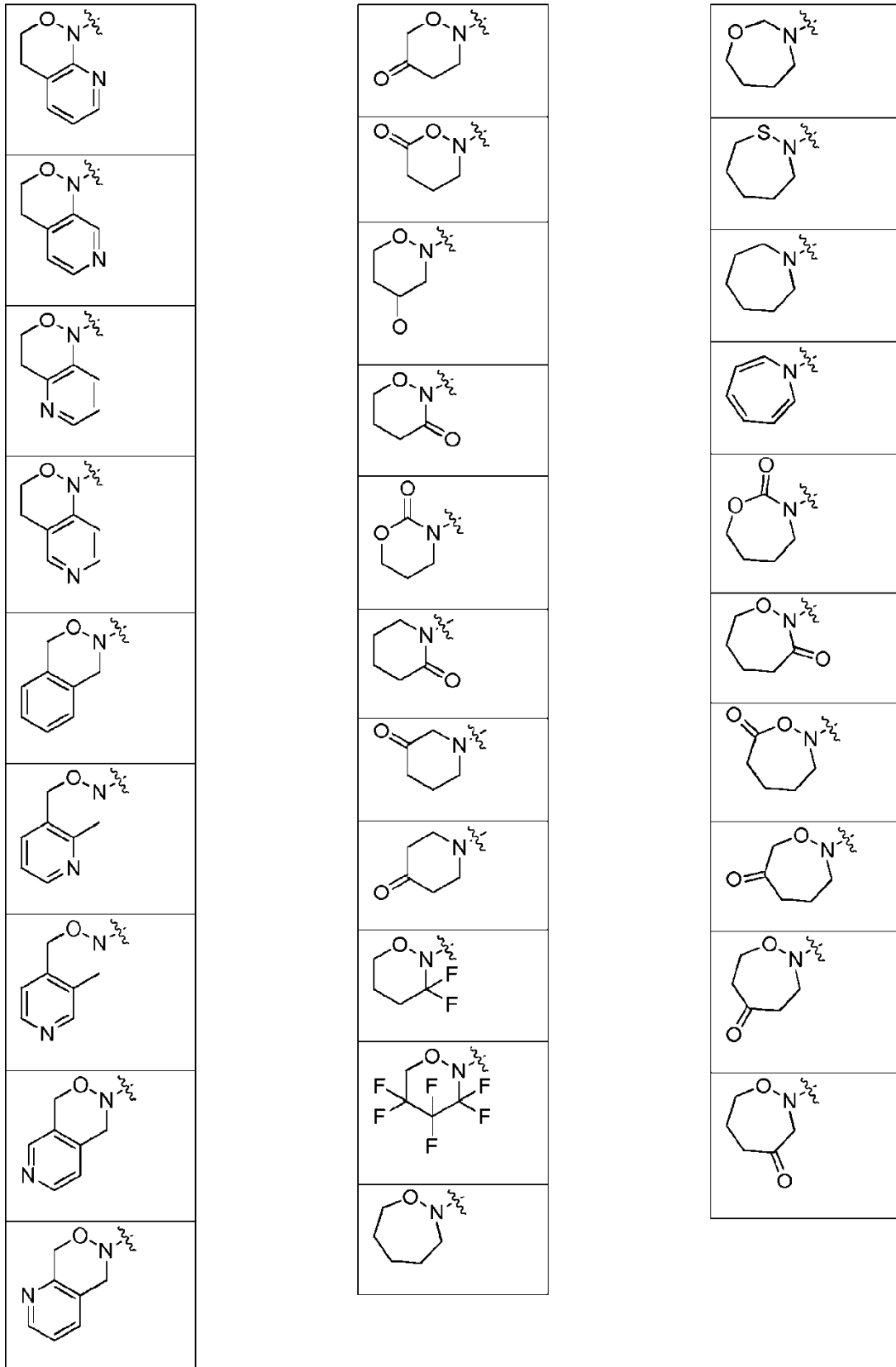
con la condición de que cuando todos de  $R_4$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  representan H y todos de  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$  representan C, entonces  $R_5$  no puede representar OH, -O-alquilo u -O(CO)-alquilo;

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.

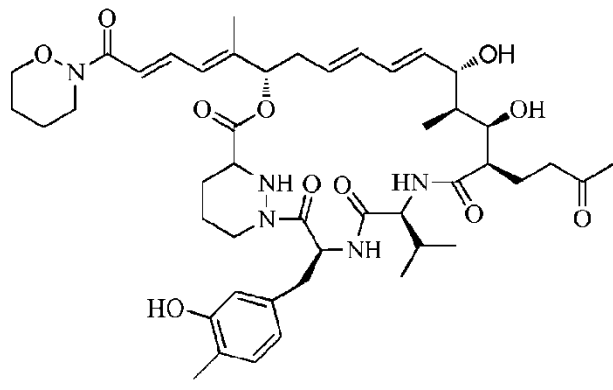
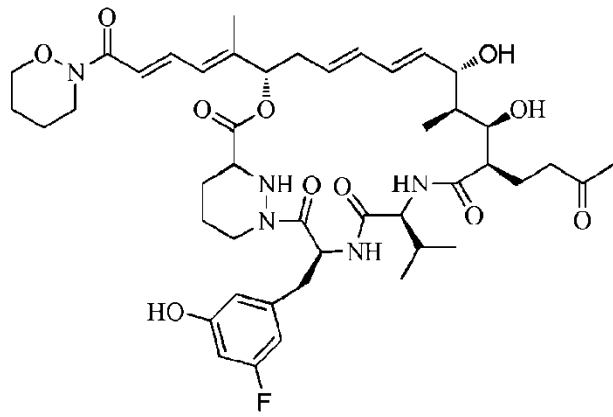
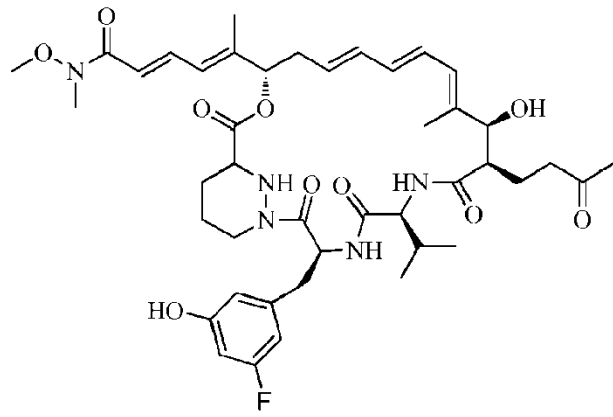
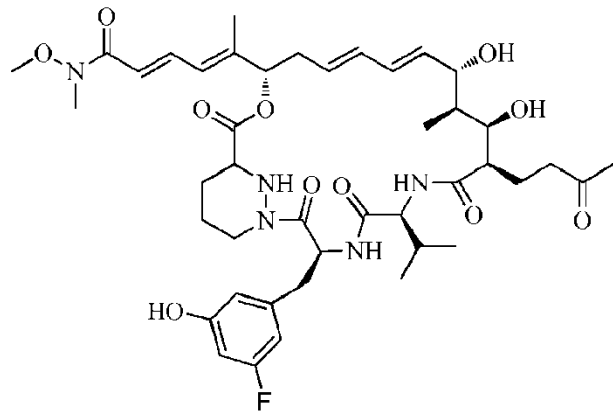
25 Por ejemplo  $n$  representa un enlace sencillo. Por ejemplo  $R_9$  representa OH. Por ejemplo  $X_2$  representa C. Por ejemplo  $X_3$  representa C. Por ejemplo  $X_4$  representa C. Por ejemplo  $X_5$  representa C. Por ejemplo  $X_6$  representa C. Por ejemplo  $R_4$  representa H. Por ejemplo  $R_8$  representa H. Por ejemplo  $R_5$  representa OH. Por ejemplo  $R_6$  representa H, Me o F. Por ejemplo  $R_7$  representa H o F. Por ejemplo  $R_6$  y/o  $R_7$  representa F. Por ejemplo  $X_1$  representa  $NR_1R_2$ . Por ejemplo  $R_1$  representa alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilcicloalquilo, alquilcicloalqueno, alquencilicloalquilo, alquencilicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquencilarilo o alquencilheteroarilo y  $R_2$  representa H, alquilo, alqueno u -O-alquilo. Por ejemplo  $NR_1R_2$  representa morfolinilo, oxazinano o uno de los grupos dados a conocer en la siguiente tabla:

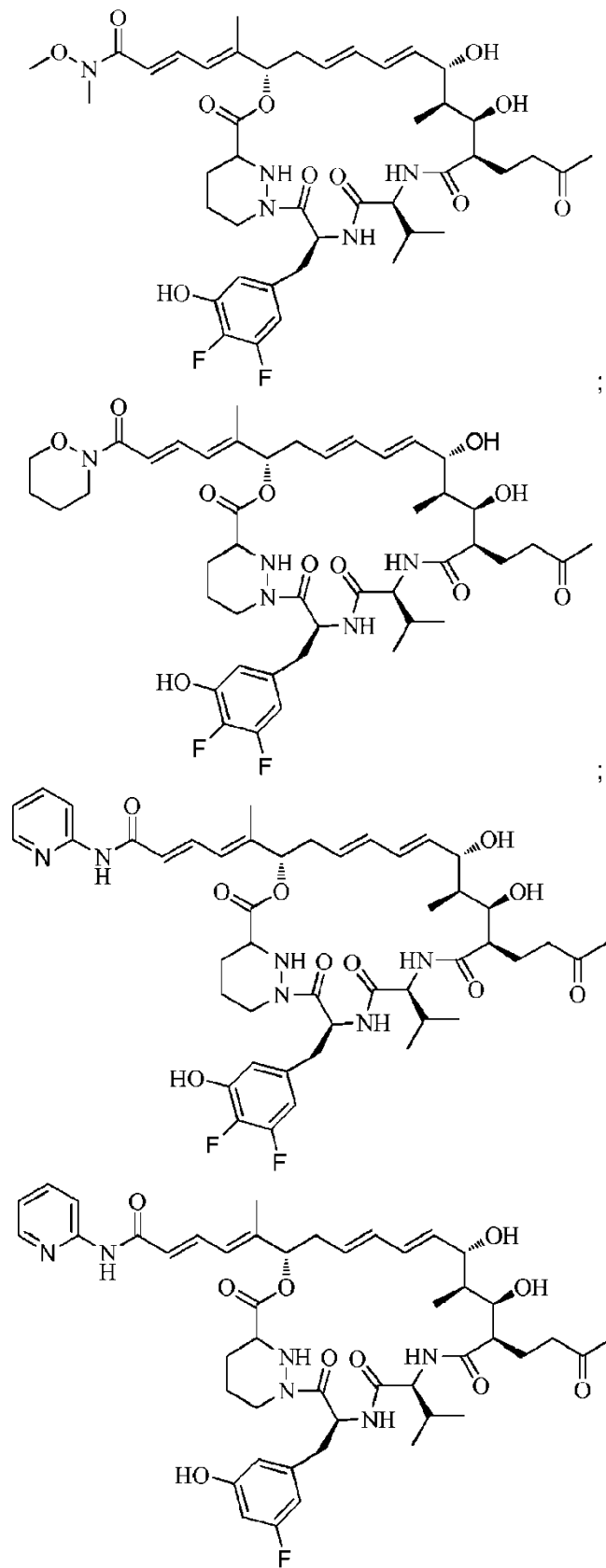
30





Un compuesto de fórmula (I) puede seleccionarse de:





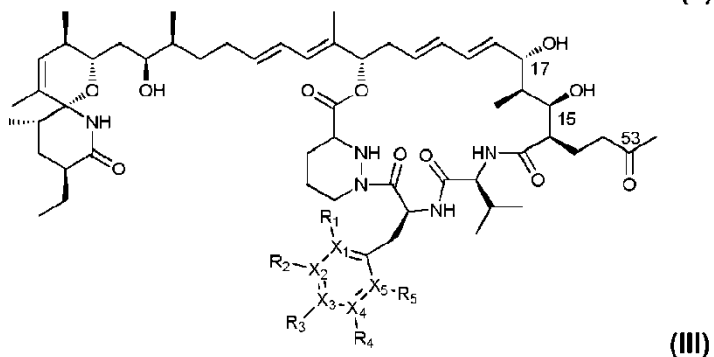
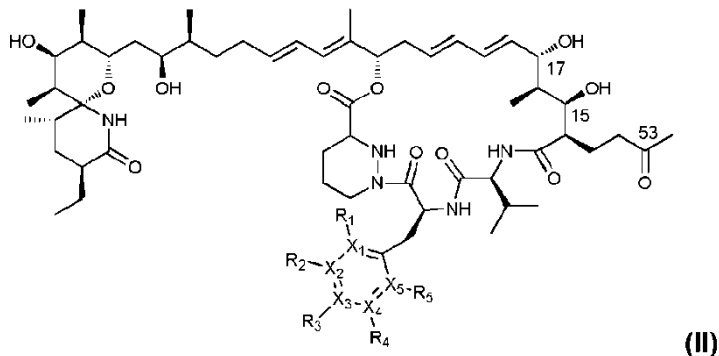
5

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 acetal mediante la combinación del cetona 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: R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C<sub>2-6</sub> o alquilo C<sub>1-10</sub> 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)<sub>p</sub> 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;

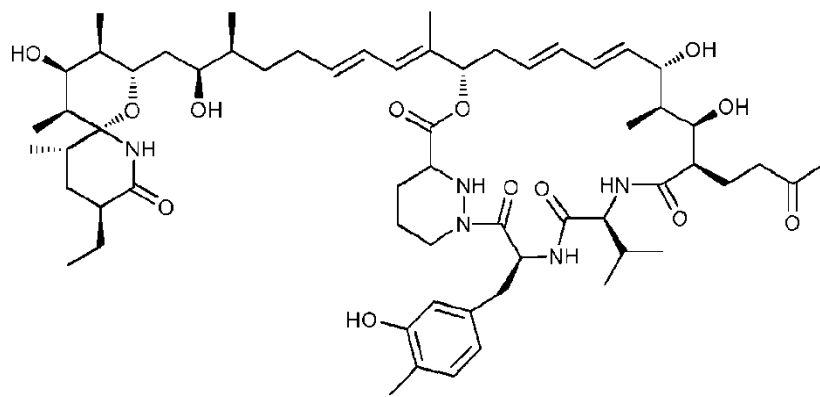
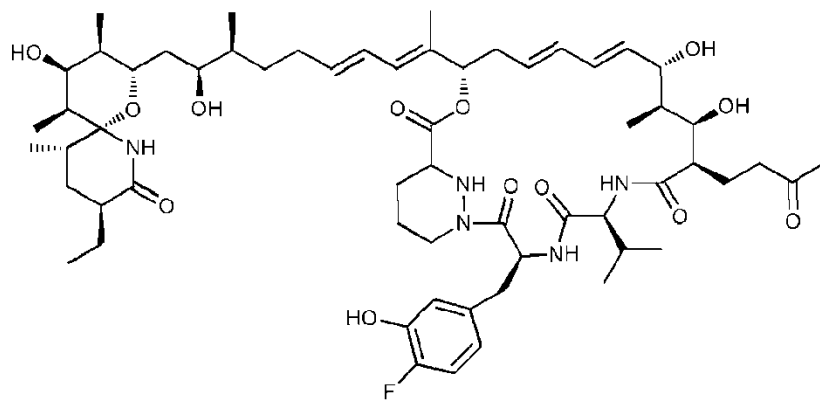
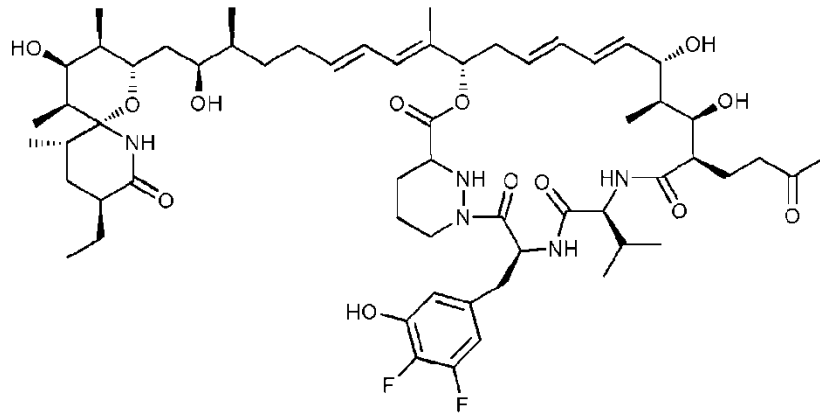
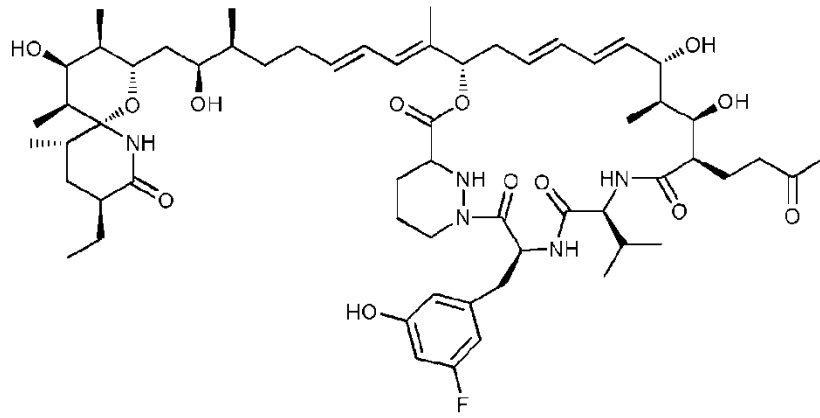
15 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> representan independientemente C o N, y en el caso en el que cualquiera de estos grupos representa N el sustituyente unido está ausente;

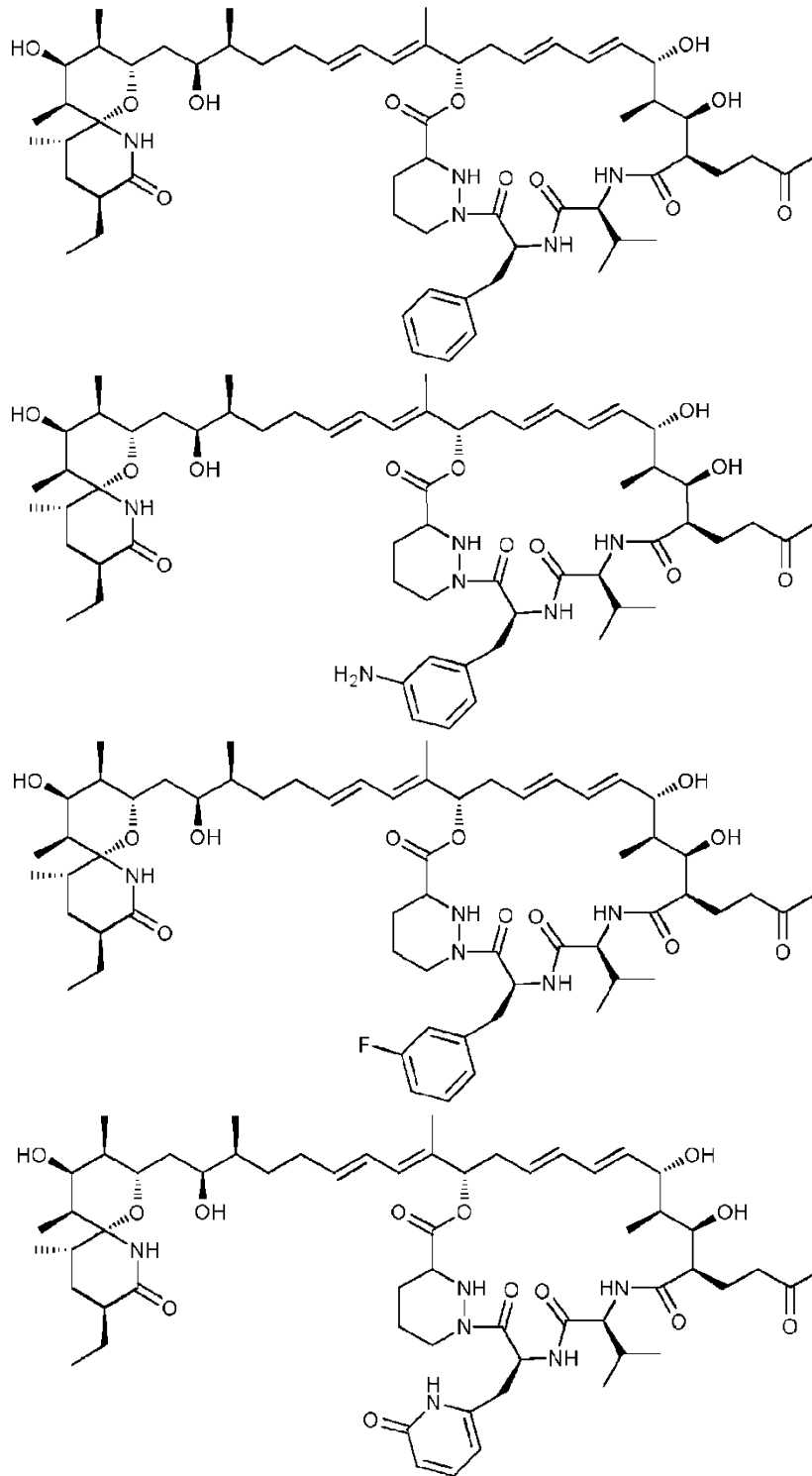
20 con la condición de que cuando todos de R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H y todos de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> representan C, entonces R<sub>2</sub> no puede representar OH;

incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, mostrado como trans es cis; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación del cetona en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

25 Por ejemplo X<sub>1</sub> representa C. Por ejemplo X<sub>2</sub> representa C. Por ejemplo X<sub>3</sub> representa C. Por ejemplo X<sub>4</sub> representa C. Por ejemplo X<sub>5</sub> representa C. Por ejemplo R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> se seleccionan independientemente de H, F, Cl, CF<sub>3</sub>, OH y alquilo C<sub>1-6</sub>. Por ejemplo R<sub>2</sub> se selecciona de H, F, Cl, CF<sub>3</sub>, OH, NH<sub>2</sub> y alquilo C<sub>1-6</sub>. Por ejemplo R<sub>2</sub> representa OH.

