

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 433**

51 Int. Cl.:

A61K 31/5025 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/GB2011/052524**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12085553**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11808295 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2654753**

54 Título: **Derivados de sangliferina y métodos para su producción**

30 Prioridad:

20.12.2010 GB 201021522
08.08.2011 GB 201113626

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MOSS, STEVEN JAMES;
GREGORY, MATTHEW ALAN;
WILKINSON, BARRIE;
KENDREW, STEVEN GARY y
MARTIN, CHRISTINE JANET

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 703 433 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

Derivados de sangliferina y métodos para su producción

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación de análogos de sangliferina, que son útiles como inhibidores de ciclofilina, por ejemplo en el tratamiento de una infección viral, especialmente infección por virus de ARN tales como virus de la hepatitis C (VHC) y VIH y/o como inmunosupresores, por ejemplo, para su uso en la profilaxis del rechazo de trasplantes y como agentes antiinflamatorios, por ejemplo, para su uso en trastornos inflamatorios. La presente descripción también proporciona métodos para su uso en medicina, en particular para el tratamiento de infección por VHC y para su uso como inmunosupresor o agente antiinflamatorio, o como productos intermedios en la generación de compuestos útiles medicinalmente adicionales.

15 **Antecedentes de la invención**Hepatitis C

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

Además de enfermedades hepáticas, los pacientes infectados crónicos también pueden desarrollar otras enfermedades crónicas relacionadas con VHC, y sirven como fuente de transmisión a otros. La infección por VHC provoca complicaciones no hepáticas tales como artralgias (dolor articular), erupción cutánea y daño orgánico interno predominantemente al riñón. La infección por VHC representa una importante carga asistencial global, y actualmente no existe vacuna disponible para la hepatitis C (Strader *et al.*, 2004; Jacobson *et al.* 2007; Manns *et al.*, 2007 Pawlotsky, 2005; Zeuzem & Hermann, 2002).

35 Tratamiento de VHC

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