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

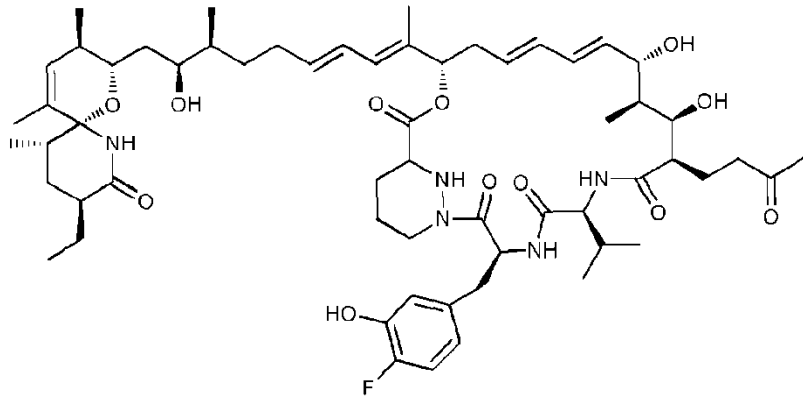
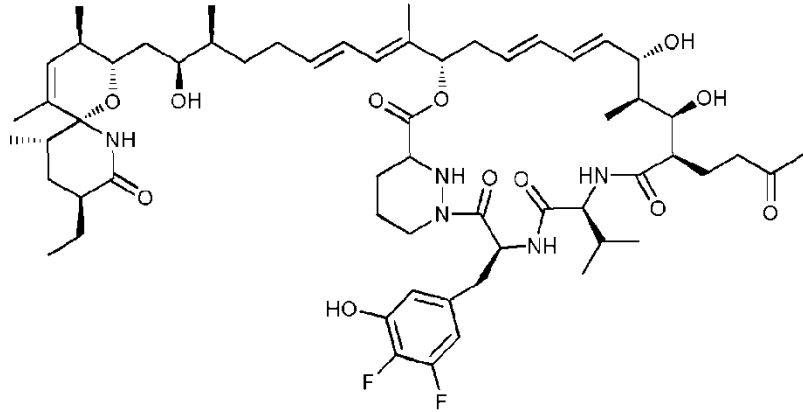
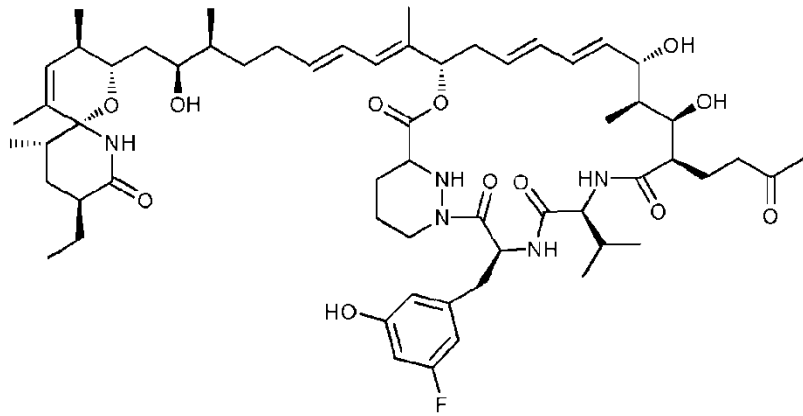
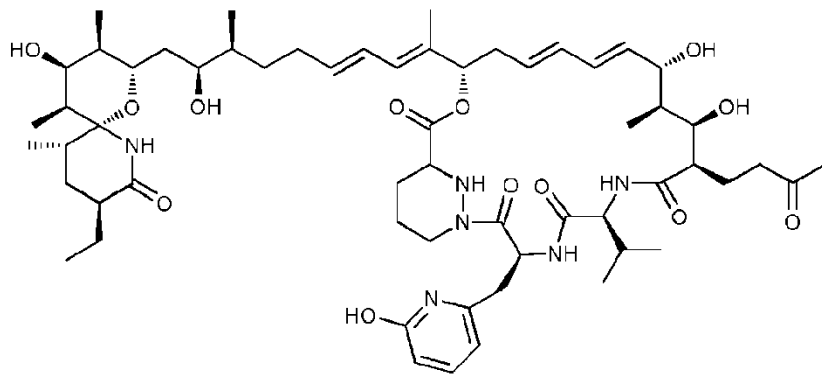


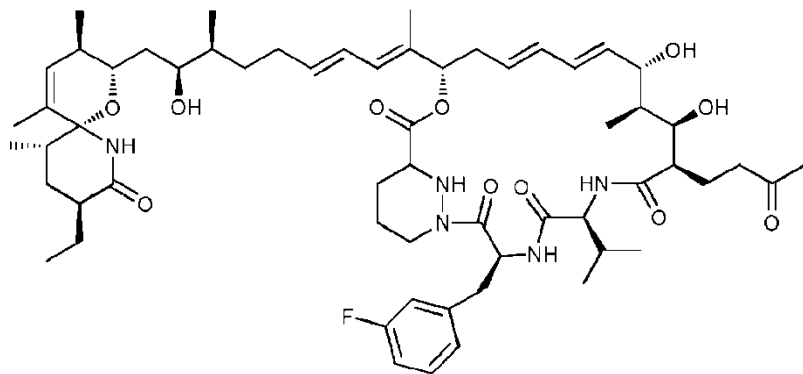
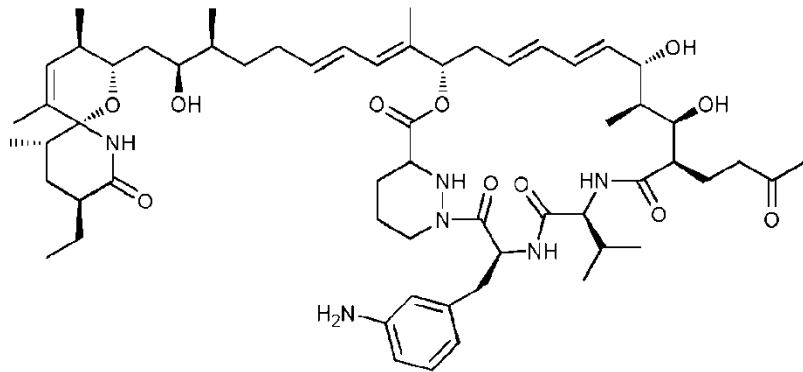
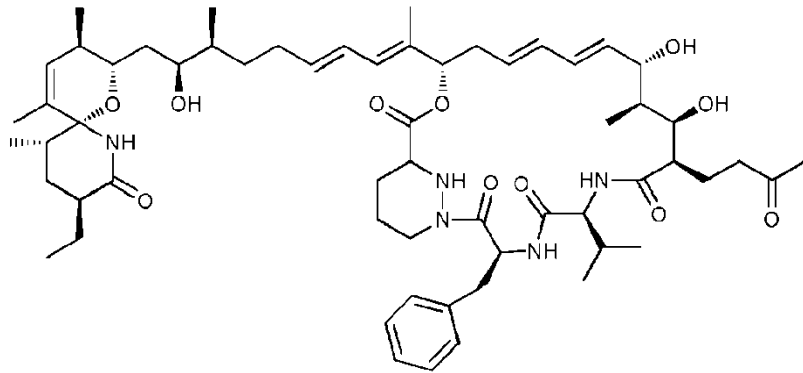
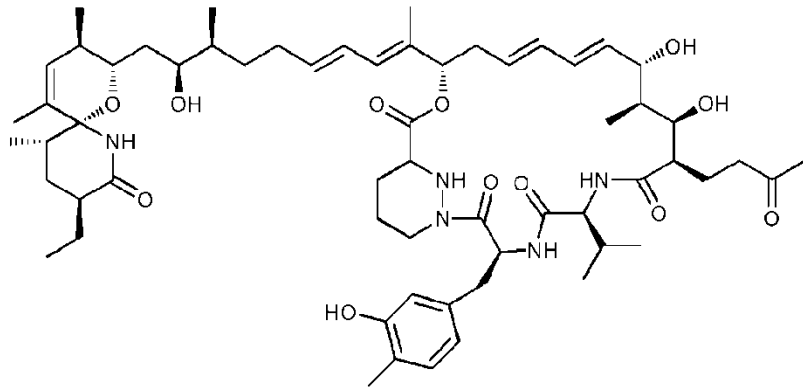


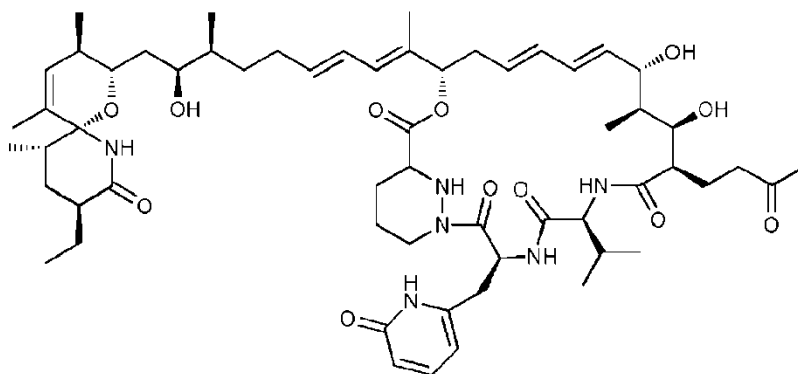
5

lo que también puede representarse como

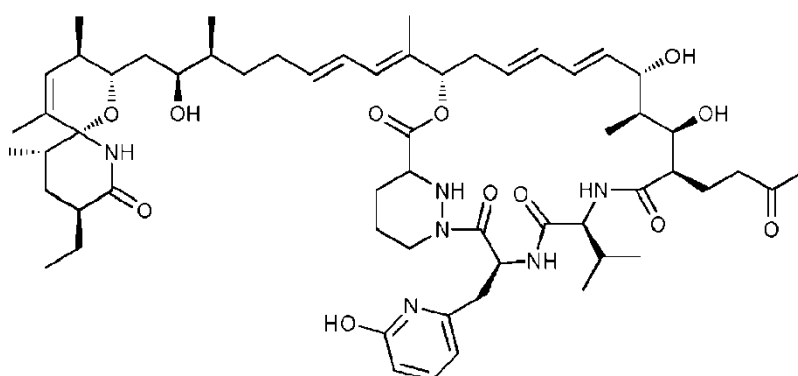








y que también puede representarse como:



5

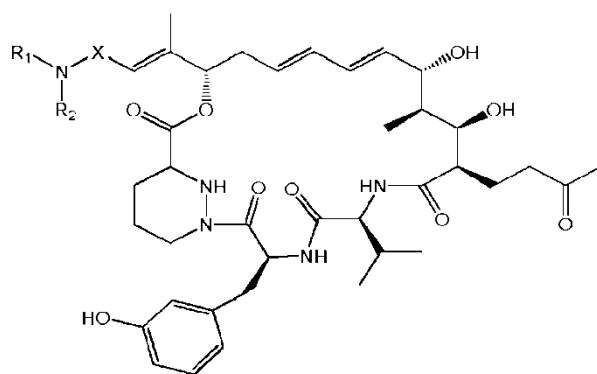
incluyendo cualquier tautómero del mismo; o un isómero del mismo en el que el enlace C=C, C26, 27, mostrado como trans es cis; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación del ceto en C-53 y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol;

10

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

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

15



(IV)

en la que:

20 X representa CH<sub>2</sub> o CO

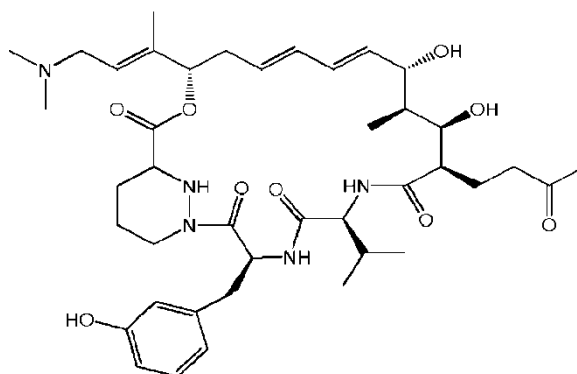
R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alquenilo que pueden estar opcionalmente unidos para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado que contiene el átomo de nitrógeno mostrado y en la que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o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

25

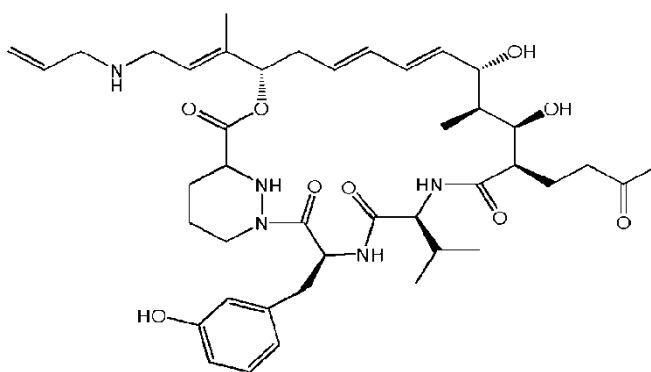
incluyendo cualquier tautómero del mismo; e incluyendo un aducto de metanol del mismo en el que se forma un acetal mediante la combinación del ceto en C-53 y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

5 Por ejemplo,  $R_1$  y  $R_2$  representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alqueniilo 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)<sub>p</sub> 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  $R_1$  y  $R_2$  representan independientemente un grupo alquilo o alqueniilo 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)<sub>p</sub> 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 alqueniilo 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)<sub>p</sub>. Por ejemplo, si un átomo de carbono está sustituido por un heteroátomo, está sustituido por N u O. Por ejemplo X representa CH<sub>2</sub>.

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



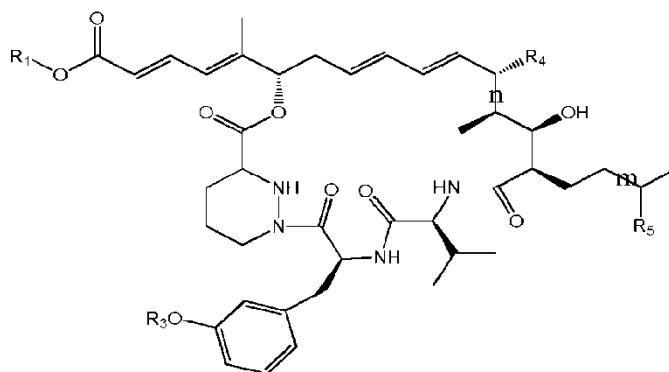
o



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, alquilcicloalquilo, alquilcicloalqueniilo, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquencilheteroarilo, 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)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de  $R_1$  están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

15 siempre que  $R_1$  no represente metilo o -CHMe<sub>2</sub>;

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)<sub>x</sub>-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 ceteno 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, alquilcicloalquilo, alquilcicloalqueniilo, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquencilheteroarilo, 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)<sub>p</sub> 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 -CHMe<sub>2</sub>.

45 Por ejemplo  $R_1$  representa alquilo C<sub>4-10</sub>, alqueniilo, cicloalquilo, cicloalqueniilo, alquilcicloalquilo, alquilcicloalqueniilo, alquencilcicloalquilo, alquencilcicloalqueniilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquencilheteroarilo, 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)<sub>p</sub> 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 C<sub>2-10</sub>, alqueniilo C<sub>2-10</sub> y arilo. Por ejemplo  $R_1$  se selecciona de alquilo C<sub>2-6</sub>, alqueniilo C<sub>2-6</sub> y arilo. Por ejemplo  $R_1$  se selecciona de alquilo C<sub>4-6</sub>, alqueniilo C<sub>2-6</sub> y arilo.

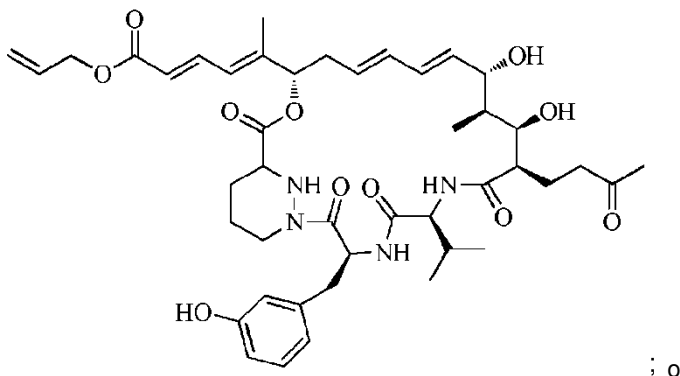
Por ejemplo, independientemente o en cualquier combinación: R<sub>3</sub> representa H o (CO)<sub>x</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, en el que x es tal como se define en la reivindicación 1; n representa un enlace sencillo; m representa un enlace sencillo; R<sub>4</sub> representa OH; y R<sub>5</sub> representa =O.

5

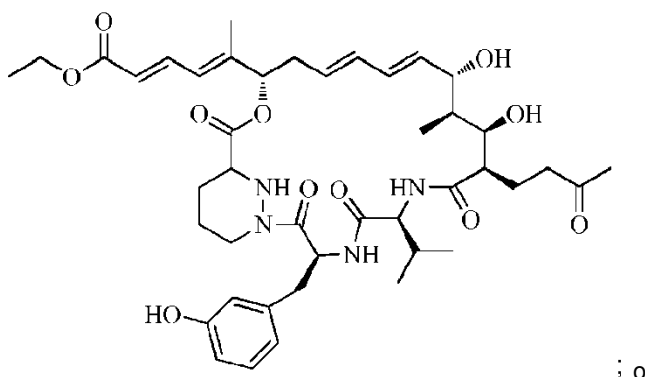
Por ejemplo x representa 0. Por ejemplo R<sub>3</sub> representa H o metilo. Por ejemplo R<sub>5</sub> representa C=O.

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

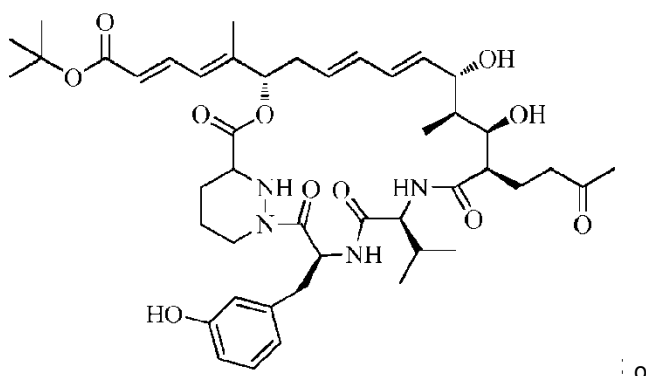
10 R<sub>1</sub> representa CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



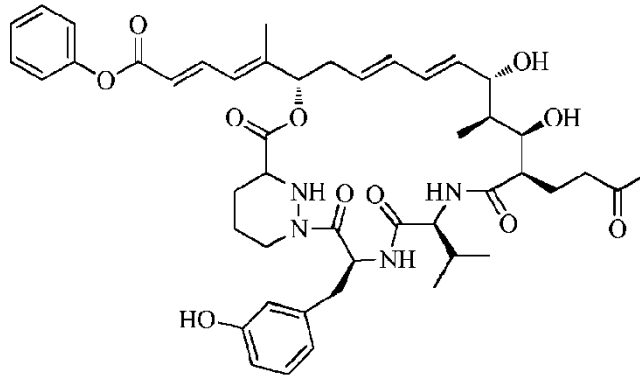
15 R<sub>1</sub> representa CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



20 R<sub>1</sub> representa C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



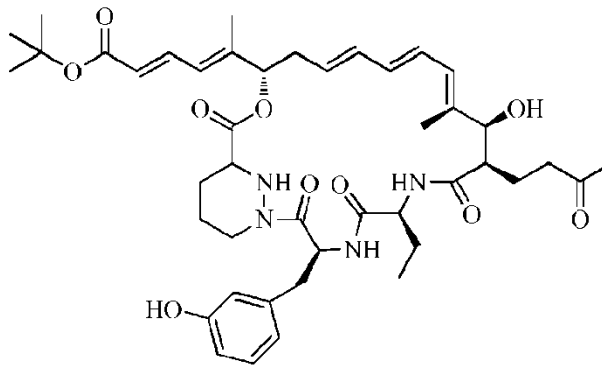
25 R<sub>1</sub> representa fenilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



o

R<sub>1</sub> representa C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un doble enlace, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:

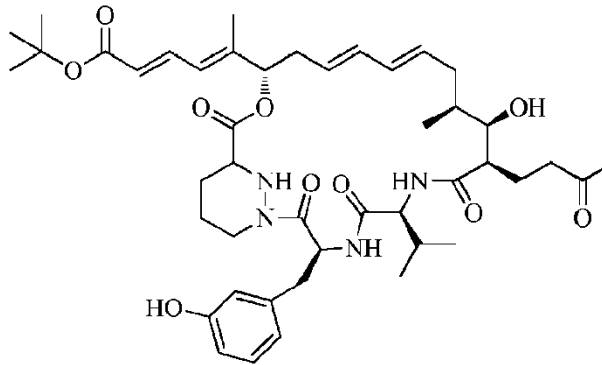
5



o

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

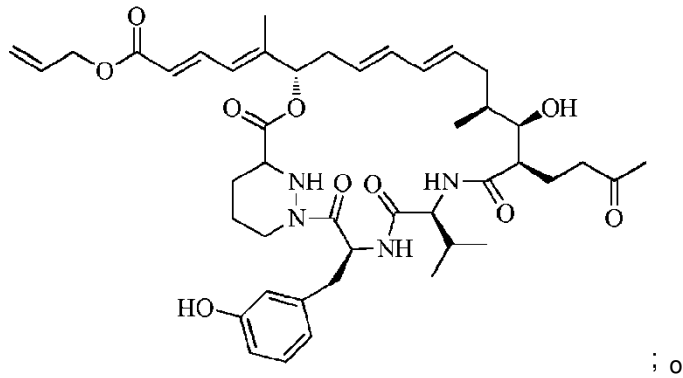
10



o

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

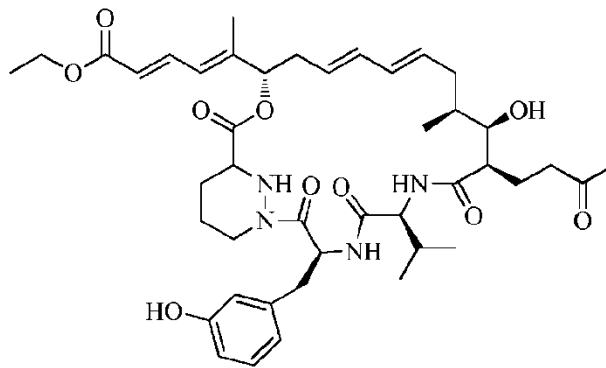
15



; o

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

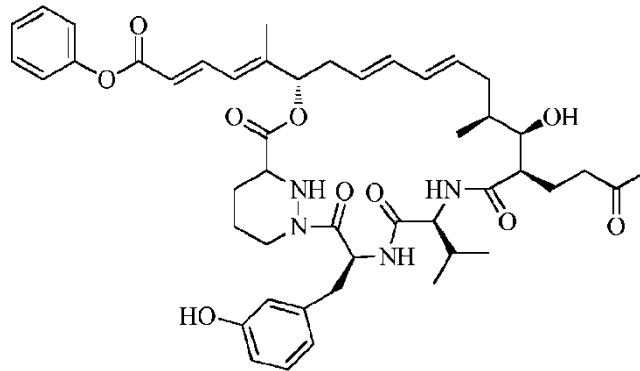
5



; o

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

10



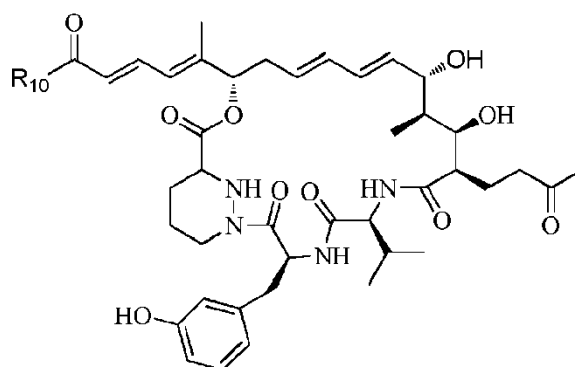
;

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





en la que  $R_{10}$  representa  $-OR_1$  y  $R_1$  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 cetel mediante la combinación del cetó en C-53 (si está presente) y el grupo hidroxilo en C-15 y metanol.

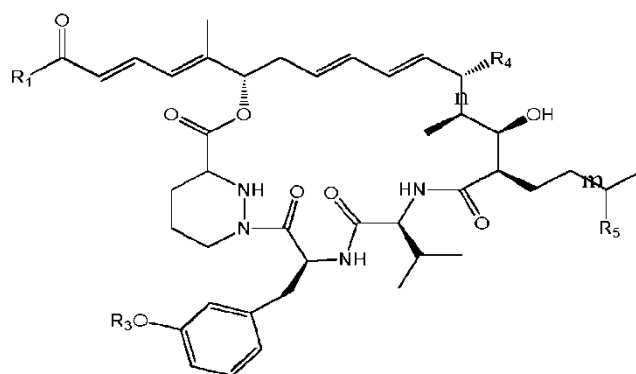
Por ejemplo,  $R_{10}$  se selecciona de un grupo indicado en la siguiente tabla:

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 cetál mediante la combinación del cetó 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.

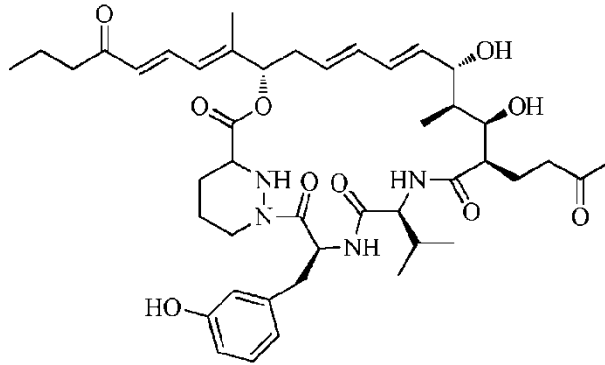
Por ejemplo  $R_1$  representa alquilo  $C_{1-6}$ , alquenilo  $C_{2-6}$ , alquil  $C_{1-4}$ -cicloalquilo  $C_{4-7}$  o alquil  $C_{1-4}$ -cicloalquenilo  $C_{5-7}$ .

45 Por ejemplo independientemente o en cualquier combinación:  $R_3$  representa H o  $(CO)_x$ -alquilo  $C_{1-4}$ ; 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.

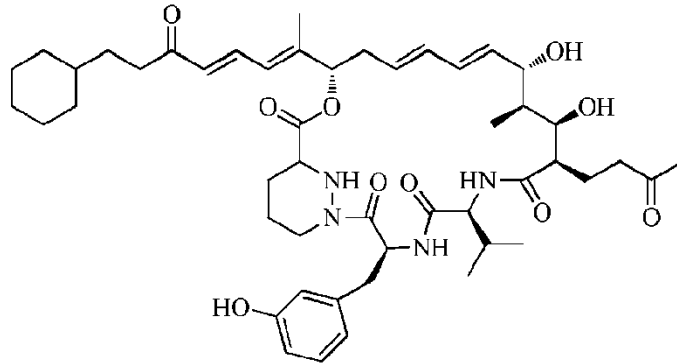
50 Por ejemplo un compuesto de fórmula (VI) se selecciona de un compuesto en el que:

$R_1$  representa  $CH_2CH_3$ ,  $R_3$  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:



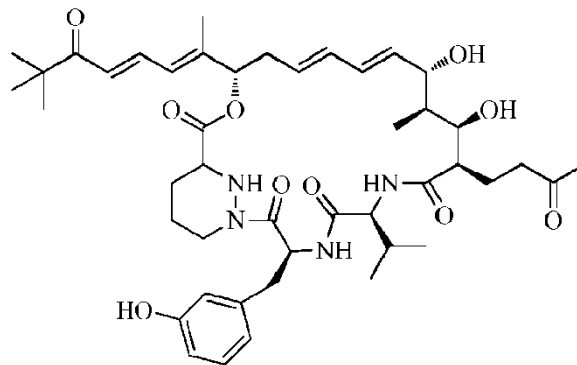
; o

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



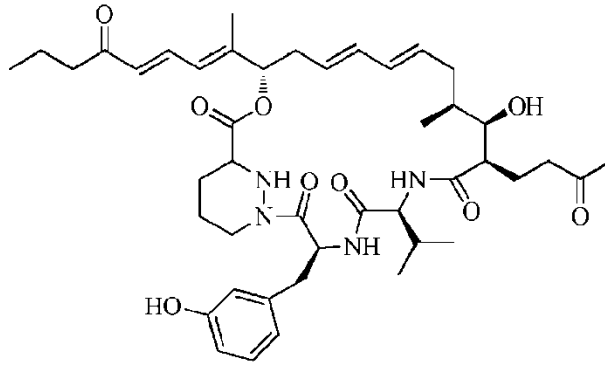
; o

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



; o

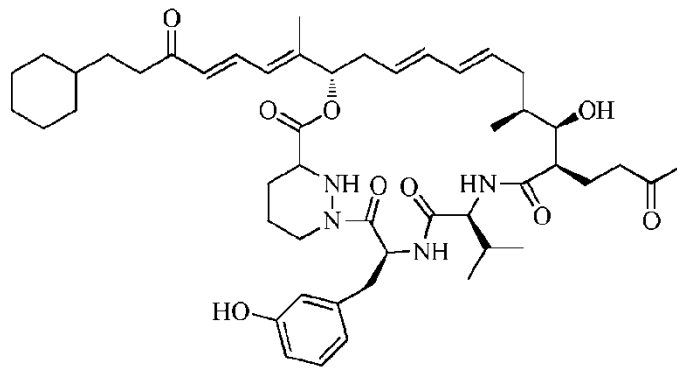
- 15 R<sub>1</sub> representa CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa H, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



; o

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

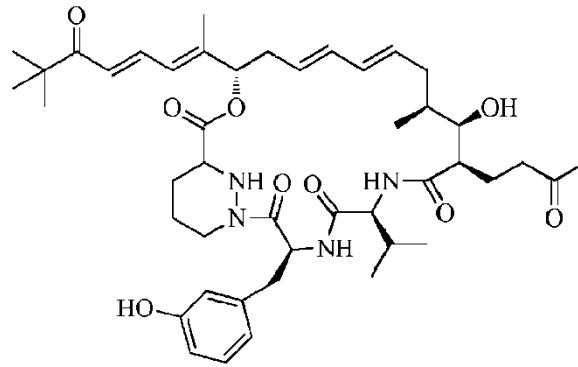
5



; o

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

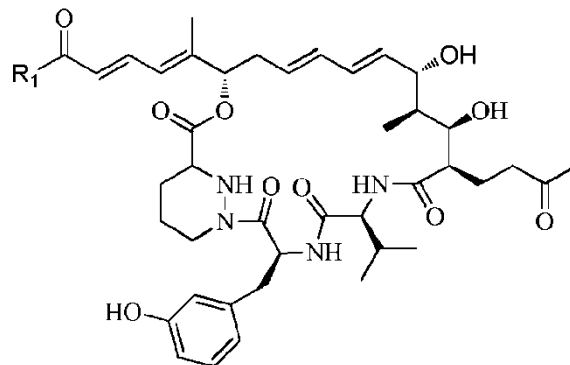
10



; o

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

15



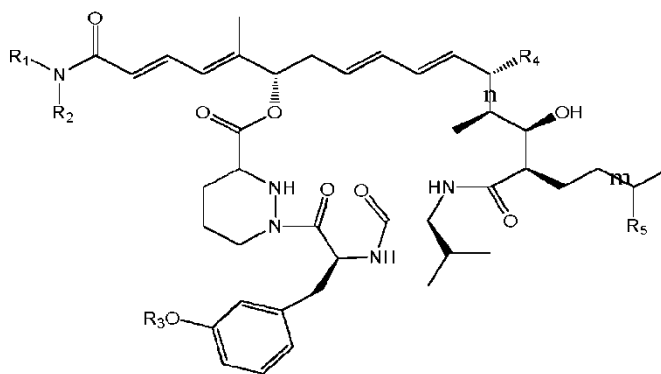
en la que R<sub>1</sub> es tal como se definió anteriormente;

- 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 R<sub>1</sub> se selecciona de un grupo indicado en la siguiente tabla:


Los compuestos de fórmula (VI) pueden prepararse según métodos dados a conocer en el documento WO2011/098808 que se incorpora en su totalidad en el presente documento como referencia.

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

20 o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> 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)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están 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 R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

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

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

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

35 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R<sub>4</sub> representa H; y

m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R<sub>5</sub> 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 cetol en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

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

o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> 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)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en el que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están opcionalmente sustituidos por carbonilo y el anillo heterocíclico puede estar opcionalmente condensado a un anillo arilo o heteroarilo.

Por ejemplo R<sub>1</sub> representa arilo o heteroarilo sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico, -alquilo C<sub>1-4</sub>, -O-alquilo C<sub>1-4</sub>, -CO-alquilo C<sub>1-4</sub> o -alqueno C<sub>2-4</sub>. Por ejemplo R<sub>2</sub> representa hidrógeno, alquilo C<sub>1-4</sub> o alqueno C<sub>1-4</sub>. Por ejemplo R<sub>2</sub> representa hidrógeno o alquilo C<sub>1-4</sub>.

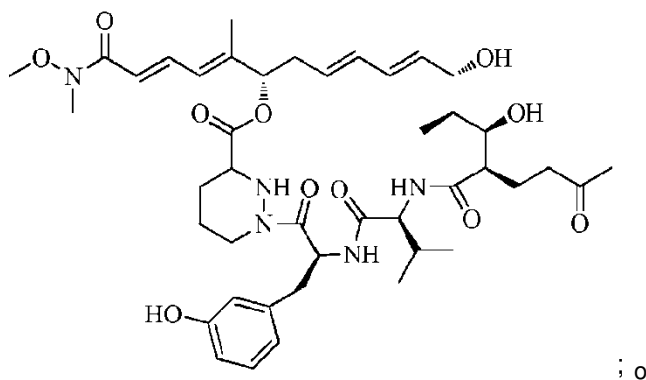
Por ejemplo R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> junto con el nitrógeno al que están unidos representan un anillo heterocíclico de 5-7 miembros, tal como un anillo de pirrolidina, piperidina, morfolina o piperazina en el que el nitrógeno en la posición 4 de piperazina está opcionalmente sustituido con alquilo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

Por ejemplo, independientemente o en cualquier combinación: R<sub>3</sub> representa H o (CO)<sub>x</sub>-alquilo C<sub>1-4</sub>, en el que x es tal como se definió anteriormente; n representa un enlace sencillo; m representa enlace sencillo; R<sub>4</sub> representa OH; R<sub>5</sub> representa =O.

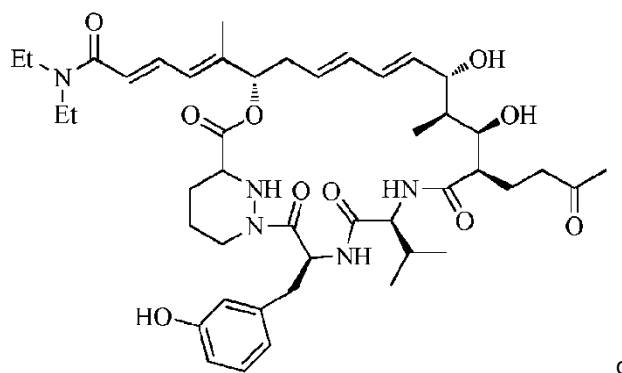
Por ejemplo x representa 0.

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

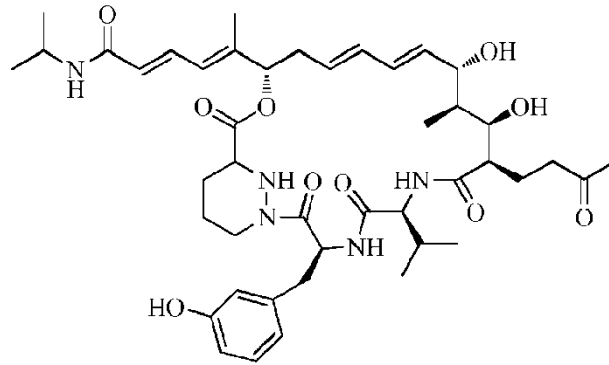
R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



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



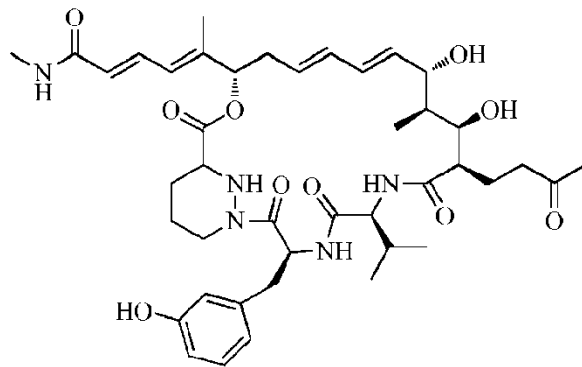
R<sub>1</sub> representa -CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



o

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

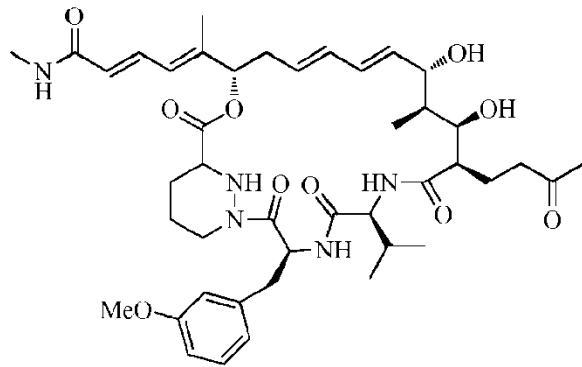
5



o

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

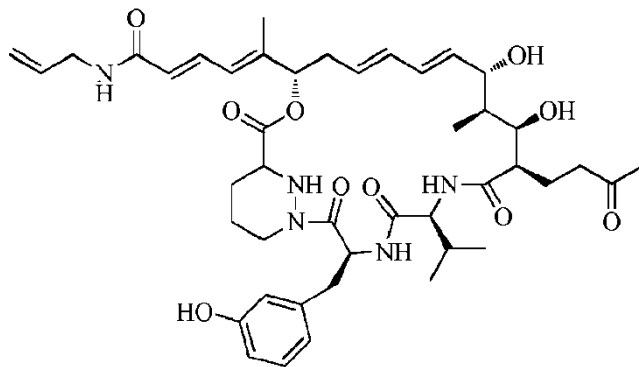
10



o

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

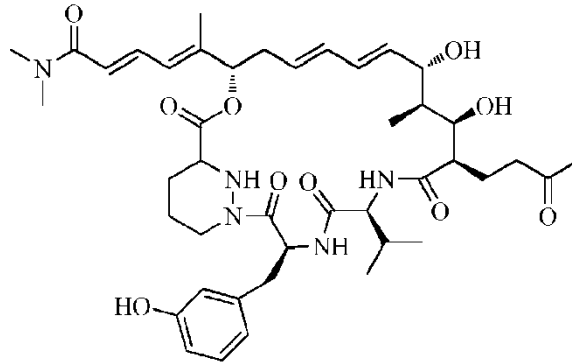
15



o



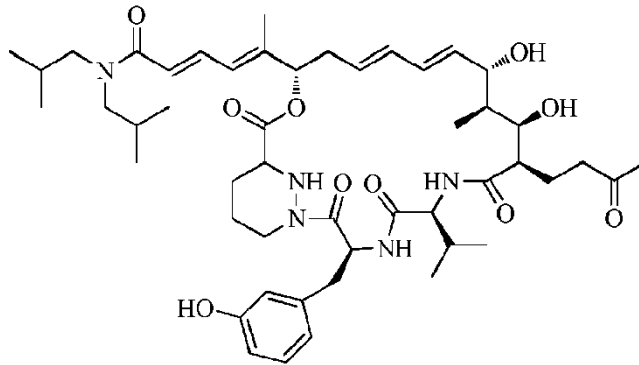
R<sub>1</sub> representa metilo, R<sub>2</sub> representa metilo, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace, m representa un enlace y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



5

; o

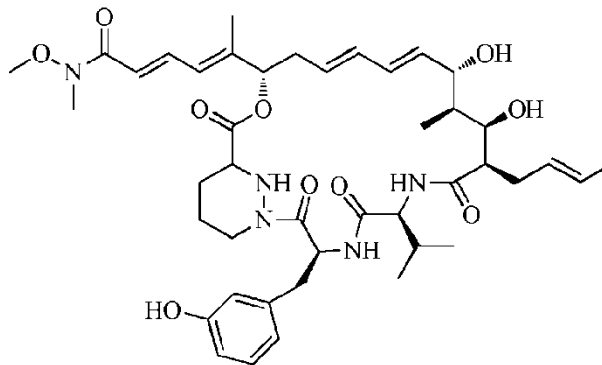
R<sub>1</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> representa -CH<sub>2</sub>CHMe<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente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



10

; o

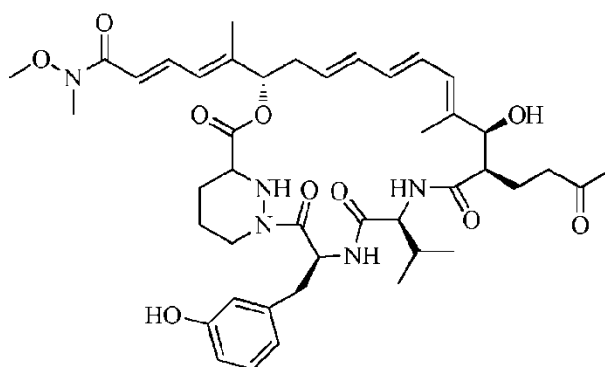
R<sub>1</sub> representa OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> representa Me, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un doble enlace y R<sub>5</sub> representa H tal como se representa por la siguiente estructura:



15

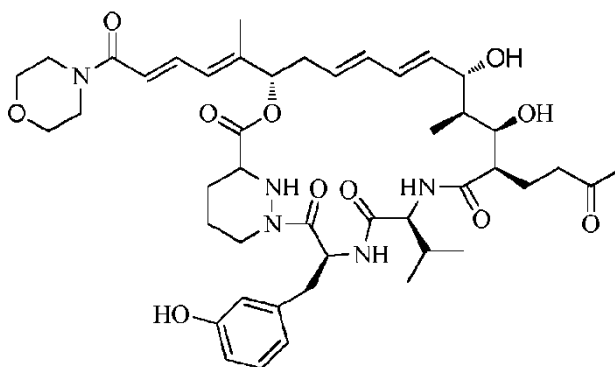
; o

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



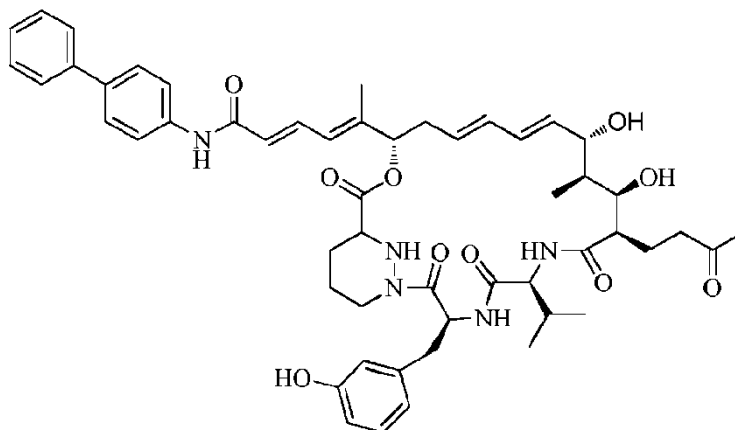
; o

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



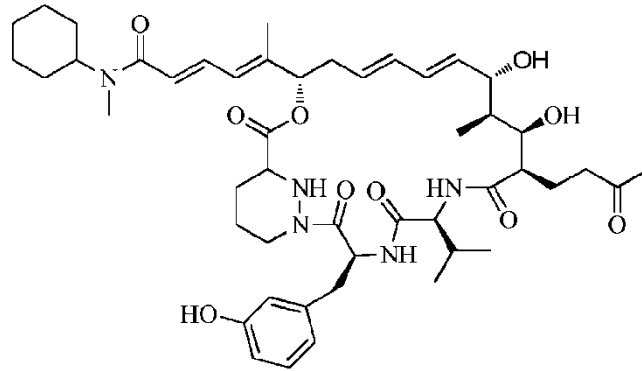
; o

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



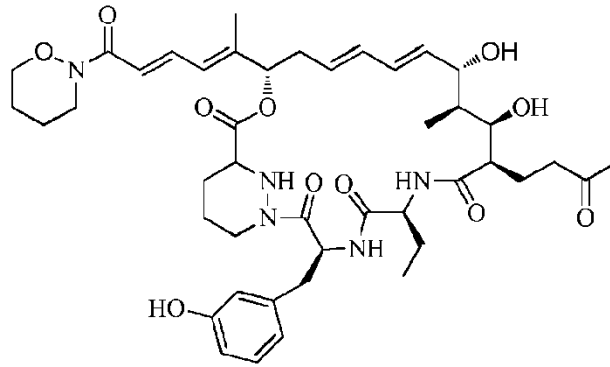
; o

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



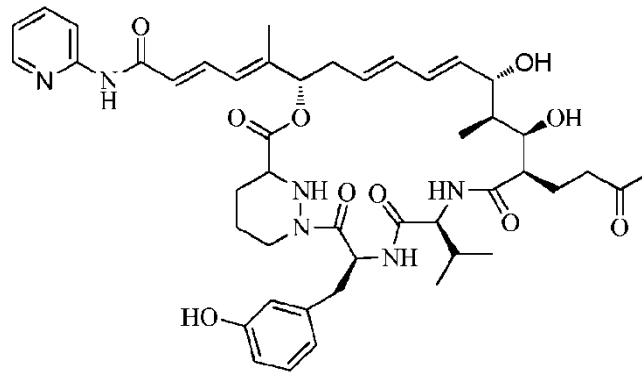
; o

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



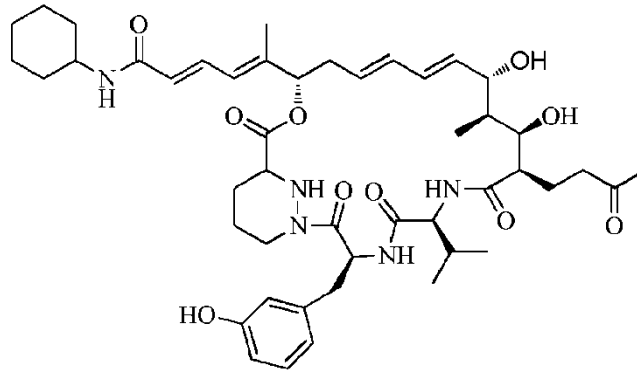
; o

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



; o

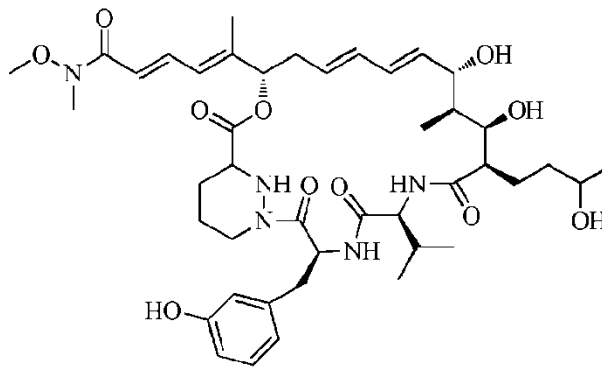
- 15 R<sub>1</sub> representa ciclohexilo, R<sub>2</sub> representa H, R<sub>3</sub> representa H, R<sub>4</sub> representa OH, n representa un enlace sencillo, m representa un enlace sencillo y R<sub>5</sub> representa =O tal como se representa por la siguiente estructura:



o

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

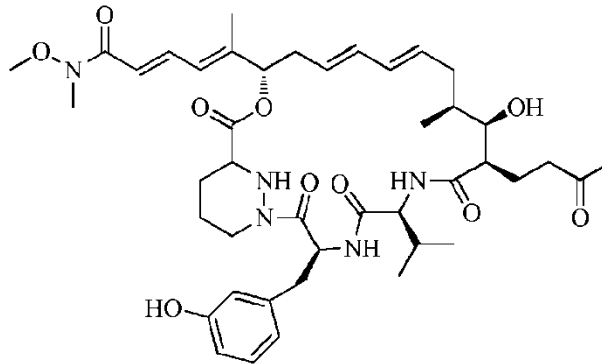
5



o

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

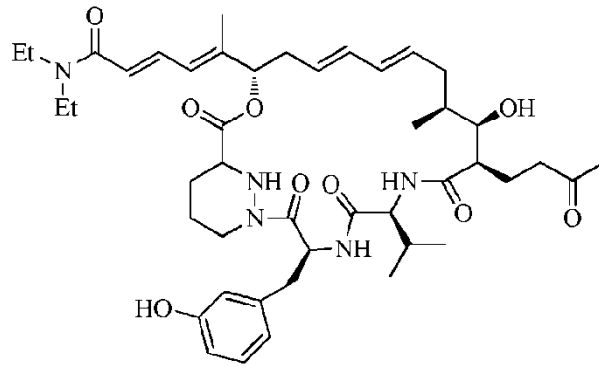
10



o

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

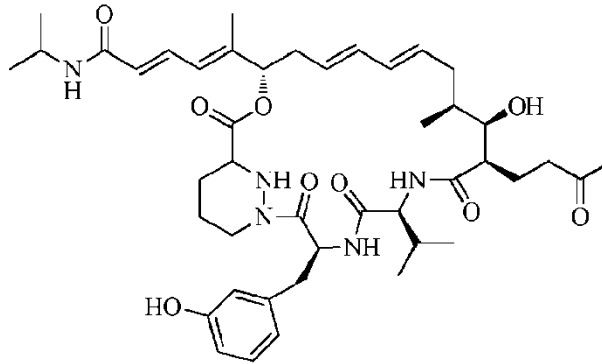
15



; o

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

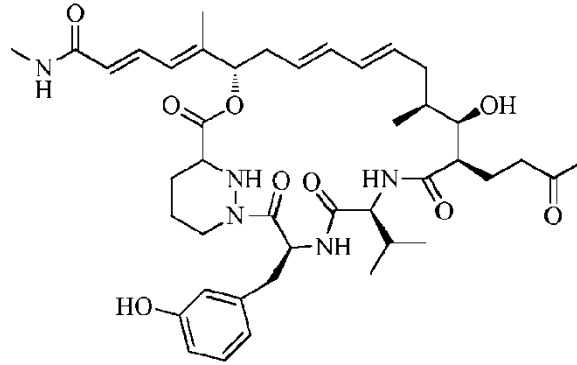
5



; o

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

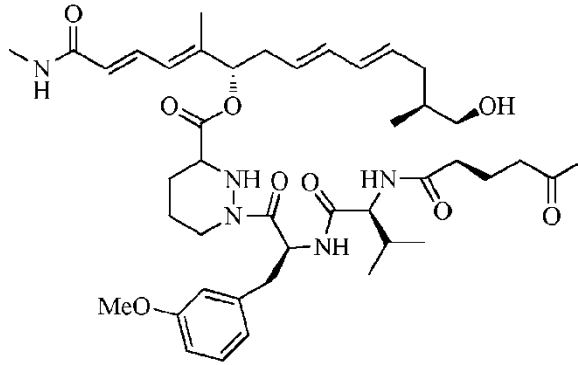
10



; o

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

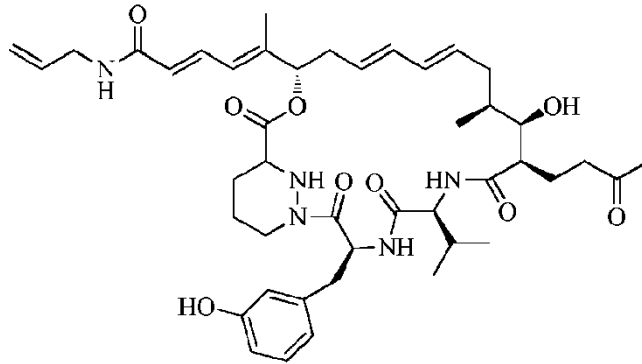
15



; o

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

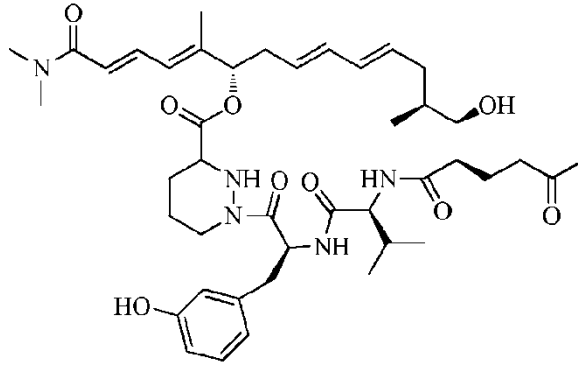
5



; o

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

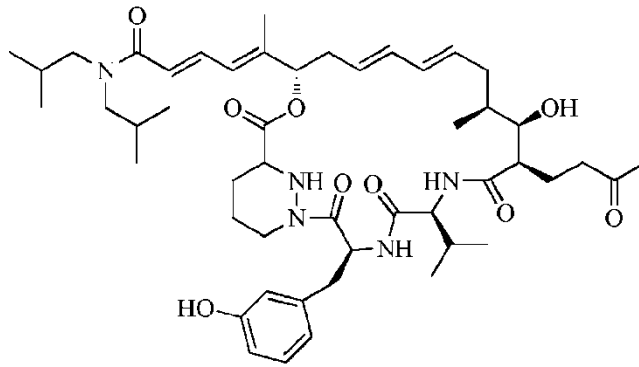
10



; o

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

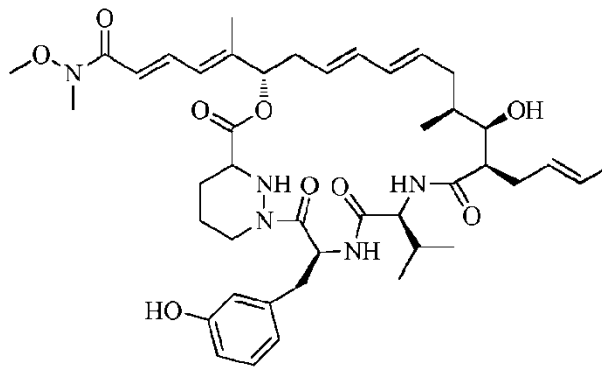
15



; o

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

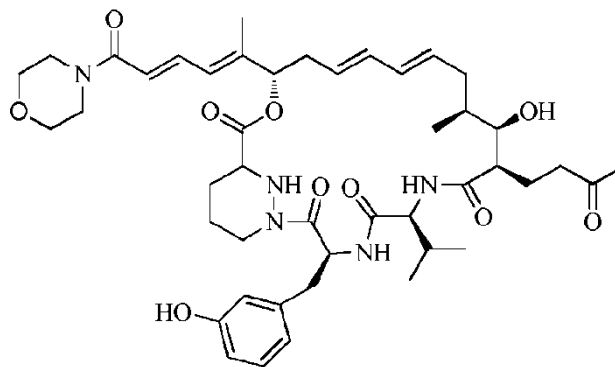
5



; o

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

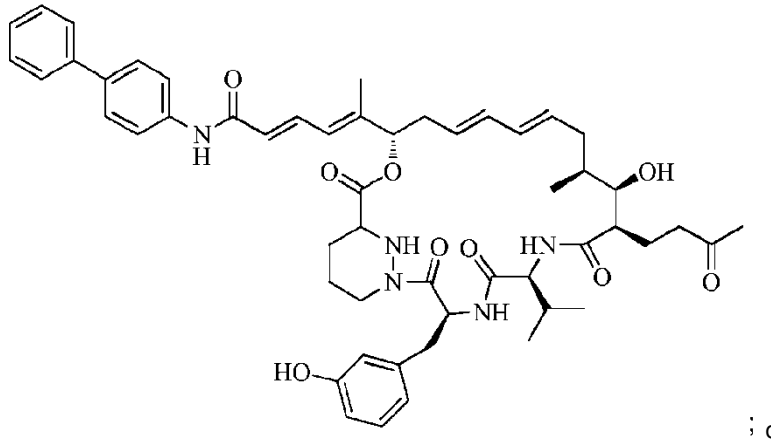
10



; o

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

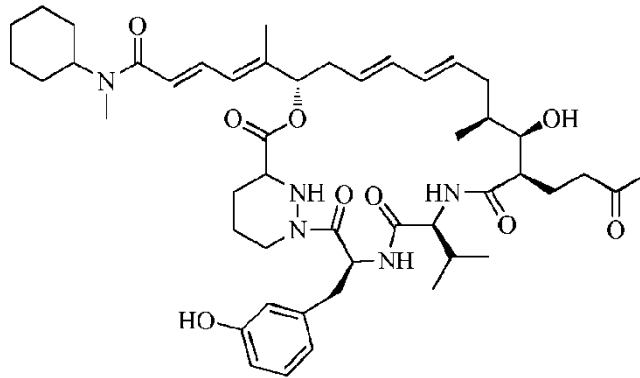
15



; o

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

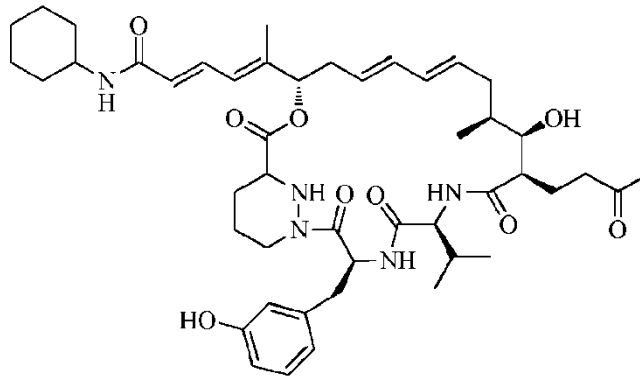
5



; o

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

10

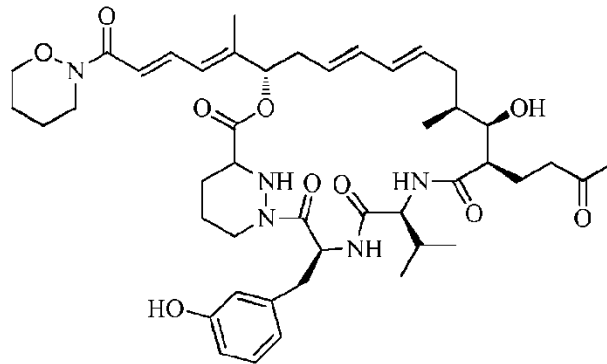


; o

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

15

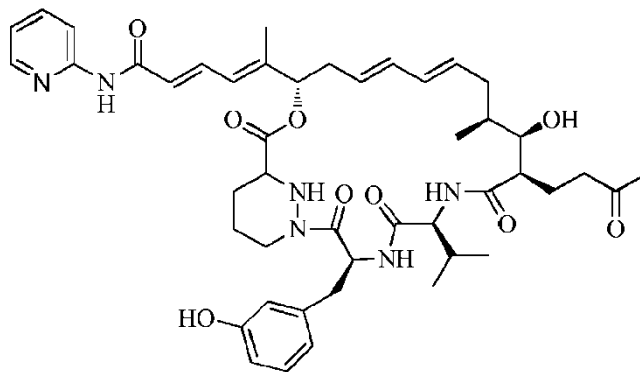




; o

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

5



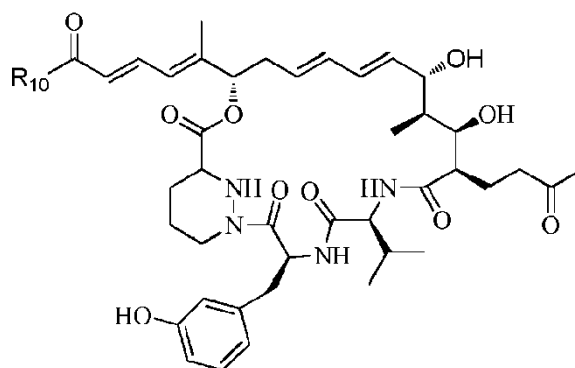
; o

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 cetol en C-53 (si está presente) y los grupos hidroxilo en C-15 y metanol.

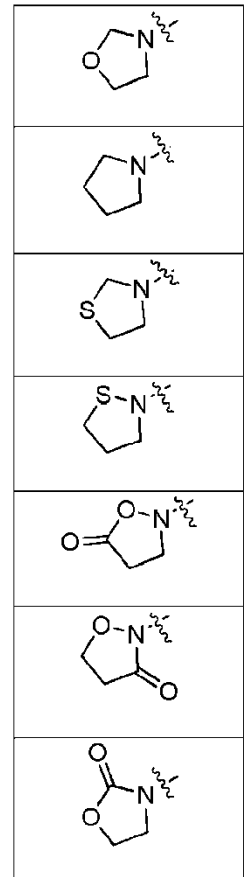
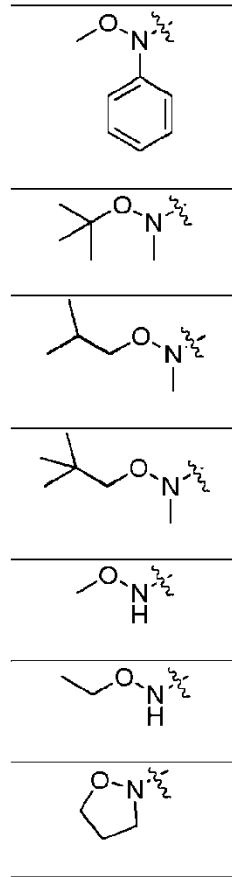
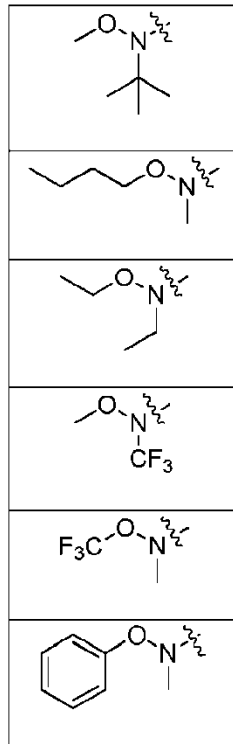
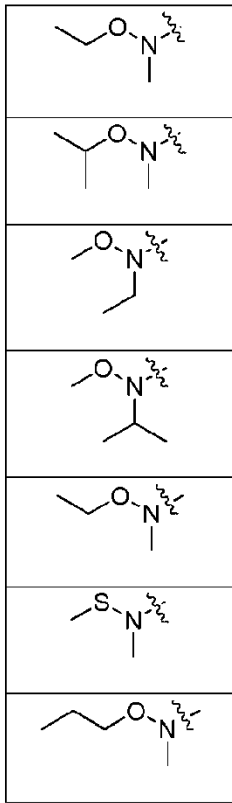
10

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

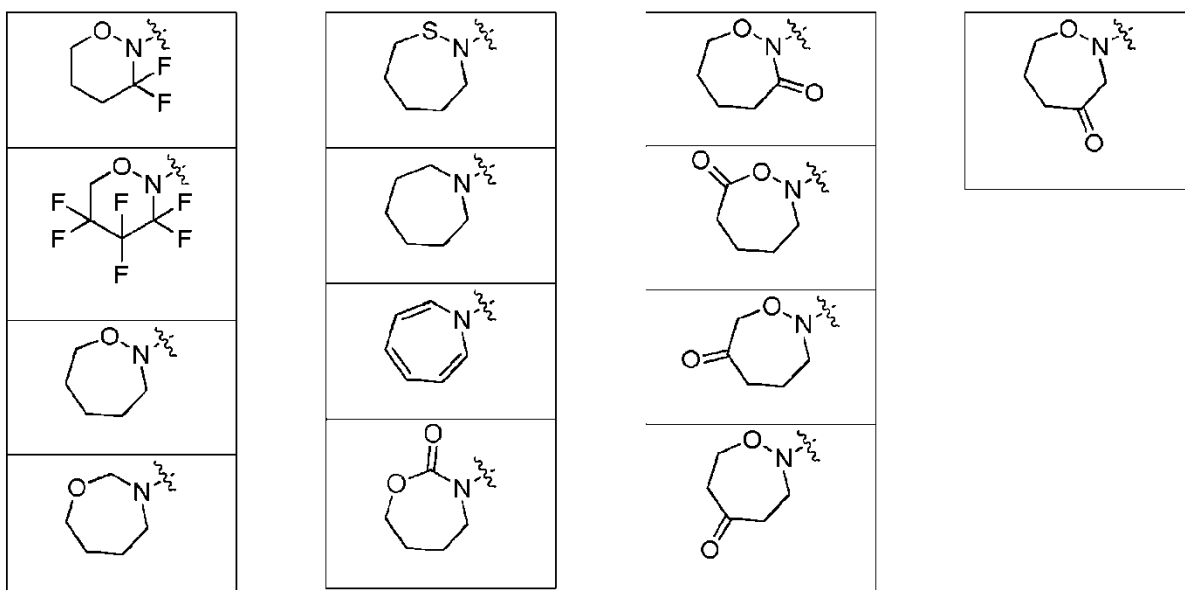
15



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







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.

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.

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

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.

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.

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

También pueden emplearse composiciones sólidas de 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.

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 $\alpha$  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.).

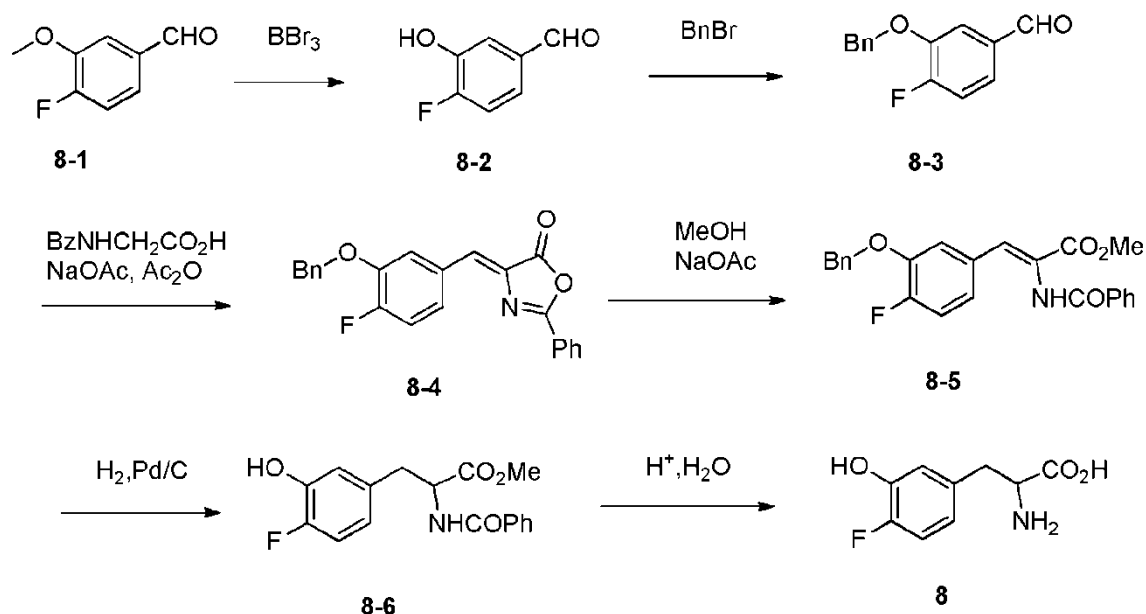
Se adquirieron DL-3-fluorofenilalanina y L-fenilalanina de Sigma (R.U.).

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  $\text{BBr}_3$  (4 M en DCM, 14,6 ml, 58,5 mmol) a  $-70^\circ\text{C}$ . Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a  $-20^\circ\text{C}$  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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 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  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 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  $\text{Ac}_2\text{O}$  (2,2 ml) a  $80^\circ\text{C}$  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.

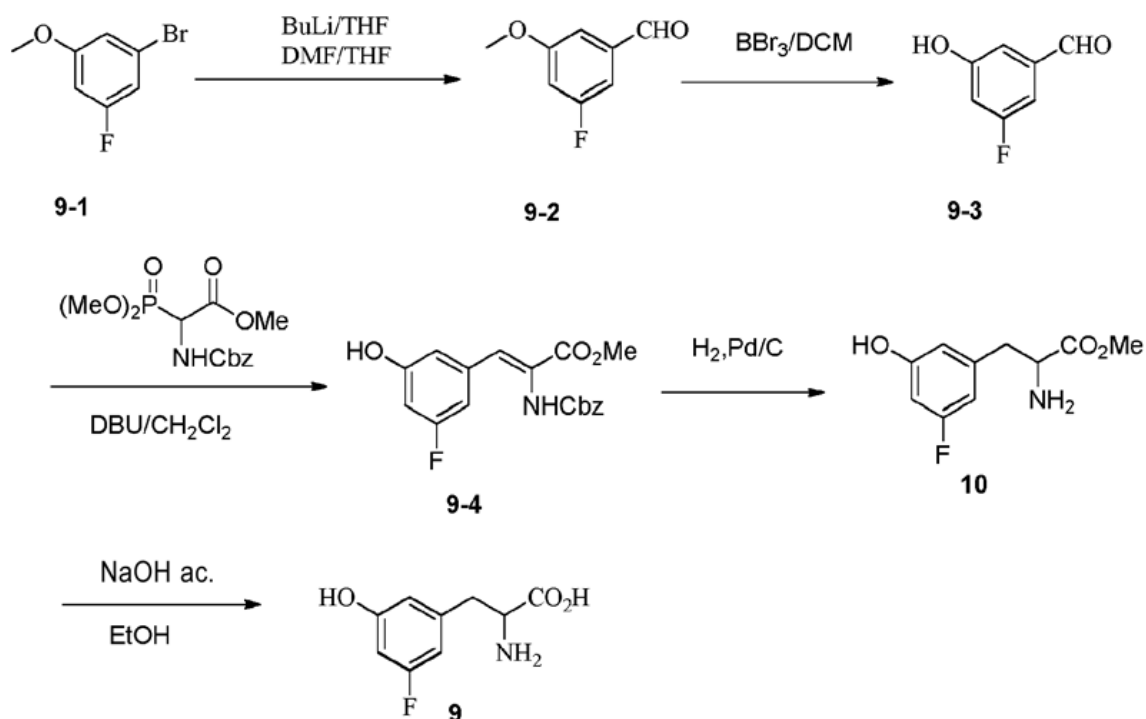
Se agitó una disolución de 8-4 (300 mg, 0,8 mmol) y NaOAc (71 mg, 0,87 mmol) en MeOH (50 ml) a temperatura ambiente durante la noche. Se eliminó el disolvente mediante evaporación rotatoria y se disolvió el residuo en 50 ml de EtOAc, se lavó la disolución de EtOAc dos veces con agua y se concentró para 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  $-78^\circ\text{C}$ . 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.

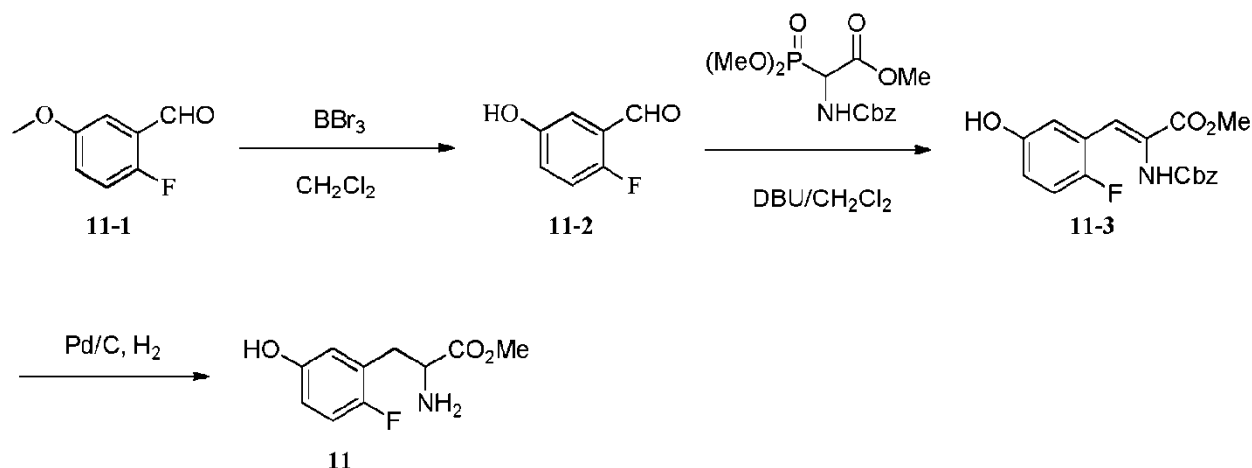
10 A una disolución de 9-2 (6 g, 38,9 mmol) en DCM seco (200 ml) se le añadió gota a gota  $\text{BBr}_3$  (4 M en DCM, 30 ml, 116,8 mmol) a  $-70^\circ\text{C}$ . Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a  $-20^\circ\text{C}$  durante 3 horas, se añadió cuidadosamente agua con hielo y se extrajo con DCM. Se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 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)*

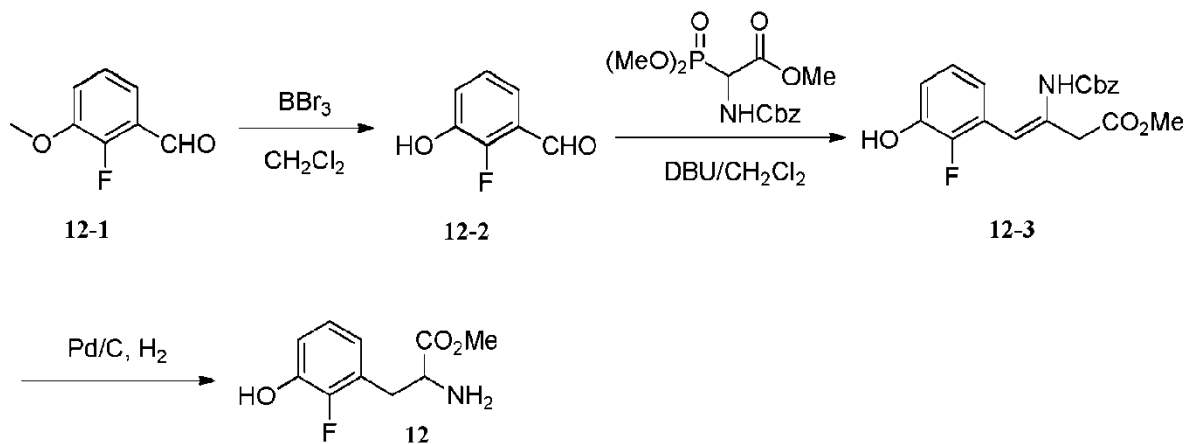


A una disolución del compuesto 11-1 (1,4 g, 9 mmol) en 50 ml de DCM se le añadió gota a gota  $\text{BBr}_3$  (4M en DCM, 3,6 ml, 13,5 mmol) a  $-78^\circ\text{C}$ . Tras la adición, se agitó la reacción a  $-20^\circ\text{C}$  durante 4 horas. Después se añadió lentamente de hielo/agua, se separaron las fases, se lavaron las fases orgánicas con agua y salmuera, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporaron hasta sequedad. Se usó el residuo para la siguiente etapa sin purificación adicional.

A una disolución de 2-(benziloxicarbonilamino)-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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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  $\text{BBr}_3$  (4M en DCM, 3,6 ml, 13,5 mmol) a  $-78^\circ\text{C}$ . Tras la adición, se agitó la reacción a  $-20^\circ\text{C}$  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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se evaporó hasta sequedad. Se usó el residuo para la siguiente etapa sin purificación adicional.

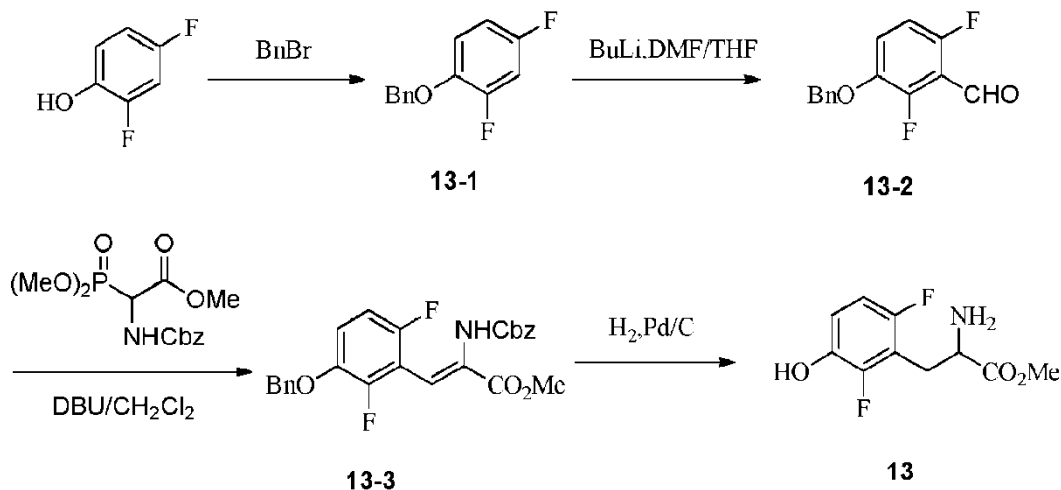
A una disolución de 2-(benziloxicarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (3 g, 9 mmol) en 100 ml de DCM se le añadió DBU (2,7 ml, 18 mmol) a temperatura ambiente, tras 10 min, se añadió el compuesto 12-2 (compuesto bruto de la etapa anterior), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después se diluyó la disolución con DCM (100 ml), se lavó con HCl 1 N (30 ml), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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



10 A una disolución de 2,4-difluorofenol (2 g, 15,4 mmol) en 50 ml DMF se le añadieron  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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.

15 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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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.

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  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  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.

30 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.

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
$\text{CaCO}_3$ (Calcitec, V/40S)	0,05 g

## ES 2 639 918 T3

NaCl (Fisher Scientific, S/3160/65)	0,05 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, P3786)	0,25 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P5379)	0,50 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, M7774)	0,10 g
disolución de oligoelementos B	1,00 ml
agar	1,00 g
Antiespumante SAG471 (GE Silicones, SAG471)	*0,20 ml
H <sub>2</sub> O 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/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, F8633)	5,00 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, Z0251)	4,00 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (Sigma, M8530)	2,00 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (Aldrich, 20,919-8)	0,20 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (Fisher Scientific, A/5720/48)	0,20 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Sigma, C2644)	0,10 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Sigma, B6768)	0,10 g
KI (Alfa Aesar, A12704)	0,05 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95%) (Fluka, 84720)	1,00 ml
H <sub>2</sub> O 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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
NaCl	1 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
CaCO <sub>3</sub>	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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 dH<sub>2</sub>O 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:H<sub>2</sub>O (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 15 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 ul 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 ul 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.

40 SGF + pepsina desnaturalizada: se llevaron 900 ul 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.

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 ul de disoluciones de prueba en un baño de agua a 37°C. A t = 0, se añadieron 100 ul de compuesto de prueba (disolución en DMSO 1 mM) a la disolución de prueba y se mezclaron. Se tomaron inmediatamente 100 ul y se mezclaron con 900 ul de acetonitrilo en un vial para CL de vidrio ámbar. Se analizaron 50-100 ul 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 ul 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 =  $2 \times 10^6$  células/ml). Se prepara una disolución de dosificación 2X en KHB previamente calentado (DMSO al 1%) (disolución de adición conocida 200  $\mu\text{M}$ : 20  $\mu\text{l}$  de disolución madre de sustrato (10 mM) en 980  $\mu\text{l}$  de DMSO, disolución de dosificación 2X: 10  $\mu\text{l}$  de disolución de adición conocida 200  $\mu\text{M}$  en 990  $\mu\text{l}$  de KHB (2  $\mu\text{M}$  tras la dilución).

20 Se añaden 50  $\mu\text{l}$  de disolución de dosificación 2X previamente calentada a los pocillos y se añaden 50  $\mu\text{l}$  de disolución de hepatocitos previamente calentada ( $2 \times 10^6$  células/ml) y se comienza la temporización. Después se incubaba la placa a  $37^\circ\text{C}$ . Se añaden 100  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{l}$  de disolución de hepatocitos previamente calentada ( $2 \times 10^6$  células/ml). Al final de la incubación, se determina la viabilidad celular. Se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ , 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  $\sim 7$  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'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCGAGAAATTCACCTGCGACGTCCTCCAGATGCATTAATAC  
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.

50 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  $30^\circ\text{C}$ . 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  $30^\circ\text{C}$ . 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  $30^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  de arabinosa al 10% a un tubo para inducir la expresión de las proteínas de recombinación Red/ET. Se agitaron los tubos durante  $\sim 1$  hora a  $37^\circ\text{C}$ . 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  $\mu$ l 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  $\sim$ 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  $\sim$ 3 horas a 37°C con agitación (1100 rpm, Eppendorf Thermomixer compacta) antes de sembrar en placas de 2TY que contenían apramicina (50  $\mu$ g/ml) y kanamicina 25  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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 *Nsi*I 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  $\mu$ g/ml), kanamicina (25  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (10  $\mu$ g/ml). Se inoculó la cepa resultante en 3 ml de 2TY líquido que contenía apramicina (50  $\mu$ g/ml), kanamicina (25  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (10  $\mu$ g/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  $\mu$ g/ml), kanamicina (25  $\mu$ g/ml) y cloranfenicol (10  $\mu$ g/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  $\sim$ 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  $\mu$ l de cada cepa) y 1:3 (100  $\mu$ l 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/l. Se fijaron colonias ex-conjugantes que aparecían tras  $\sim$ 4-7 días a medios ISP4 que contenían apramicina (25  $\mu$ g/l) y ácido nalidíxico (25  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/l) para confirmar la pérdida de plásmido y se dejó que crecieran  $\sim$  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  $\sim$ 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  $\mu$ l de ácido fórmico y se mezcló el tubo durante aproximadamente 30 minutos. Se aclaró la mezcla mediante centrifugación y se retiraron 170  $\mu$ l 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.

5 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 ul 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*

20 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*

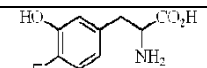
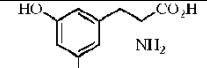
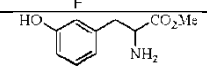
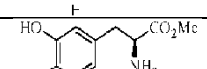
25 Se prepararon disoluciones madre de esporas de un mutante con alteración en *sfaA* (BIOT-4452 o BIOT-4585) tras el crecimiento en medio MAM, ISP4, ISP3 o ISP2, y se conservaron en glicerol al 20% p/v en agua destilada y se almacenaron a -80°C. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) 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.

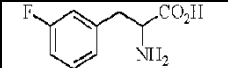
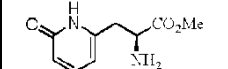
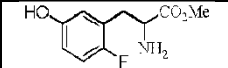
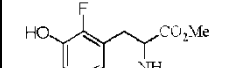
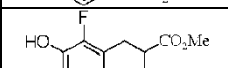
40 Se extrajeron las muestras transfiriendo 0,8 ml del caldo completo a un tubo Eppendorf tapado de 2 ml. Se añadieron 0,8 ml de acetonitrilo, junto con 0,015 ml de ácido fórmico. Después se agitó la mezcla durante 30 minutos en un dispositivo Vibrax. Después se centrifugó el tubo a 13000 rpm durante 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.

45 La tabla 1 muestra los mutasintones que se alimentaron de esta manera, junto con los aductos de H<sup>+</sup> y Na<sup>+</sup> 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

50

mutasintón alimentado	nombre de mutasintón	[M-H] <sup>-</sup> observada (m/z)	[M+Na] <sup>+</sup> 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-hidroxi)fenil)propanoato de metilo	1106,5	1130,6	1107,5	5,5
	2-amino-3-(2-fluoro-3-hidroxi)fenil)propanoato de metilo	1106,5	1130,6	1107,5	5,1
	2-amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxi)fenil)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-hidroxi)fenil)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-hidroxi)fenil)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.

10 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).

20 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*

35 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).

45 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).

55 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*

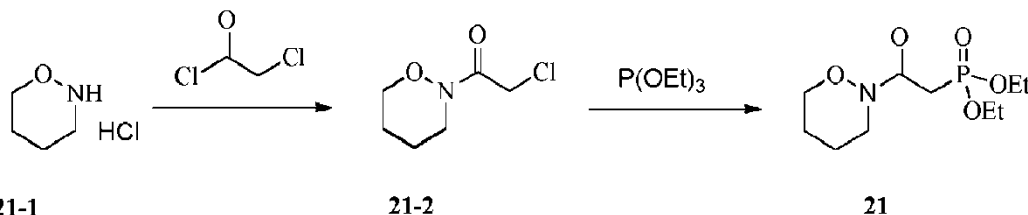
Se descongelaron disoluciones madre de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 0,4 ml de disolución madre de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el 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 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).

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).

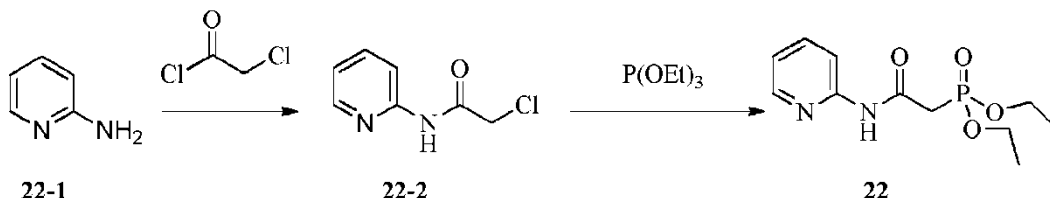
*Ejemplo 11 - Síntesis de (2-(1,2-oxazinan-2-il)-2-oxoetil)fosfonato de dietilo*



A una disolución de 21-1 (ChemCollect, Alemania) (100 mg, 0,81 mmol), Et<sub>3</sub>N (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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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%).

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.

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

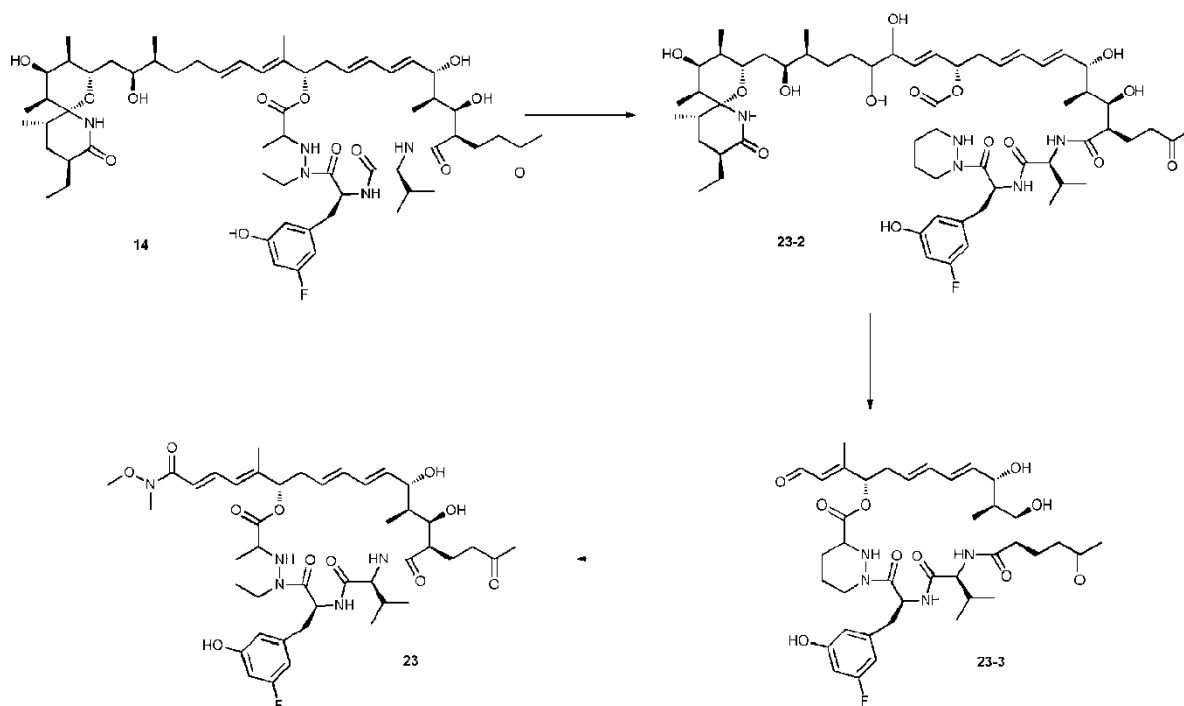


A una disolución de 22-1 (1 g, 10,6 mmol), Et<sub>3</sub>N (1,075 g, 10,6 mmol) en cloruro de metileno seco (50 ml) se le añadió gota a gota cloruro de cloroacetilo (1,2 g, 10,6 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 h, se vertió en agua con hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con salmuera y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró a vacío. Se purificó el residuo mediante cromatografía Combiflash de fase inversa para proporcionar 22-2.

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

10 A una disolución con agitación de 14 (430 mg, 0,38 mmol), (DHQ)<sub>2</sub>PHAL (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

20 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.

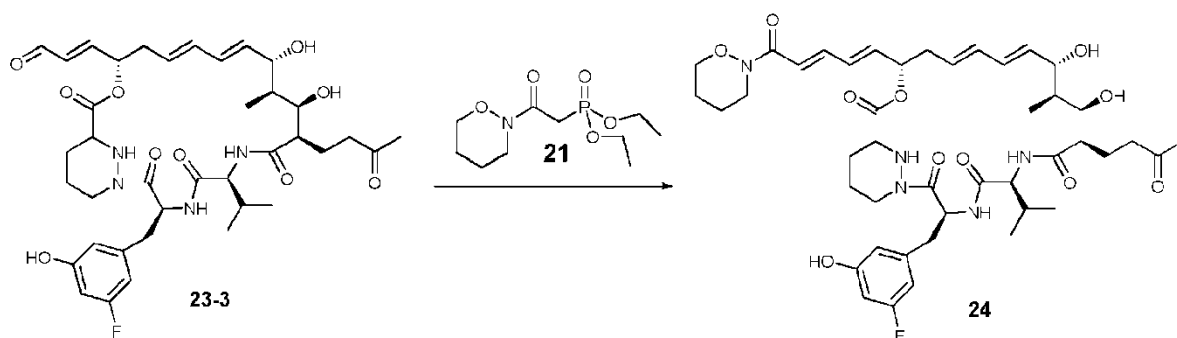
20

25 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 23 como un sólido blanco.

25

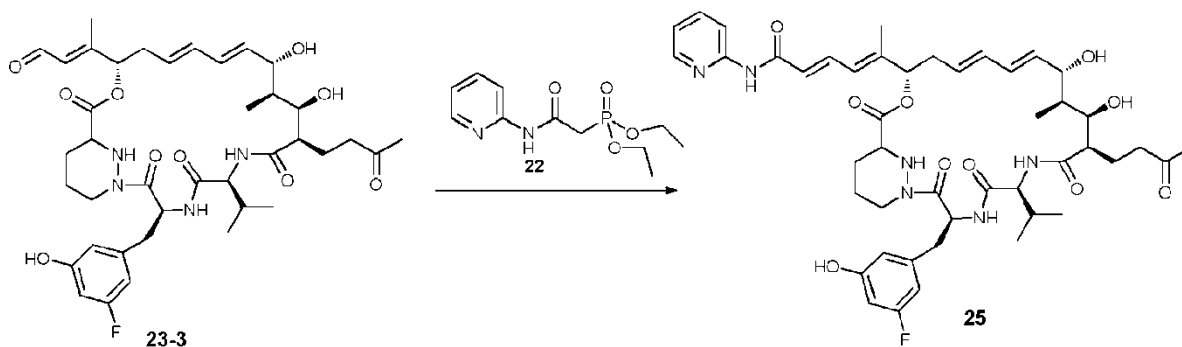
30 *Ejemplo 14 - Preparación de compuesto 24*

30



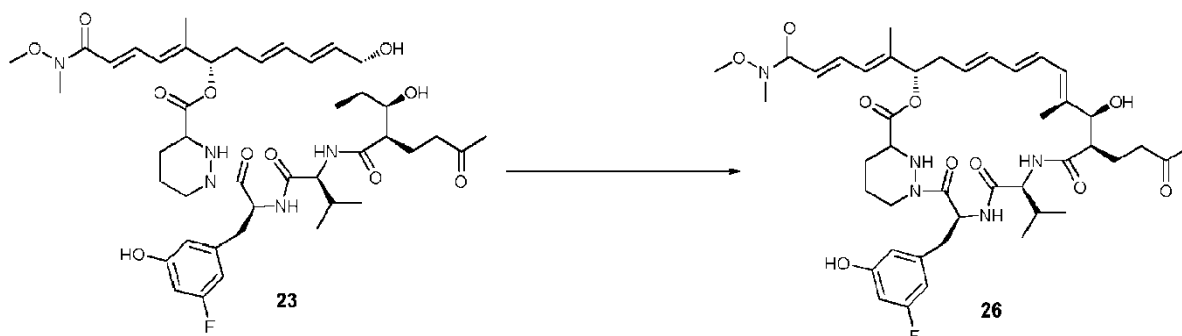
5 A una disolución de 21 (42 mg, 0,168 mmol) en THF (2,0 ml) se le añadió NaH (1,2 mg, 0,05 mmol) en THF anhidro (0,2 ml) a 0°C con agitación. Después se agitó la disolución a 20°C hasta que se volvió transparente. Después se añadió 23-3 (30 mg, 0,042 mmol) a la disolución transparente y se agitó la 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se redujo a vacío. Se purificó el residuo mediante HPLC preparativa para obtener 25 como un sólido blanco.

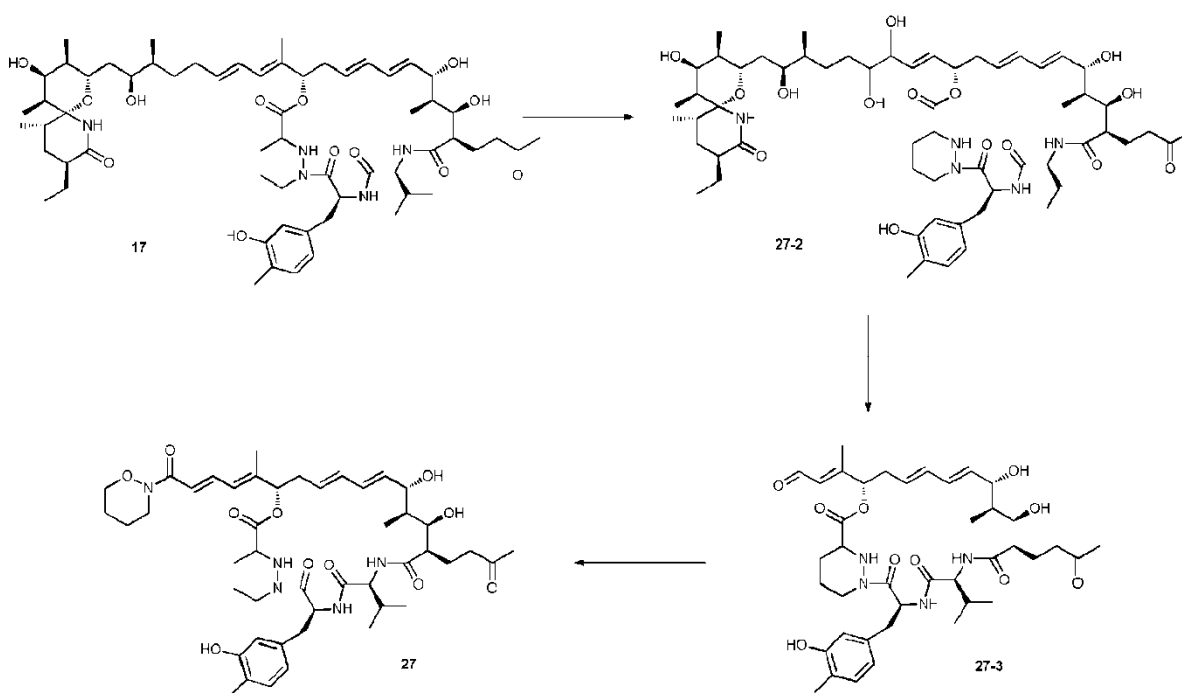
20 *Ejemplo 16 - Preparación de compuesto 26*



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*



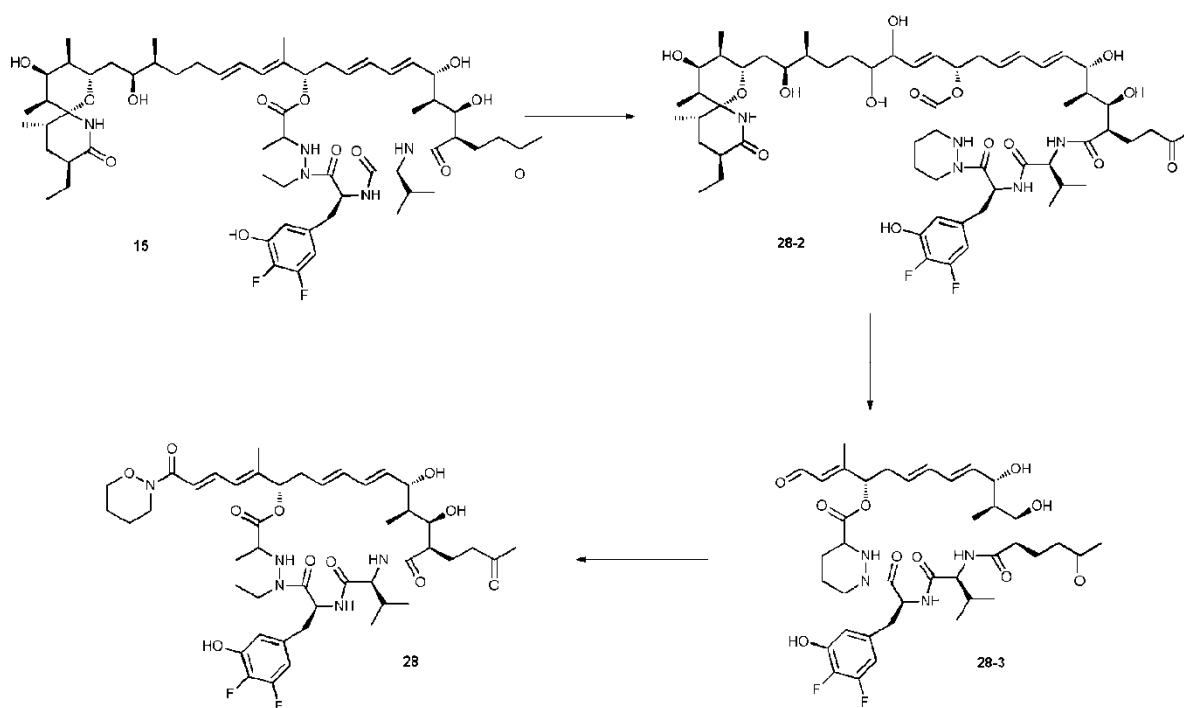


5 A una disolución con agitación de 17 (99 mg, 0,09 mmol), (DHQ)<sub>2</sub>PHAL (4,2 mg, 0,0054 mmol), tetraóxido de osmio (0,034 ml, 0,0027 mmol) en alcohol terc-butílico (al 2,5% en peso, 0,079 mmol/ml) y metanosulfonamida (18 mg, 0,18 mmol) en 5 ml de alcohol terc-butílico se le añadió, a temperatura 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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*

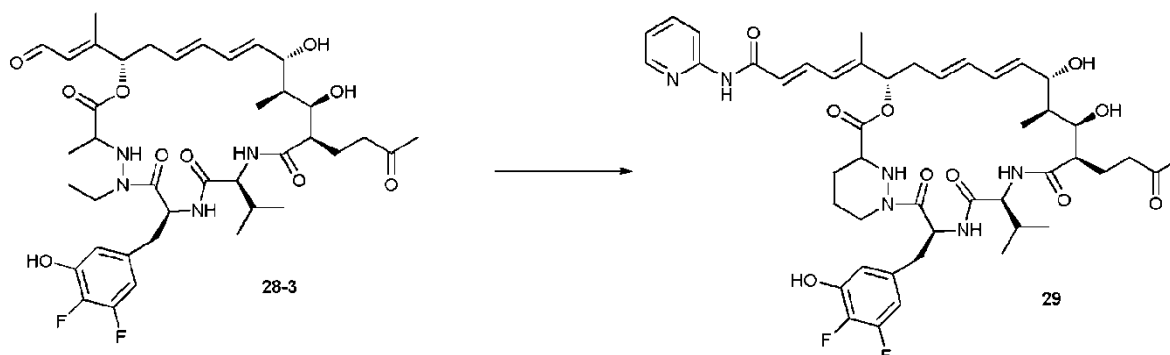


5 A una disolución con agitación de 15 (349 mg, 0,31 mmol), (DHQ)<sub>2</sub>PHAL (14 mg, 0,0186 mmol), tetraóxido de osmio (0,117 ml, 0,0093 mmol) en alcohol terc-butílico (al 2,5% en peso, 0,079 mmol/ml) y metanosulfonamida (59 mg, 0,62 mmol) en 15 ml de alcohol terc-butílico se le añadió, a temperatura 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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*

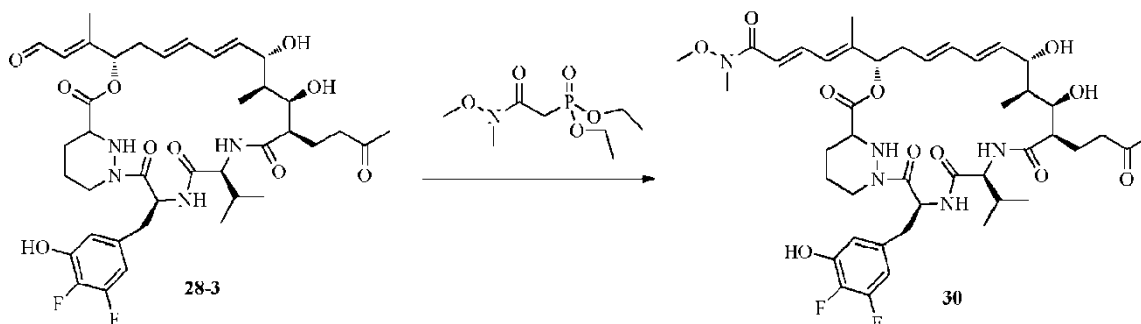


30 A una disolución de 22 (42 mg, 0,155 mmol) en THF (1,0 ml) se le añadió NaH (2,3 mg, 0,0575 mmol) en THF

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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 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*

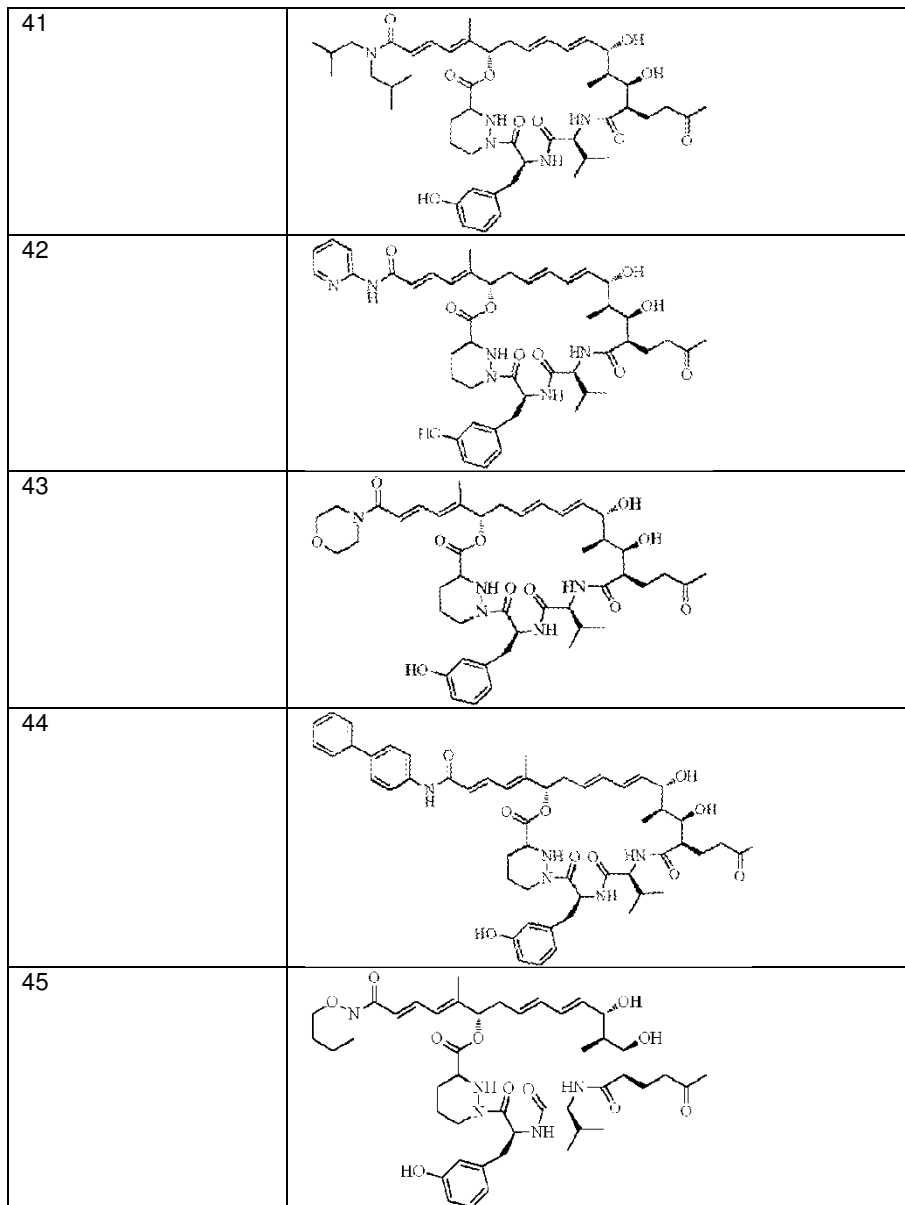
Para evaluar la farmacocinética de los compuestos en un entorno *in vivo*, se administraron dosis de compuestos v.o. a 10 ó 5 mg/kg e i.v. a 1 mg/kg a grupos de ratones CD1. Los compuestos sometidos a prueba se mencionaron anteriormente o se indican en la siguiente tabla:

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 <sub>última</sub> tras dosis i.v. de 1 mg/kg	AUC <sub>última</sub> tras dosis v.o. de 5 mg/kg	AUC <sub>última</sub> 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 <sub>1/2</sub> en SGF (h)	SGF, % restante tras 1 hora	SGF + pepsina, % restante tras 1 hora	SGF + pepsina desnaturalizada, % restante tras 1 hora	t <sub>1/2</sub> 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<sub>última</sub> 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.
- Zenke, G., U. Strittmatter, *et al.* (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." *J Immunol* 166(12): 7165-71.
- 35 Zeuzem, S. and E. Herrmann (2002). "Dynamics of hepatitis C virus infection." *Ann Hepatol* 1(2): 56-63.
- Zhang, L. H. and J. O. Liu (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle." *J Immunol* 166(9): 5611-8.

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.

45

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

ES 2 639 918 T3

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

ES 2 639 918 T3

tggccgtggc ggcgggcgtc ggagagccgt tccacgagga gcatgccggc gccctcggac 360  
 cagccggtgc cgtcggccgc ggcggcgaag gacttgcagc ggccgtccac ggccaggccg 420  
 cgctggcggg agaagtcgac gaagacgtcg ggggcggaca tgacggtgac accgccggcc 480  
 agcgccatcg agcactcgcc gctgcgcagc gcctggatcg cccagtgcag ggcgaccagc 540  
 gacgccgagc acgcggtgtc 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  
 tccagggcca gccgctgctg cgggtccatc gccagcgcct cgcgcggcga gatcccgaag 840  
 aagtccgcgt cgaacccggc gacgtccgcg aggaagccgc cctcccgcac gtacgacgtg 900  
 cccgcgtgct ccgatccgg gtggaagagg cccgcgaggt cccagccccg gtcgtcgggg 960  
 aacggggtga gcgcgtcgcg ctgctcggcg 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 ggtgagtcg 1380  
 gtgagctttc cggccagggt gtccggtccg gcgcccgcgg tggcggcgcg ccggacgggg 1440  
 ccacggacca gccggcgcac cagcgcgggt acggcgggtg cggcgggtggc gaacgaggtg 1500  
 aggtccagcc aggcggggac gacgacgggg gcggagccgg cggtaggcgc gtcgaacagg 1560  
 gcgagcgcgt cgggcgtcgg cagcggcacc acgcccgcgc gggcccgcgc ccgcaggtcg 1620  
 gcgcccacca ggtggccggt catgccgctg gcgtgcgccc acaggcccca cacctgggag 1680  
 gtggcgggca ggccctgggc gcggcgggtg gccgcgagcg cgtccacgaa ggcggtgccc 1740  
 gccgcgtagt tgccctgtcc gggcgccccg aagaggccgg aggtggagga gaacagcacg 1800  
 aagacggccg gccggtgcmg ggcggtgagt tcgtgcaggt tccaggcggc gtcgacctg 1860  
 gggcggagca ccttggcgag ccgctcgggg gtctgggagg cgatgacgcc gtcgtccagg 1920  
 acgccggcgg cgtggacgac tccggtcagg ggggtgctcmg cggatgatccg gtcgagcagg 1980  
 gcggccagtt cgggtcggtc ggcggcgtcg caggcggcga cggtcacctc ggcgccgagg 2040  
 gcgvcagtt cgccggcgag ggtcacggcg tcgggggccc cgtcgcgcgc ccgtccggcc 2100  
 aggaccagcc ggcgtacgcc gtgctcgggtg accaggtggc 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 gctgttgacg tgcgtcgggg 2340  
 ccgtcgatgt cgaccagcac cagcctgccg ggggtgttcgg cgcgggcgga gcggatcagg 2400  
 cccacacgg gcgctgggc gaggtcgggtg acgtcctcgt gctcgaccgg gaccgcgccg 2460  
 tgggtgagga cggccagacg ggtgccggcc agtcgctcgt cggcgagcca ctctgaaga 2520  
 gcggtcagca cgcgccgggc gccggcgtgg gccgcgccgg cgggtgcgtc ggccgactgc 2580  
 tgccgacacg gcagcacgag ggtgccgggc acggtgtcca gggcggcgac ggccggcagg 2640  
 tcggggcagg aggggtatcc gggcagcggg aggccgccga gcacggcgat gccgtcgacg 2700  
 tcggcccgcg gcagcggcac gggcgtccac tcgaccgggt acagctcgtg gtcgcccgg 2760  
 gggccggccg tggccggcg gcgcagggtc accgcgtcga cggtgagcac ggccgctccg 2820  
 ctgtcgtcgg tggcgtgcag ggtgaccgtg tgctcgcccg cggggtgcag gcgtaccgc 2880  
 agccgggtgg cggccacggc gtgcagggtg acgccgtgcc aggcgcggg gaccaggccg 2940  
 ggggtgtacg ccgcgagggc gtcggtgagc agggcggggt gtacgcccc gcccggcg 3000  
 gtctcgtcgg tcagctcaac ggtcacgtcg gtcagctcga cggtcacgtc ggtgtccggg 3060  
 tcccctggcg cggcggccgg ggcggtgccg gtgtgcggga ggaggacgcc ggtcgcgtgc 3120  
 cgggtccagg gctggtcgtc gtcggcgtcg gcggggcggg agtggacggc gaccggcg 3180  
 gcgccgtcct cgttctccgc gccaggggtg acctggaggc ggccggcttc gccgacggtg 3240  
 tcgagcggtg cctcctcgtt cagttcgccg agcgtcctgc cgtcggccgc gtcagggcc 3300  
 aggtcgagta cggcgccggc cggcagctcg gtgccggccg gcacgcgcc ggtgaacacc 3360  
 tgtccgccgg atccggcgag cggggtgacg gcgccgagca gcgggtgcc ggccggctc 3420  
 aggccaggc cggcggcgtc ggaggcacc gggccgctgg gccagaagcg gcggcgctgg 3480  
 aaggcgtagg tgggcaggtc gacgtggcgt ccgtcggggc agcccaccgt ccagtcgacg 3540  
 gacacgccgt ggacggcggc ctccggcagc gaggtgagga ggccggcgg gccgtcctcg 3600  
 tcgcccggga gggtgccgac gacgacggcg gtccgctcgg tggcctccgc cgtctcctgc 3660  
 acggcgccg tcagcaccgg gtgcgggctg atctccacga acacggcgtg gccggagtcg 3720  
 agcaggccgc gcaccacggg ctcaaccgt acgggctccc gcaggttgcg gtaccagtag 3780  
 ccggcgtcga gccgtgtctc gccgaggggg ccgccagca gggtgagggt gaaggcgatg 3840  
 ccggcctcac cggcccgag ttcggcgagc gcggcgcgca actcggcttc gagggactcg 3900  
 acatgggccc agtgggaggc gtagtcgacc gcgatgcggc gcagtcgtac ccgtcggcc 3960  
 gaccaggcgg ccatcacctc gtccagcga tcggggtcgc cgtgaggac caccgacgac 4020  
 gggccggtga gggcggcgac gcaaaccgct ccggaccacg gtgcgagccg ccgtgtgacg 4080

ES 2 639 918 T3

gtggcctcgg gcagggcgac ggagaccatg ccgccgcgcc cggccagccg ctcggggatg 4140  
 agccgcgacc gcagggcgac gatccgggcg ccgtccgcca gcgacagcac 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 cgggcgacga atccagcaga 4440  
 tccaccgcca tccccaccca ctgcgcccc tgaccgggga acacgaacac caccggcccc 4500  
 tcaccggca acccggaac acccgacacc acaccctcca ccggctcccc cgcggccaac 4560  
 gccgccagag aagcccgcgc accggccaca tcagcggcca ccaccaccgc acgatgcggc 4620  
 aacaacgccc gcgacgcggc aagggaccag gagaggtcca ccgggtccag gccgggggtg 4680  
 gtgtcgaggt gggcggcgag ccgggtggcc tgctcggcga gggcggcctg ggagcgggcg 4740  
 gagagcagcc acggcaccca gcgcggcgcg gcgccgcgcg cgggcgcggc cggttccgcc 4800  
 ggggcctcct ccaggatgag gtgggcgttg gtgccgctgg cgcgaacga cgacacgccc 4860  
 gcgcggcgcg gccggtcggc cgggggcccag acggcggcgc cggtgacgag ttcgacggag 4920  
 ccggaggccc agtcgatgtg cggtgagggg gcgtccacgt gcaggggtgc gggcacttcg 4980  
 ccggcgcgca gcgcgagcac cgtcttgatc acgccggcca cccccgccgc ggggccggtg 5040  
 tggccgatgt tggacttcag cgagcccagc cgcagcggct gtgcgcggtc ctggccgtag 5100  
 gtggccagca gggcgttggc ctcgatgggg tcgccgaggg tggtgccggc gccgtgtgcc 5160  
 tccacgacgt cgacgtcggc ggcggtgagg ccggcggcgg ccagcgcgga gcggatgacc 5220  
 cgctgctggg cggagccgtt gggggcggtg agcccggagg aggcgccgtc ctggttgatc 5280  
 gccgagccgc ggaccacggc cagcacgggg tggccgttgc ggcgggcgtc ggacagccgc 5340  
 tccagcacga ccacgcccgc gccctcggac cagccgatgc cgtccgcggc ggcggcgaac 5400  
 gccttgacg gcgcgtcggg ggcgaggccg cgtgcgggg agaactccac gaaggcacgc 5460  
 ggggtcgaca tgaccatcac gccgccggcg agggccagcg agcattcgcc gctgcgcagg 5520  
 gactggccgg ccaggtgcag ggcgacgagc gaggacgagc aggcgggtgc cacgctgacg 5580  
 gccgggcctt ccaggccgag ggtgtaggcc acccgccgg agagcacgct ggcgtagttc 5640  
 ccggtgccga gcagcccctc gtccacgccg gcgaccgcgc cgtgccgtga gtcgtagcgc 5700  
 tggtcgggtga cgcgccgaa gacgccgggt gcgctgccgc gcaggccgtg cggatcgacg 5760  
 ccggcgtgct cgaacgcctc ccaggcgact tcgaggaaca gccgctgctg cgggtccatc 5820  
 gccagcgct cgcgcgggct gatgccgaag aagtcggcgt cgaagccggc ggcgtcgttc 5880  
 aggaagccgc cctggcgag gtaggtgtgt ccggcccggc ccgggtcggg gtcgtagagg 5940

ES 2 639 918 T3

ccgtcgaggt cccagcccg 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 cgcctcaaa gccctgctgc gcagggcgac gaccggggcg 7200  
 ccgtccgcca gcgacaacac acccgccaca caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga 7260  
 ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac gaacgcaca cctccgcaa cgacaccatc 7320  
 accgcccaca acaccggctg aacgacatcc acccgctcca acgccaccgg atcaaccagc 7380  
 acaccacgca acgaccagcc cacgaacggc tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc 7440  
 cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc 7500  
 tgaccgggga acacgaagac ggcgcggccc tcgccgacgg cgcggcccg 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 ggccaacgcc 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 tgaggctccc 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 ggtcgtcag gtcgaagagt tcgtcggcgg tgacgccgtc cagagcggcc 9300  
 cgctcgggtg tgccgtcggc cgtgccggcg tcccagcggg ccgcgaggtc ccgcaggtgc 9360  
 gccgccacc gccgcgggtc ggtgccgtcg gccggcagtg cggcagcgc gctctccacg 9420  
 cgggccaagt cggcgtgat ccggtcggcg ctgcctcgc cggactcgtc cggcaggagc 9480  
 gcgtcagagg ggtggtcggc gagcgcggcc gggttcgggt ggtcgaacac gatggtggtg 9540  
 ggcagtcgca ggccggtggc ggtgccagg cggttgcgca gttccacggc ggtcagcag 9600  
 tcgaagccca gttcctttaa gccgcggtcg ggtgccaccg cgtcgcgtcc ccggtgtccc 9660  
 aggacgtcgg cgacctggcc gcggacgag tcgagcagg cgggggcggc ctggggcggc 9720



ES 2 639 918 T3

ggcagcccgg tgatccgcgc caccagggcc gccgcaccgg gcaccgggcg ggcggcggcc 9780  
 gggccggccg ggggtggcgac caggccgcgc agcagcggcg ggggtggcgc ggcggaggcg 9840  
 gtggcgaggt ccaggcgcgc ggtgacggtc acggcgctgc cgggtggcggg ggccgtgtcg 9900  
 aacagggcca gtccttcggc ggcgggccatc ggcacgatgc ggttgcggcc ggcgcggggc 9960  
 acgtcggcgg cgtccagggt ccgggtgagg ccgggtggcgt cggcccacag gccccaggcc 10020  
 gcggcggtgc cgggcaggcc ggcggcgcgg cgccgttcgg cgagcgcgtc gaggaaggcg 10080  
 ttggcggcgg cgtagttagc ctgcgcgggg gtgccgaggg tggccgccgc ggaggagaac 10140  
 agcacgaagg cggacaggtc cttgtcctcg gtgagttcgt gcagggtcca gggggcgtcg 10200  
 gccttcgggc gcagtacgcc cggcagccgg ccggcgccga gttcggtcag cacgcgcgtcg 10260  
 tcgagggcgc ccgcgggtgt caccaccgcg gtcagcgggg cctcggcggg cagcttggcg 10320  
 agcagcgcgt cgagggcggc gcggtcgggt acgtcgcagg tctcgaagcg gacggtggcg 10380  
 cccgcgcggg ccagttcggc gaccaggctc gcgctgccgg gggcggcggc gccgcgccgg 10440  
 ctggccagca ccaggtcacg ggcgccgtgt tcggacacca gatgccgggc gagcatgccg 10500  
 ccgagcacgc cggcgccggg gatcaggacg gtgccgtcgg cgtaccgggc gacggtgagc 10560  
 acgatcttgc cgggtgtgcc ggcttgggcc atgaaccgga acgcggtgcg cgcgtcggcg 10620  
 agggggcagg tccgggtggg cagcccggtc agctcgcggc 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  
 acgggcacca 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 ggggtgccagg 11400  
 ggggcgggtg cgtcgggagc ggcgacggcg tcgacgccgt cgatgctgcc gggccggacc 11460  
 acgtcgacgc gccaggcgtc ggcgccgacg ggcgggcgca gcgcggtctc agcggcccgg 11520  
 gtgagccggg cgacgaggcg ttcgccgtcg cggagcgcgg tctgcggctc gtcgccgacg 11580  
 gccggcacag cgtccaggga ggcggggtgt ccgtcgggtg cgacgagcag gaaccgggtc 11640

ES 2 639 918 T3

ggggtgctcgg tctgcgcgga ggcaccagg cccagaccg cggcggcggc cgggtcgggt 11700  
 tctctgcccg gccgggcggc gacggcgtgc cgggtgacga tcgcgagccg ggcctgcccg 11760  
 aaccggtcgt cggcgagcca ctctgtcagc agttccagca cctgggcggg ggcocgggtg 11820  
 gcggcggcga ccacatcggc tctgtgtctg acgggagcga ggacgaggtc caccgcgccg 11880  
 gcgtcgatgt cggcgagggc ggtgctcagg ggcgcggcga ggccttcggg tccgtcgccc 11940  
 aggacggcgc agcgcgcggc ggcgggtgtc tcggcgtcgg gggctctcca ggtcacgcgg 12000  
 aacagcgcgt cgcgcgtgcc ggcggcggcc acggcgcgga gctgcccggc cgacgcgggc 12060  
 cgcagccgca gcgcggccag ctccacgacg ggcggccct cgcggtcggg cgcggtgagg 12120  
 ctacgcgtgt cggcgtctc ccgggcggcg cgcaccgca ggaccgggc cgggccgggg 12180  
 tgcacggtca cggcgtcca ggtgaacggc agcagcagcg gcgcgtctc gggctcggcg 12240  
 gcgggcacgg cctgggtgac ggcgtcagc agcgcgggt gcaagagatg gcggcggtg 12300  
 tcgacgggtgt cggggagtgc gacctcggcg tagacctcgg tgtcccggcg ccacagggcg 12360  
 cgcaggccct ggaaggcggg cccgtagccg tagccgcggg cggcgaaacg gtcgtacacg 12420  
 ccgtccaccg ggaccggctc agcgcgccg 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 gggagtctcg 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 cggcggctct ctgcatggcg accgtgagca cggggtgcgg gctgatctcc 13140  
 acgaagccgt ggtggccggc ggcgagcaga tcgctgatcg cgttctgaa gagcacgggc 13200  
 tcgcgcaggg tgcggtacca gtagcggcg cccagttcgc tgccgtcgat ccagtcggcg 13260  
 gtgacgggtg agtagagggg cacgtcggcg tcccgggggc ggatgccctt gaggtcggcg 13320  
 agcagccgct gccgtacggc ctccacctgc ggggagtgc aggcgtagtc ggcggcgacg 13380  
 cggccggcgc gcagcccctc 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 cgcagcgca cggctctcgc ggcgtcgtcc 13620  
 aggggtgagg cgccggcgac 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 tcggctcggc cggtgccgcg gacgacggcc 13980  
 gggtcggcg cgcccgggc gagcacgtcg agcgcggcga gcagttcggc gcgggtcccgg 14040  
 cccacgacgg cggcgcggtg ctcgaaacgc gtgcggcggg tggccagggt gaaccgacg 14100  
 gaggcgggct cgaggccggg gtcggcgcg acgaaactgc gcagccgggc ggctgttcg 14160  
 agcagcgcg cctcgggtcg cgcggacagc tgccagggca cggggagcgc accggccggc 14220  
 ggcgccgtcg ctctcggg ttcgggcgcc tccgccacga tcacatgggc gttggtgccg 14280  
 ctgacgccga acgaggacac gccggcccgg cggggacgct cccccgggg ccacgggcg 14340  
 gcctcggta gcagccgtac gtcgccggac acccagtcca cgtgcggggg gggctcgtcg 14400  
 acgtgcagcg tcttcgggag cagtccgtgc cggagcgca gcaccgtctt gatcactccg 14460  
 ccgacgccgg cggcgccctg ggcgtggccg aggttgact tcagcgagcc cagccacagc 14520  
 ggccggtcgc ggtcctggc gtaggaggag aggagtgcct gggcctcgat ggggtcgccc 14580  
 agggcggtgc cggtgccgtg gccctccacg gcgtccacgt cggcgggacg cagtccggcg 14640  
 tcggccagt cctgccggac cacgcgctg tggcgggcg cgtcggcg ggtgaggccg 14700  
 ttggaggcgc cgtcctggt gacggcggtg ccgggcagca gggcgagcac cgggtggccg 14760  
 tttcgccgg cgtcggagag ccgctccagc aggagcatgc cgacgcctc ggaccagccg 14820  
 agtccgtcgg cggccttggc gtacgagcgg cagcgaccgt cctoggacag gccgcctgc 14880  
 ttggtgaagt cgacgaacag ctccggcgtc ggcattgacg tcacaaccgc ggccagcgcg 14940  
 aggggtgctc cgccgagcg cagcgaccgc accgcctggt gcagggcgac gagggaggac 15000  
 gagcaggcgg tgtccaccgt gaagggcggg ccttccaggc cgaggacgta ggagatgcgg 15060  
 ccggccacca cgtggccag gcggccggtc agggcgtgcc cgtcgccgc ttcgggatg 15120  
 ccggcgagca gcgaggagta ggactggcg ttggcgccga cgaacacgcc gacgcgtccg 15180  
 ccccgccacg 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 gcggtgagc agccttcggg tcggtcagcg gctcagtcac ggggtgtccc 15900  
ctccagcggg tccggtgctg gcagtgcgga gacgggcagg ccgggttcgg cgagtgcggc 15960  
ctgtagcagc gcggcggtgc cggccagcag gccgtccacg acgcgtcggc cgagggcggc 16020  
ggcgcggtgt acgacgtgtc cggtgaggcc gccgtcgggg tcctcgacca ggtgcacctc 16080  
gaggtgccag cgggcgtacg cctggtggcc cgtgaactgc tcgacgcggg cgccaggcag 16140  
gccgagttcg ccgagttcga cgttgacgag ctggaacacg acgtcgacca gcggctgttc 16200  
ggggtccagg ccgaggcctt cgacgacgcg tcccagggc agggcctggt gggcgtaggc 16260  
gtcgagggcg gtgtcccgga cccgctccag caggccggcg aaggacgggt cgccgctgag 16320  
gtcgacgcgc aggggcacga agttggcgaa gaagccgatc agcccctcga cctcggcccg 16380  
ggtgcggccc gccaccgggg agccgacggc gaggtcgtcc gtgcccggcc agcgggcgag 16440  
cgtggccgtg aacgcggcca gcagggtcat gtagagggtg gcgtcgtgct cggcgccgac 16500  
ccggcgggcg 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  
tagtgccgcg taggcgccgg acagttcggg ccagagcacg ccctgggacc agccgtcggg 16800  
ggcgatgtgg tgcaccgtca gcagcaggac gtggtcgtcg ggggcgatcc gcagcagtgc 16860  
gggcccgcag accggtcccc ggacgagggtc gaacggcccgg gccgtgcct cgtcggccag 16920  
ggcgcgggcg gcggtctcgt cggccacgtc caccgggtcc agcacgatgt ccgtggcggg 16980  
caggatcacc gacgccggct cgtcgccggg cacgaagacc gtgcgcagcg cctcgtgccg 17040  
gcgcacgacc tcggtcaggg cgcggcccag caggtccgcg tccagttcgc cgggtgatccg 17100  
cacggccagc gggatcgtcc agaccgggtc gccgggggtcg 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  
 gggcgcgacc agcgagtgcc cgccgagcgc gaagaagtcg tcgtcgatgc cgaccccgcc 17400  
 ggtctccagc acctcggcga acacctcgca cagcgtctgc tccgcaccgg tacgggggtgc 17460  
 ggtgaagccg gtgtcgagcg tggtagcagc gtccggggcg ggcagcgcgg cccggtcgat 17520  
 cttgccggtg gtggtcagcg ggaacgcgtc cagcgcgacg agcgcggacg gcaccatgta 17580  
 gtccggtagc gcgtcggcca ggtgggcgcg cagccggggc ggcagccctc cgtcggtagc 17640  
 ggggacgggc acgacgtagc cgacgagccg cttgacgccc ggggctcct cgcgggcgac 17700  
 gatgacggcg cgggtgacct cggggtggcg cagcaggacg gcctcgacct cgcccagctc 17760  
 cccccgaag ccccgatct tgacctggtg gtcgagccgg cccaggtatt ccaggctgcc 17820  
 gtcgggcccgc cagcggcca ggtccccggt gcggtagagg cgggagccgg gcgggcccga 17880  
 cgggtcgggc acgaacttct gcgccgtcag ttccggcttg ccgacgtagc cgcgggcgag 17940  
 tccggggccc gcgaagcaga gttcgcggc cagcccacg gggaccggcc gcagccggtc 18000  
 gtccaggacg taggcgcggg agttgtcgac cggctcgccc aggtgtgagg tccggggcca 18060  
 gtcggcgacg tcagcgggca gggtagaagg ggtgacgacc tggatctcgg tggagccgta 18120  
 gtggttgtgc agacgcagac gggccgggc ggcgcagaac tcgcgcagca cgggtgtccag 18180  
 cgacagcggc tcgcccgcct gggagatgtg ccgacgcgag gtgagccggg cccggccggc 18240  
 gccggcctcc tcggcgagcg cgcggatcat caggttgggc acgaatatct gctcgacggc 18300  
 ccgttcgtcg agccagcggg cgaagcgggc cgggtcgcgg cgggtctcct cggtggggat 18360  
 gaccagcgtc tcgccgtaca ggagcgcgga gacacctcc tgcacatgca cgtcgaaggt 18420  
 gagggcggtg aactgggcgg tcgcggtgcc ggtccgccc ggtaccgtct tcttctgcc 18480  
 ggcgagcatg ttgaccacac accgggcggg catggcgatg cccttgggca cgccggtgga 18540  
 gccggagggt tagacgacgt aggcgagggg gtccggggcc ggtcgtccgg cggccgttgc 18600  
 cgcgggcggc tcctgcccg cggggcgtc cagcaggacg agggcgggtgc cctcggcga 18660  
 gacgtccgcg tgagcccggc cggtagcggc gacggtcatc cgggcgtcgt cgacgatgag 18720  
 ccggatccgg tcccgggggt ggctcgggtc gatcggcaca tagggggcgc cggccttgag 18780  
 gatgccgatc agagcggcca tctgcacggt gccgcgtcc aggcagaggc cgacgaggtc 18840  
 gtccggcccc acgccctggg cccgcagccc gggggcgatc cgctcggcct cgtggtccag 18900  
 cgcggcgtag gtgaggacgt cgtcctcgca ctccacggcg cgggcgcccg gggtaggggc 18960  
 gacctgctcg gcgaacagct ccacgagcgg gacgtcccgg tacgggaggg cgggtgtcgtt 19020  
 ccaccgctcc agcagcaggc gccggtcgtc gtcgtccagc agcgagagcg cggacagcgg 19080  
 cgcgtccggg tcggcgaggg cggcgcgag cagcacctgt tggtagtgca gcaggcggcg 19140  
 gaccgtgtcc gcctgaaca gcgcggtgga gtgcagcacg gtgccgcgca cccggtcggc 19200

ES 2 639 918 T3

gtccctcgggtg aggtgcactt cgaggtcgac gcggggtgaag gcgtgctcgt ccagcagcgg 19260  
 ttccagggcgg gcgggcgccga ggcgggtcgcc cttgtccccg ggcgcccga tcagctggaa 19320  
 gaccacctgg accagcgggt tgcgggacag gtcccgtcgt ggtgccaggg tctccaccag 19380  
 gtgctcgaag ggcaggtcct ggtggtccat ggcgcccacc accgtctcgc gcacccggcc 19440  
 cagcaggtcg cggaaggtcg ggtcgccgga gacgtcggtg 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 gcgcccgtga 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 cgtcgcctc ggccagggcg cgtacctcg cctcgtcggc 20100  
 gacgtccgtg acctccaggc ggagcgggggt cgcggggcgt acgacggcca taggctcgcc 20160  
 ggcgtcggcg gcgaagacgg tgcgcagcgc ctcgtggcgg gagaccacca gggacagtgc 20220  
 ccggccgagg gcgtcgacgt cgagcggggc gtgggcgcgt acgcccacg ccacgttcca 20280  
 gaagccgctg tcgggggtga gccgggtccag gaaccacagg cgcctggtgg aggacgacag 20340  
 cggaagcgcg gcgcccgtcc ggcgggcccgg ccggatgacg tccgtggccg tgccgggctc 20400  
 gccgagggtc tcggccagcc ggcgcgggga gcgcccgttcg aacaccgcct ggagcggcac 20460  
 gtcgggcccg aagcggggc gcgatccgggc gatggcgcgg gtggccagca gcgagtgcc 20520  
 gcccagggcg aagaagtctg cgtcggcgcc caccgggtgg acgtccagca cctcggcgaa 20580  
 gatctcgcac agcacccgct ccgcctcggc 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  
 gtcgcccgtc cggtacatcc gctcgcccgg cccgcccac gggtcggca cgaacttctc 21060



ES 2 639 918 T3

ggcggtcagg tggggccggc ccaggtagcc gcgcgccacc cggggcccgc cgatgaccag 21120  
 ttcccccgcc acgcccagcg gcgccgggcg gaggggtgctg tcgaggacgt acacccgggt 21180  
 gttgtcgatc ggcgcgccga tgggcacccg ggagccggcg agccggaagc cgggttccat 21240  
 cgggaacagc gtggtgaacg cggtcgcctc ggtcgggccc taggcgtcgg ccacgggtcag 21300  
 gtgcgggtgg gcgccatca cctgggcgac ggtctcgccg gacacggcct cgccgccgggt 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 acccgaggt gtagatgacg tacgccgtgg tgcgggggtg 21720  
 cgggtcgata ccggggtcgg tgcggggccc ggggcccggg tcggtgacgt cgaggacgggt 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 tggtcgcccgc 22200  
 ggagaccggc cggtcgggggt cggcgagcac ctccgccgag accaccgaca cgtggtgcat 22260  
 cagctggcgg acggtgtcgg cgtcgaacag gtcggcccgcg tacaggacgg tcgcgccgac 22320  
 ctcgtcgccg gtctcgacgg cgtgcacctc caggtccatc 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 agttcccga aggtcgggtc gccggacagg tcggtgcgga cggcgacgac 22620  
 gttgacgaag aagccgatca gcgcctcgggt ctccggcgcgg gtccggcccg ccgtcggcga 22680  
 gccacggcg atgtcctcgg tgcgggctga ccgggacagg acgaggtga acgcggccag 22740  
 gagcaccatg tagagcgtgg ctccctcgcg ggcggcgacg gcccgggcgt cccggatcag 22800  
 ctccggcgggc agctgccagg gcaggggtgc cggccgcccg gtggcgacgg cgggcccggc 22860  
 cttgtccagc ggcagttcca gcggggcgag gccggccagc cggccggtcc agtagccggc 22920  
 ccggcgctcc agcacctcgc cggtcagcca ggaccgctgc catacggcgt ggtcggcgtg 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 cgtcagcat 23220  
 ccgcggggcg accggggcg cggcgccgat gaccgcggcg ggcacgccgt cggcgacct 23280  
 gaaggtggtg cgcagggct cgtgccgggc gacgaccgcc gacagggcg cggccagccg 23340  
 ctccgggtcc agcggctccg gcacgcgacg ggctccgccg gaggtgtacg aggcgctgcc 23400  
 gggggcgagc tgggtccagga accacatccg ctgctgggcg aaggacagcg gcagcagccg 23460  
 gtcgcgggtcc gcgggcacca gcggcgcgcg cgggtcggcc gggagcgcg cgcggcgac 23520  
 caccgaggcc agggctcgcg gggcgcggtg ctgcaacacc tcgcgcagcg ggacctcgg 23580  
 gccgaaggcg cgggcgattc gggcgacgag gcgggtggcg agcagcgagt ggccgcgcg 23640  
 tacgaagaag tcgtcctcgg cgcgaacgc gtcggcgctc agcagctcgg cgaagatctc 23700  
 gcacagcgcc cgtcggcgt cggcgcgcg ggcgccagg ccggcgtccg ccgtctccg 23760  
 cggggcgggc agcgcggcg ggtcgacct gccggtggcg gtcagcggca gcgcgtcggc 23820  
 gaggacgaag gccgagggca ccaggtagtc gggcagggcc gccgcggcgt gggcgcgacg 23880  
 ggcggcggtg tcgggtggtg ggccggcgcg cgggacgacg tgggcgacga gccgcttgc 23940  
 ggccgggccc tcaccgcgca ccacgacggc ggcgtgcgcg acggcggggg gggcgccag 24000  
 gacggcctcg acctcgccg gctcgacct gaggccgcg agcttcgcct ggtcgtcggc 24060  
 gcggccgagg aactccagga cgcctcggg gcggcgcgcc accacgtcgc cggcgcggt 24120  
 catgcggtg cccgccggtc cggacgggtc gggcaggaag cgtcggcg tggccgccg 24180  
 ccggccggcg tagcccggg ccagggcgcg gccgccgacg tacagttcgc cgggcacgcc 24240  
 gaacgggacg ggccgcagcc ggtcgtcag gacgtggcg cgggtggtg ccagggggct 24300  
 gccgatgggc acccgccgc cgggggcccg gtcggccggc gcgatcgggt ggaggggtggc 24360  
 gaaggtggtg gtctcgggtg ggccgtagcc gttgacgacc gtcaggtccg ggtgggcgccc 24420  
 gcgcacgcgg gccacggtc cgggggacac ggtgtcggc ccgacgacga gttcgcggac 24480  
 gccggccagg caggtgacgt cctcctcgac cacgaggtcg aagaggccg aggtcagcca 24540  
 cagcgcgggt acgccctggt cggcgacgac acgggcgagg gcggcgggtc cgagggcgcc 24600  
 gggcggggcc accacgacgc ggcggccgga cagcagcggg gaccacagtt cgtaggtgga 24660  
 ggcgtcgaac gcctgcgggg agtgcagcag gaccggttcg tgggcgccgc cggaccagcg 24720  
 ccggtggagg gcgagggcg ccacggcgcg gtgggtcgtg gcgacggcct tgggcgtgcc 24780  
 ggtggaaccg gaggtggaca tcacgtacg 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 cgccgggtgcc 25260  
 ccgggcggcc cgggtccaggg ccgcgtcctc gcccgcgctg gtcacatgta gccgggacag 25320  
 cggccgggtc ggctcggcgc aggcggcgcg cagcagggcc gtcaggtggc gggccagccg 25380  
 ctcgacggtc tcccggtcga acagggcgcg gctgtagttg atcagtcctt cgacgccgcc 25440  
 ctggcggtcc tcgccgaggt agacctccag gtccatgcgg gtgaaggcgc ggtcgccgcg 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 tgcgggctg 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 ctgcggggcc agccgctcgg cgtcggcctc 26340  
 gtccaccggc tcggtcacgg gaacgggcac cggctccggc ggcaggacga cggcgccggc 26400  
 cacgccctcg tggtcggcga agacgggtgc cagggtctcg tgccgggcca cgacacagct 26460  
 cagcggccgg gccagcaggc cggcgccgag cgggcccgcg acgcgcacgg cggtgccgaa 26520  
 gttgtagaag gcgctgtccg gcatcagccg gtcgaggaac cacagccgct gctgggcgaa 26580  
 cgacagctcc agcggccggc cgcgggggac ccggctgatg ccgcggggtg 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 acatcgctctg 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 cgcgccgtcg 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 cgggtcgac ccggccggcg tgatcgaccg 27480  
 ggcgatctcg cccgcgcgga ccgccaccat ggacagcagg gtggaggcga tgccgtgggt 27540  
 cgcctcgggt gcgccctgga cgtagatgcc gcaccgaaa tccccgggtg tgccgagccg 27600  
 gtagtcgcgg ccgatcagca actccccgc ctgctcccg cggagggcgc cggagacgcc 27660  
 gccgagcagt tcggccgggt cgggtggagtc gtaccgggtg gcgtacacga ccaggtcggc 27720  
 gtccaggtcg gtgtgttcgc ccgtgggagc gaactccacg cgtacggcg 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 acaccgcga cacctcggcc tcgggtagc ggtccatgag 28080  
 gtgcgcggcg acctcggcc cgtctggcc ggcgccgacc acgacggccc ggcggggcg 28140  
 gcgttcgtcg aacgcgggca gccggtgcag caactgggag ctgtgccaga cgcgttcgcc 28200  
 ggtctccgcg ccctcgggca gccggggcg caggccggag gcgaggacga ggtttctggt 28260  
 ccgggcgacc acccggtccc cggcgagcac gtcgagcgcg acgacctac 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 ctgcgagctg gatgattgct ctgagagccg 28740  
 ggtcatatat caaccgccat tagtttttca atggatgtat cgtcgcagga cgtccagaat 28800  
 tcacctgca cgtcctccag atgctgagg gaacgcgcgc tgtaaaagggt ggtctggtac 28860  
 tgggttatgt cgtagtcgac gtgggcatg tggcgatgt ccagcggccg gatctccgcg 28920  
 gaacggaagt gctccagctc gccgtaggag gagacgacgc tggcgccgta ggcccggggc 28980  
 ccgtcggcgg cgtccagcag gccgcattcg agcgtgaacc agaaggctctt ggcgacgaac 29040  
 tggacggcgt cctcggactc caccctgcgc acggcctcgc cggccaggcg gtacaggtg 29100  
 gcgaaccggt cgtcggccag ggcgctgccg tgcccgatga cctcgtgcag gatgtccggt 29160  
 tccgtcgagt agaagggtgt cgcgctgtcg cggaggtact ggggtggagtg gaagtaccgg 29220  
 tcggccagag agccgcagaa cagggcgaag ggaaccacgc cggacgcggg gcgtaggcgg 29280  
 aatccggtca gctggtcgag ccggtcggac acttcacgca actgcgggac gccgtcgccg 29340  
 cccacctcga gccgctccgc cgcctcagc aactccggcg ccgccatgtg ccggtgccgg 29400  
 tccgcgagcc gcttgaaac cagggccac agagcgtgct cggcgtccgt gtactcgacc 29460  
 tctggaatgg gctcgcggg cacataggcg gcagcgcttg cggcgatttg gtcacgccgc 29520  
 tgctgataca ccgacgacgc ggttaattcg ggcgcgccc agccgatttc cacgaacttc 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 ggcagggcgg 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 acggcagtg 30180  
 gggcggtgcg ccttgacctc ccgcgcgc ctcagcgct cctcccggaa cttcgggctg 30240  
 cccgcgccc ggggtgctgat cttctcgcg aagatgtagt cgcgcgagat gccgtgtttg 30300  
 gcgagcgcgt cgagctggga gtcacttcgc ctgcatccgc ccgcgcgcgg agtgggtgcg 30360  
 catcgtggca gcgcgcgtca gatgcgcggc gtcgccccca ggtgaactcc gtcgcccctg 30420  
 gggcaggggtg ggcggagttc accggtcgt gcggttcaac ggggtccaatg gaggtcgcga 30480  
 tacggtccgc ccggcgcgcg ggcgcgcatc atcattccgg cggggcggag 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  
 tcccgcacatc 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 gcccgtgac 31680  
 ctgtgacagc ggactggcct cgaaggtgga ccgaatgcag ttcttgacag caaagacgga 31740  
 ccgccgcagc tcaggggcgc agtgcccgcc cgcagcacag tcggttcagg gctcgacgcc 31800  
 ggctacggac agacgtggat cgccggtcgc ggtcagcgcg aacgctgtcc ggtgaagagg 31860  
 cggtagacga ggagcacgat caccgagccg acgaccgcg 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 ccgtcggccg 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  
 cacgctgct 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  
 aagggagttag cggctgcttc gattacgcc cgcagctct tcggggaggg ttcttcgggtg 32880  
 ggccgctcgt agctgaggat atgggcgaat ccgcccggctg agacggcgtg gcggacgaag 32940  
 gcgtggaacc actccagcag tgcggtgcgg ccgtcctcgg acgcactcag ccgatgggcg 33000  
 cgctcgcaca ggccccgaat gcgctcctgg aagacggctt cgaggagcgc ccggcgggtg 33060  
 gggaaagtgac ggcgcacggg cgccgaaccg acgcctgcga tgcgggcgat ctgctcctgg 33120  
 gatgcctcgg ccgctgctgc ggcgacttcg gcttcggcga cggcgaggat gcgctgatag 33180  
 ttgogtcggg cgtccgagcg ctggccagtc atggtctcct cgttgctaag tggcggggccc 33240  
 cgccatatct tagcggcaca cgaaacggcg ggccccgccg ttttgtctct ccggcccttg 33300  
 aggagcagca ccatgccag cagcagcgat accgtcctgg tcaccggcgc caccggccag 33360  
 caaggcgggg ccacggctcg cgcgcttttg gccccaagg tgcctgtacg tgcgctcgta 33420  
 cgcgatccct cgtcgaagtc cgccccggcg atcgaggcgc tgggcgcgga actggtacgc 33480  
 gcggatcttt ccgaccgggc ctccctcgac ccggcggctcg 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 acttccacac caagcaggcg atcatggagg cgtgcgtgg tgcgggtttc 33780  
 gcccgctgga cggatgatcaa gccgccttc ttcattggaga acctgcccct gctggcacc 33840  
 aaggggcccc gcggcggact gctgacggta ctgaagccgg acaccgaact ggccttgggtg 33900  
 gccgtgcggg acatcggcac ggccgcggca cacgcctcc gagaccccga ccggttcac 33960  
 caggtggaac tggaactggc tggtgacctt cgcacgatgg agcagatcgc gcagacctg 34020  
 tccgccgctt ggggcgtgcc cgtgaccgcg cctccctga gcgtggaaga ggcccttgcc 34080  
 gcgggcatgc cgaagtgggg agccggacac gagtggaaaca acgtggtcct ccagcccgcc 34140  
 cggeccacat tcgcccggaa gttgggcatc ccgctacca ccttcgccga gtgggcggat 34200  
 gagcagttga cacatgtgtc tgattagggg tgtggcggca agggcgcgcc 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 tgctcgcgcg ggtgccggca gcctgttcgt 34500  
 tggagtgcgc gtggcttcgg agcccgtccg ggaagtacac gccgtgggcg ctggcccatg 34560  
 ctgcccgggt gtcgctcgcg tgggggaacg agtaccgcaa ggacgcgggc gatgcccgtt 34620  
 cggcggcctc cctcgggtcc tcgcoctctt cctcgtcgtc ctcgttccag tcgagagcgc 34680  
 ggccgggtcc cgcccatccg cacgagcaca ccgcgcgcaa cgctgccgcc cgcggtccgc 34740  
 catgaggccg gccgtcgtag acgctccgct ccgatagcca cctggcctcc gctccggaag 34800  
 agctgaggaa gagcacagga tccgggacgg tgccatcggc cagcaacacc ccgaccgcac 34860  
 ccacgtggga cgaccggaac tcctccgtcg tccacgtctc cctctcacct tcaccatcg 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 tcggcggccg 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  
 cgggcgacgg gcttctggtt ccgctcotta tcgacttcga cagagtgtc ggtgtgctca 35580  
 gtgactccgg atccgctgca agcggagcaa ggcacgtcag acatthtccc aggatgcccg 35640  
 attctgtggg gccgtgtcag tcgtcccgcg aactcgcgc gctaccggac cgggcgggcc 35700  
 catcccgaga atctcccgcc tgcatacagg cggcgccaac ggcgagcccg aacctctggg 35760  
 ccacgcggtc gtcgcgcggc ccggtgggcg acctcgtgcc gccacgttcc cactgcgcgc 35820  
 tgttccgcca ctccccgcc cccagggcg agtcctcgtc gcgctcgcag tactgccgca 35880  
 cgagcaggtc gcccgctccc ggagaggccc cagcatcacg gcccgtaag gtgctccgga 35940  
 tcggtggtgg ccggttgtaa ccgccacgcg ccgcccggct cgtcggcctg gccatcggcc 36000  
 ggcctggtcc cgctcaggat gccggggcg tcaggacggc cttggcagcc agccggaat 36060  
 tcctgatcat cggattcggg tcgcocttgc ggctgaccag gacgaccgg ctggggggag 36120  
 cgccctcgac cgggacggtg acgaggtcgg gacgcagtga 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 gtgcggcag 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 tcgtgtgcg agatatttct cgagccgttg gatctgacgg ctcagcgcgg 36780  
 gctgggctac gtgcaggtcg gcggcggccc ggccgaagtg ctggtgcgcc gccaccacgg 36840  
 tgaagtagcg caccagccgc agttccaggt cctgcccgag atcgttcacc ctgcgagggt 36900  
 acgcgtcatg ccgtttcggga atggtcagat tgccgaaccg gtcttgacg gccatgccgt 36960  
 cccgggcttt gactgaagga gcaacgtttc cccgagaaag cgacaggcgc gatgaaggcg 37020  
 atccagatcc acgaagcggg tgggcccggaa gttctgcggt acgacgagggt gccggctccc 37080  
 gagatcggcc cgggcgaggt gctcgtccgg gtgcacgcgg cgggcatcaa cccgccggac 37140  
 tggtacctgc gtgaagggat gaaggatcatg ccggccggga tgaggccggc gctggagttc 37200  
 cctctgatcc ccggaacgga catgtcgggc gtggtccagg cggtcgctcc ggacgtgccg 37260  
 gggttcggcg tcggcgacga ggtcttcggc atgctgcggt tccccgatt cgacggccgg 37320  
 acgtacgcc agtacgtggc cgcgccggct tctgacctgg ctcaaacgcc ggccggtatc 37380  
 gaccacgtgc aggcggccgg ggcgccgatg gccgtgctca cggcctggca gtacctggtc 37440  
 gacctcggcc acgaggtgcc gtctcctttc accggccagg tgcaccagcc ggtgccgatc 37500  
 acgccgggga tgacctgct ggtcaacggg gccgccggtg gagtgggcca tttcgcggtg 37560  
 caattggcga aatggaaggg ggcacacgtc atcgcggtgg cctcaagtcg gcacgagcgg 37620  
 ttctcgcgcg agctcgggtc cgatgagttc atcgactaca ccacgacgca ggccgcggac 37680  
 gtggtcagcg gtgtcgacct ggtgatcgac accgtcggcg gcccgacgg ctcacgcttc 37740  
 ctgaccgtac tcaagcgcgg cggcaccctg ctcccggtgt tcttcgccga gtacgacccg 37800  
 gaagagacgg cgagtctgga catcacctc tcgaacattc aggtacgttc ccacggcccc 37860  
 cagctcgcg agatcgggcg cctgttcgac gagggcacac tccgggtcgg ggtggacagc 37920  
 acctaccgc tgtccgaagc ggtcagcgca cacacgcgag ccgcgcaggg ccacatccaa 37980  
 ggcaagatcg tgctgacggt ggcctcgtga tcgccgaaac tccagcaggc ggtggcgaac 38040  
 tacgcccacg ccttgacgga gttgcatata cccgagctgg aaacggtcct ggccgaagac 38100



ES 2 639 918 T3

accacctgga ccgtcacgat gcccgacag gggatgctcg gcccctcgc 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 cggaatagtg ctcgtgcacc cagtogtct 38700  
 acccggccca 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 gaagggatag cgcttcgccg 39060  
 ctatctcctc aggaccggcg gtgtagaaga gcggcaggat cgggttgtcc tccacgtct 39120  
 cgtagaagac catgctcccc agctctttgg cgatcagctc ggccacgctt gtcttcccga 39180  
 tcccgatcat gccgccgacg cagatcactg ccatacctcg cttctttccc 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  
 gagcgcagcag ccgagcctgt gtggacgccg 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  
 gggcgcgtct ctccgcaccc gatgtgcaa atacttcggc gtcattgatt ccgtgcagca 39960



ES 2 639 918 T3

acgagacgat gacggcctct ccttggcgca ccgctgctccc gccagggaca 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 gccgcccgca cgcggagcag tgagctcaac gcgaccatgg 40440  
 gaaggggcca agcataaccg ctgaccaggt cggcgcctgg ccccgaacc 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 gcgggggtgc tgtctcccct gccgcccagc 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 ccggcccga 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  
 gagccccgc tcctgtgcca ggatccgcgc cttgtggacg gttccggggt cgcgctcgat 41760  
 tcccacgacg tgtccgcccg gcccgaccag ttgggcccgc agcagagaga cgtatcccag 41820  
 tccggcaccg atgtcgagga cgctcatccc cggacgtact ccggccgacc gcagggtgcg 41880

ES 2 639 918 T3

ttcgggtgaac ggcgagatcg cctcgttctg aagggtcagc ctttgggtgct cgctatcgga 41940  
 gtaaccgagc aggtatgctg cgtgcgccat gcgaggcctc cagggccggt cgtgccccga 42000  
 gttccccacg gcaggtggcc agggggctcc gcggtgtctg gagcactgag tgccctgtag 42060  
 cggccgtgcg gtgtggtccg gtgttccggg tatgtcacgc accggagcgg gacatgtacg 42120  
 tgtccgaagg cggcgggccc gcgagagcct tgccgctgga ggtgcgtgcg atccccccgc 42180  
 gcgcacgaa ctcgatcgtg tcgggtgtga tgcccagctc ggccaccaca cgtgccccga 42240  
 tgtgttgctg cgtggcacga cggctcgctc cgtcgtgccg cgtcgtctcg acgacgagcc 42300  
 cgaggcggcc tcctcgtcgt ctccagatct gctcggccag gacgccgtgg acgaggaggc 42360  
 cgggtgtgtc ccgcacgacc gcctcgatgt cgctcgccca gtggttcgcg ccgaagacga 42420  
 tgatcacctc tttcgtgctg cccacgatgt acagctcgcc gtcgtgccac aggcccaggt 42480  
 caccggctcg caaccagccg cccggaagga ggacgcgacg gctctcttcg ggggtggcgt 42540  
 cgtaccgggt gctcgtgacg gacgcccccc ggacctcgac ggccgccacc gtgccccgca 42600  
 cggccgggtg gccgctcgcg gtggtgagcc ggacctcggg acgccgcacc ggcgttccca 42660  
 cactgaccag ttcgcgacac ggcccggcgc cggacggcac cggtagctaa cggccccggg 42720  
 tcagttcgtc ccggtcggca cgcagcacct tggccgggcg gccgagggga gggaaaggca 42780  
 ccgccagggg cgctccgcc agtccgtagg ccggcaggaa gacgttctcg gacagtccgg 42840  
 cgggcgcgaa acgctcggcg aaggcgtcct gaagccgccg gtcgaccggc tcggcgccgt 42900  
 tcaccgcgat gcgccagcgg gagagatcga ggccggccgg cggcgcccgcg tcgcccctca 42960  
 ggacgtagcg gtagccggag tcaggagcca tgggtaaggg cccccccagc cccccatgg 43020  
 cccggatcca gtcacccgga ctgcgacaggt agtcctccgg tgtcagcaga tggatgtcga 43080  
 cgtcgtgcag cagcgggtgtc aagaaggaac cgatcaggcc catgtcgtgg aagaggggca 43140  
 gccaggtgca gccgacgtcg gtccctggcga gccgtgtgcc atgggcgatg gccgccacc 43200  
 cggccgccac gttgccgtgg ctgagcacga cggcccgcgg ttcgctgctc gtgccccagc 43260  
 tgtactgaac gacggccggg tccgacgcc cccgcgcgac gtgggcccgg gacggctcgg 43320  
 ccaoctccgg caccaggagt acgtcgaccg ggccggcgcc gtcggacagt ccaggaccga 43380  
 gcagcgggcg catggccgga gccgtcagca cggtccttac ccgagagcgg cgcagggccg 43440  
 cggaggtgcg ccggagatag gcgtcggacg acccgaaggg cgcgggaccg ggcagcggca 43500  
 ccgcgaccgc gcccgccgcc agcacgccga agaaggcgcg cgcgaagtcc accgacgtcg 43560  
 gcaggacgag ggcgacccgc tcgccgggtc gcaccccgcg cgacagcagc ccccgggcca 43620  
 cccgccggc ctccggcgaag aggtcgtctg aggacagcgc gtcgccgtcc tggccccggc 43680  
 gcagcacgtg catgccccgt ccggagcctt gtgcggcgac gcggccgagc gcggcgaaca 43740

ES 2 639 918 T3

gggtcacgac agcggttccg tgccggcctc cgcgatcacc ttggtgatcg cggccgcgaa 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  
 gccgggcccgg 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 tccacgggcc gttcgtcgcag catgccgtgc tcgatgcggc ccaggctccac 44820  
 ctcgggccag tcccagcgcg tcgtctcga ccagtcgaag atcttgttga aggtcatgtc 44880  
 gaggtagtag tcggtgtaga ggtcgtccgt catcagcgcg cgggtgcgcc gcagggccag 44940  
 ttcgaccgag gtggtgaacc ctccgggcgc caccgcggcg ggccggacga tgtcctogac 45000  
 gtccagtgtt tccgcccagc cgggaaccgg gcccgccgta tcgggcccga cgacgtacac 45060  
 ccgggtccgg ttgaacttcg agtgcgaccg cagcgcggcg acggcgggca gcggctoggc 45120  
 gtcgcggccg atccacaccg ccgcgagctc ggatgacggc tcgaactcgt gcaggtagcg 45180  
 gtgccagtcg gcgtgtgccg gccggtccac ggtgacgtcg ccgaaggcgg ggacgggtgag 45240  
 ctttcggcg ggggagactg cgggtggtgg tgccagcagg gcgatggtgt gcgggggcac 45300  
 ggagggcgtc ctctctgtcg gtctgcgcag gccgtcggcg agcaccttgc cgcgcgttgt 45360  
 gtggggctcg gctccgtaac acgtgcgtgc cgcgacgtca gagccgcccg tactccgcgg 45420  
 cagggccgag gactacgggc agcgcctcga tgctgttgcg gacgaacgag ggcacgggccc 45480  
 gcacgggtcca cgtgtcggac ggggccagcc gcacgtcggg gaaccgggtg aagaatccgg 45540  
 ccagtgccgt ctccagctgg agacgggcca ggtgtgtccc gatacagaag tgcgggccgt 45600  
 gcccgaaacc gaggtggccg gcctgccgcc ggcggacgtc gaagaggtcc gcgtccggcc 45660

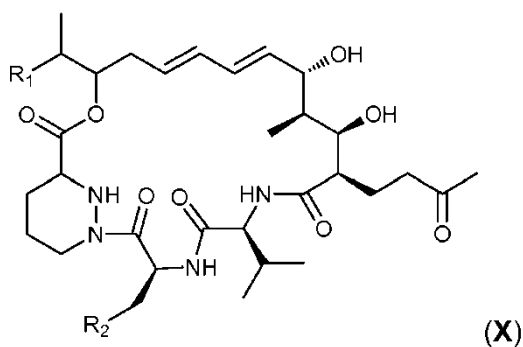
ES 2 639 918 T3

cgtggtgcbc cgggtcccgc cccgccgagc cgaaggacgc gaggatggct tctccccggt 45720  
 ggatcgtctg gccggcgatg acgacgtcct cggtcgggta gcgcatcggg aactggttca 45780  
 ccgcgccgtt ccagcgcacg gtctcctcga ccaccgcact ccacgggacc tccccggcgc 45840  
 gggcggaggc cagttgctcg gggtaggtga gcagcgcgtg gcaggcggtg acgagtacgt 45900  
 tgatgacgct ctggtggccg gcgaagaaca tcagcaggat catgccgtgc agttcgtctg 45960  
 cggtagaccg gtctctccg tcttggcgtg 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  
 ggtaggcga aagccttgccg agatccaccg gccggctctc cggccgtgtg gcgagctggt 46260  
 cgaggagccc gtcgacgagg cgttccacc cccgggcgat ggcctccacc cgttccgggg 46320  
 tcagtgcctg gtcgaccagt ccgcgcagcc gccggtgatc cgcgccgtgc gaattgatga 46380  
 cgctgtcggc cgcgacgaag cccatcaacg gccaccgctc cggcacttcg ccgcgggccc 46440  
 ctgcctcca gtgcgtgatt cccttggcga ccctgggatc cgtcagcact cggcgcaggt 46500  
 cctcgtggtg cggaatcgcc cacgcccga caccgccggg gagttggacc ggaacggctc 46560  
 tccccgccgc ccgcaggcgg gcgttctccg cgtgct 46596

REIVINDICACIONES

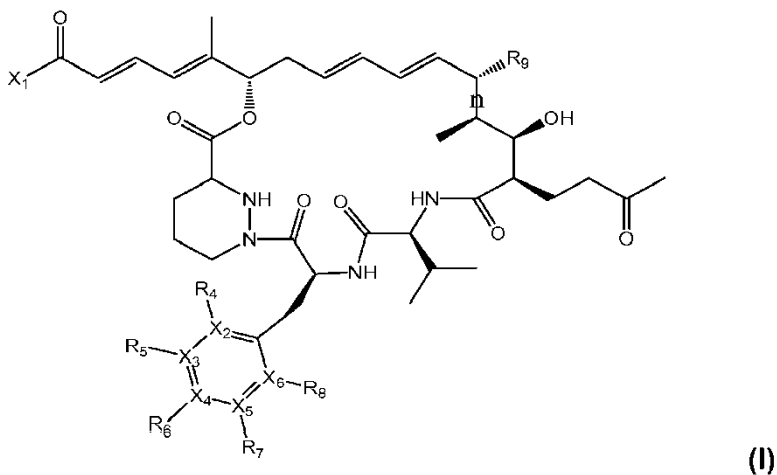
1. Forma de dosificación farmacéutica para administración oral que comprende una sangliferina como principio activo en la que el principio activo de sangliferina está protegido frente a degradación ácida proporcionando una capa de recubrimiento entérico, siendo dicho recubrimiento entérico estable en 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<sub>1</sub> representa un resto orgánico y R<sub>2</sub> 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<sub>1</sub> representa -OR<sub>1</sub>, -NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> o R<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> 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<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> que no son parte de un grupo arilo o heteroarilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> están opcionalmente sustituidos por carbonilo;

o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> están unidos de tal manera que NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub> 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)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están 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;

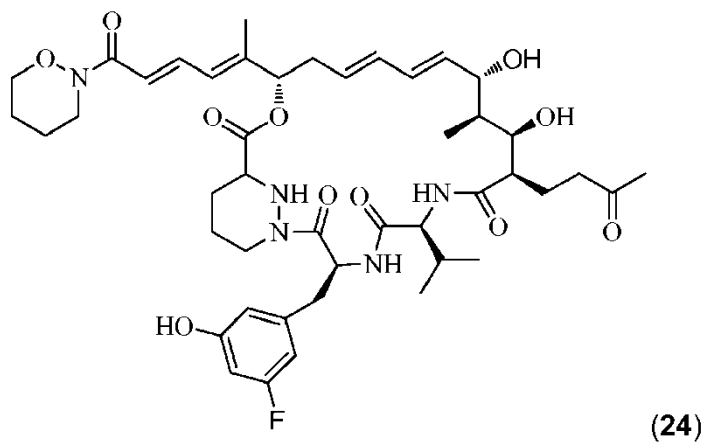
15  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  representan independientemente H, F, Cl, Br, alquenoilo o alquilo en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y  $S(O)_p$  en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que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

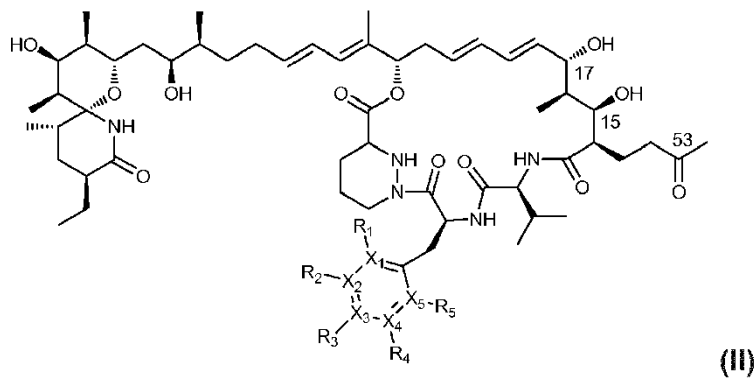
con la condición de que cuando todos de  $R_4$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  y  $R_8$  representan H y todos de  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_4$ ,  $X_5$  y  $X_6$  representan C, entonces  $R_5$  no puede representar OH, -O-alquilo u -O(CO)-alquilo;

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;

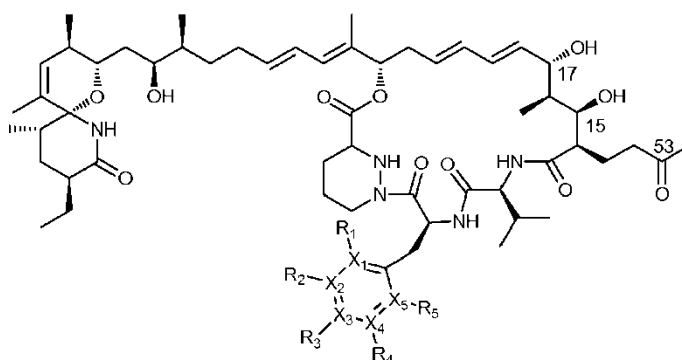
30 C. compuesto 24 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



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



35



(III)

en la que:

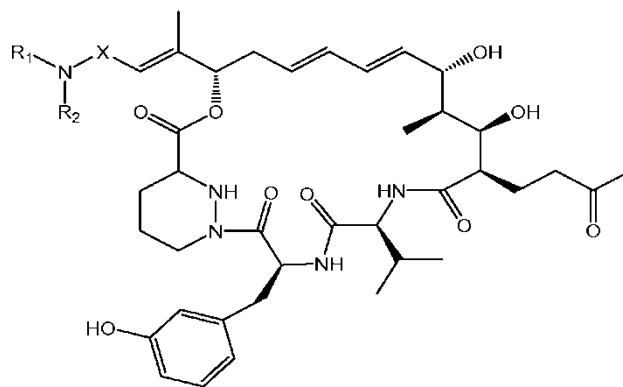
5 R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan independientemente H, F, Cl, Br, alquenilo C<sub>2-6</sub> o alquilo C<sub>1-10</sub> en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> 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<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> 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<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> representan H y todos de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>, X<sub>4</sub> y X<sub>5</sub> representan C, entonces R<sub>2</sub> 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;

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



(IV)

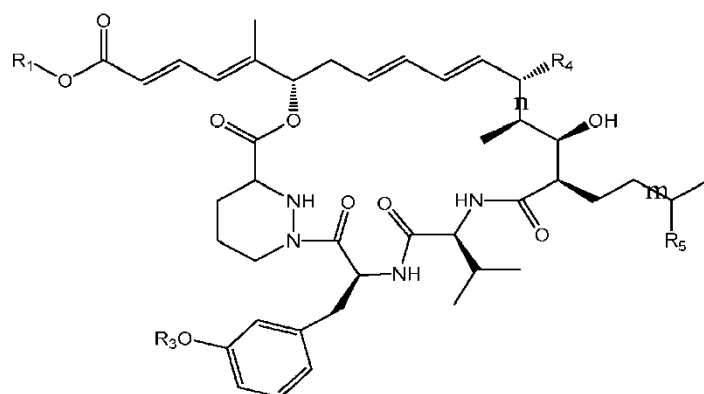
25 en la que:

X representa CH<sub>2</sub> o CO

30 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente hidrógeno; o un grupo alquilo o alquenilo 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<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> están opcionalmente sustituidos por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> están opcionalmente sustituidos por carbonilo; o uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representa -alquilarilo, -alquenilarilo, -alquilheteroarilo o -alquiliheteroarilo y el otro representa H, alquilo o alquenilo;

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 R<sub>1</sub> 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 R<sub>1</sub> representa hidrógeno;

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

15 siempre que R<sub>1</sub> no represente metilo o -CHMe<sub>2</sub>;

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

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

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

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

n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R<sub>4</sub> representa H; y

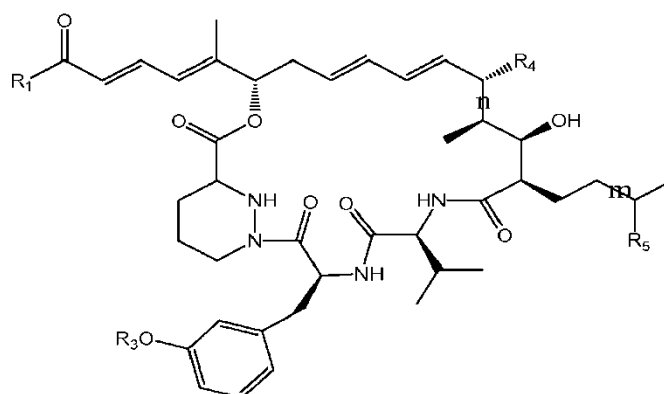
30 m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R<sub>5</sub> representa H;

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, alquenilarilo o alquenheteroarilo, 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)<sub>p</sub> 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)<sub>x</sub>-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

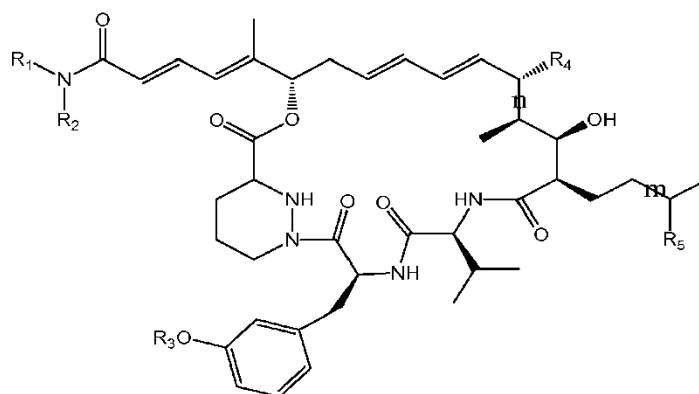
m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace  $R_5$  representa H;

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 R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan independientemente alquilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno, alquilocicloalquilo, alquilocicloalqueno, alquencilicloalquilo, alquencilicloalqueno, arilo, heteroarilo, alquilarilo, alquilheteroarilo, alquenilarilo o alquenheteroarilo, cualquiera de tales grupos puede estar opcionalmente sustituido con arilo monocíclico o heteroarilo monocíclico;

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

15 o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> 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)<sub>p</sub> en el que p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho anillo están 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 R<sub>1</sub> y/o R<sub>2</sub> pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más átomos de halógeno;

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

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

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

30 n representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando n representa un doble enlace R<sub>4</sub> representa H; y

m representa un enlace sencillo o doble, salvo porque cuando m representa un doble enlace R<sub>5</sub> 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

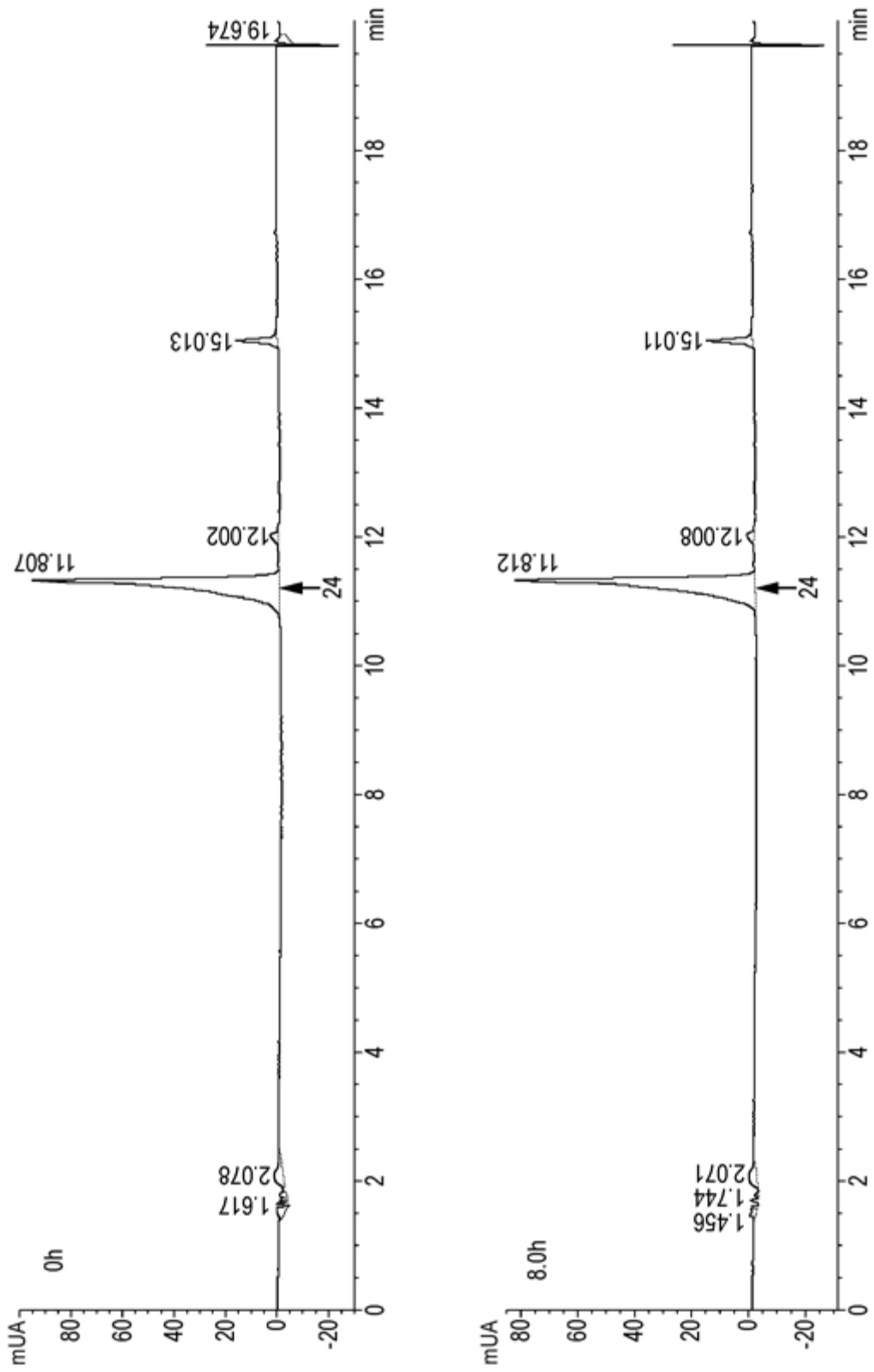


FIG. 1A

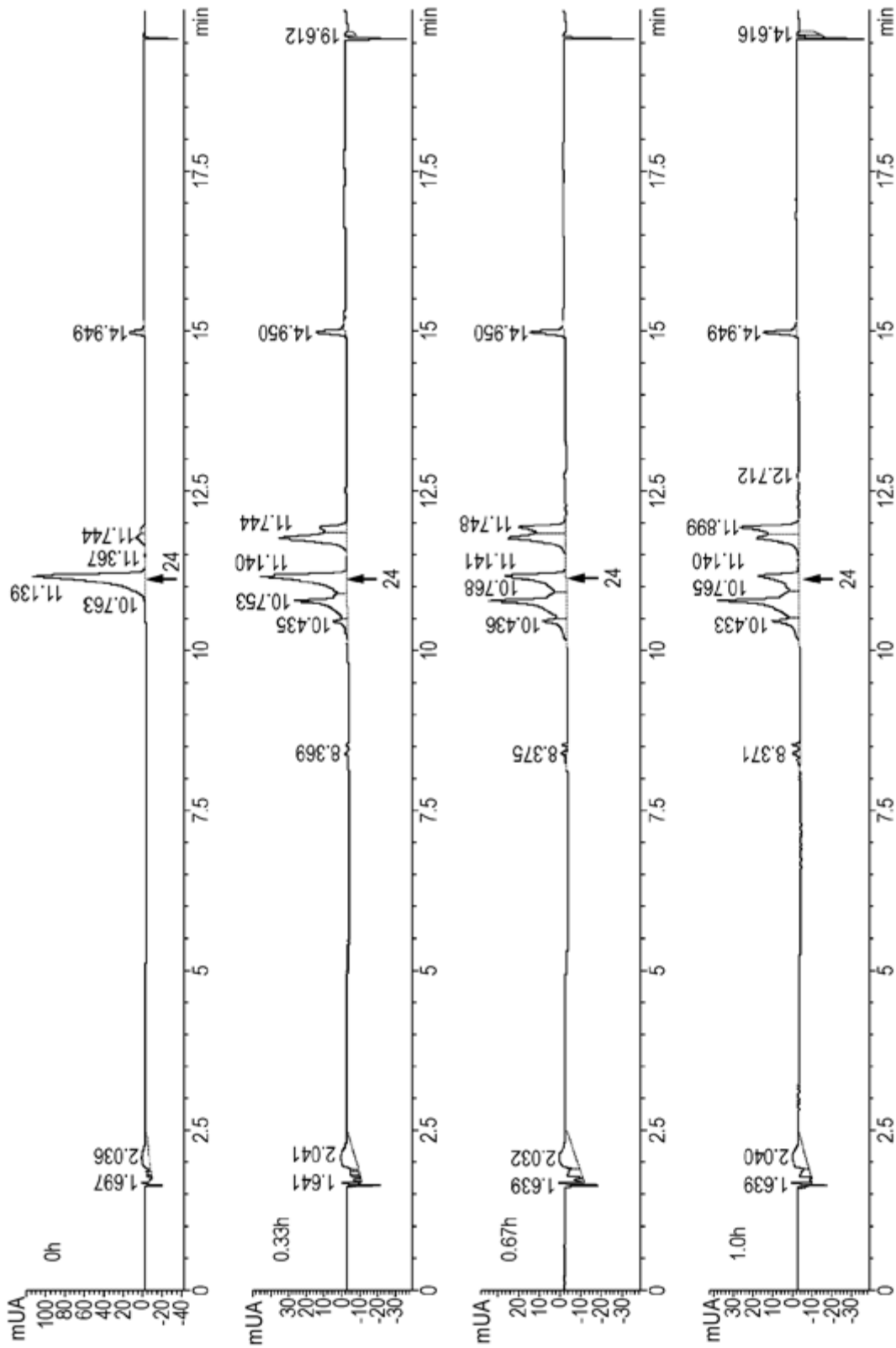


FIG. 1B

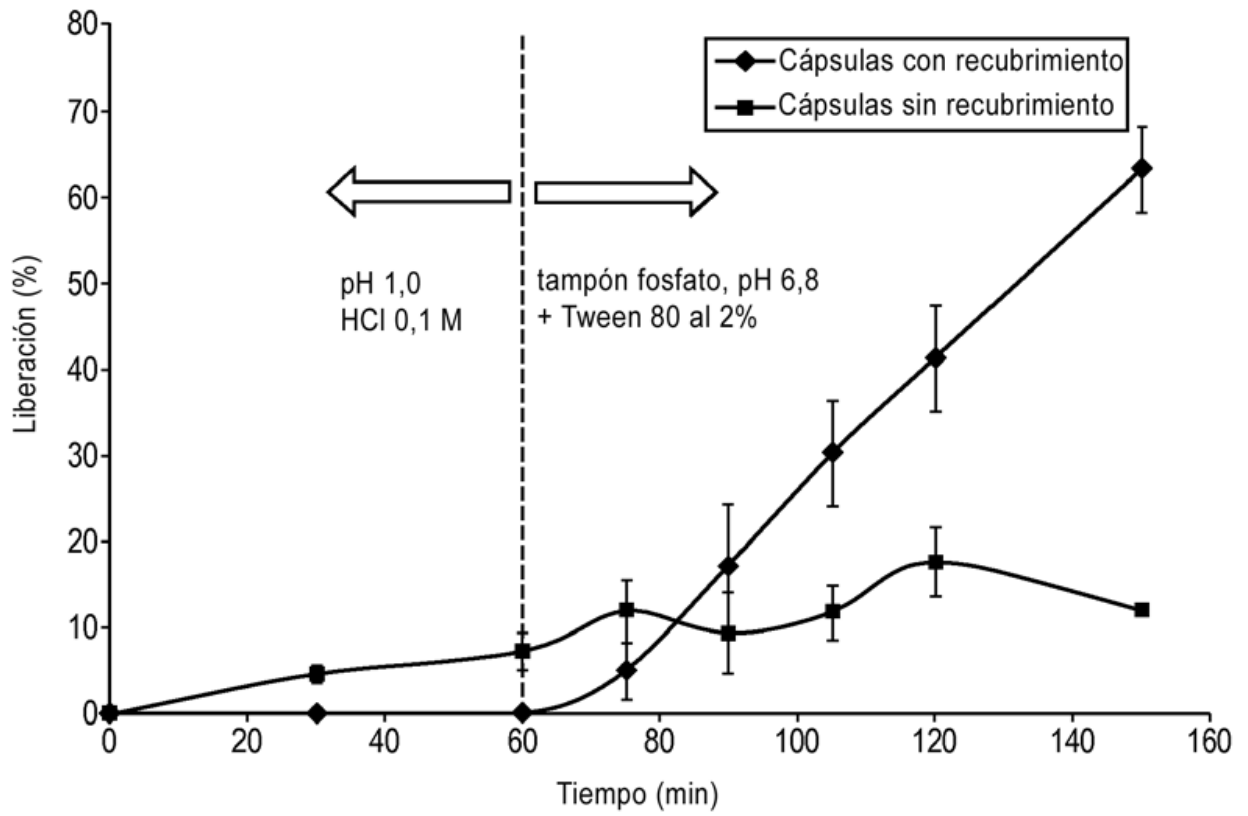


FIG. 2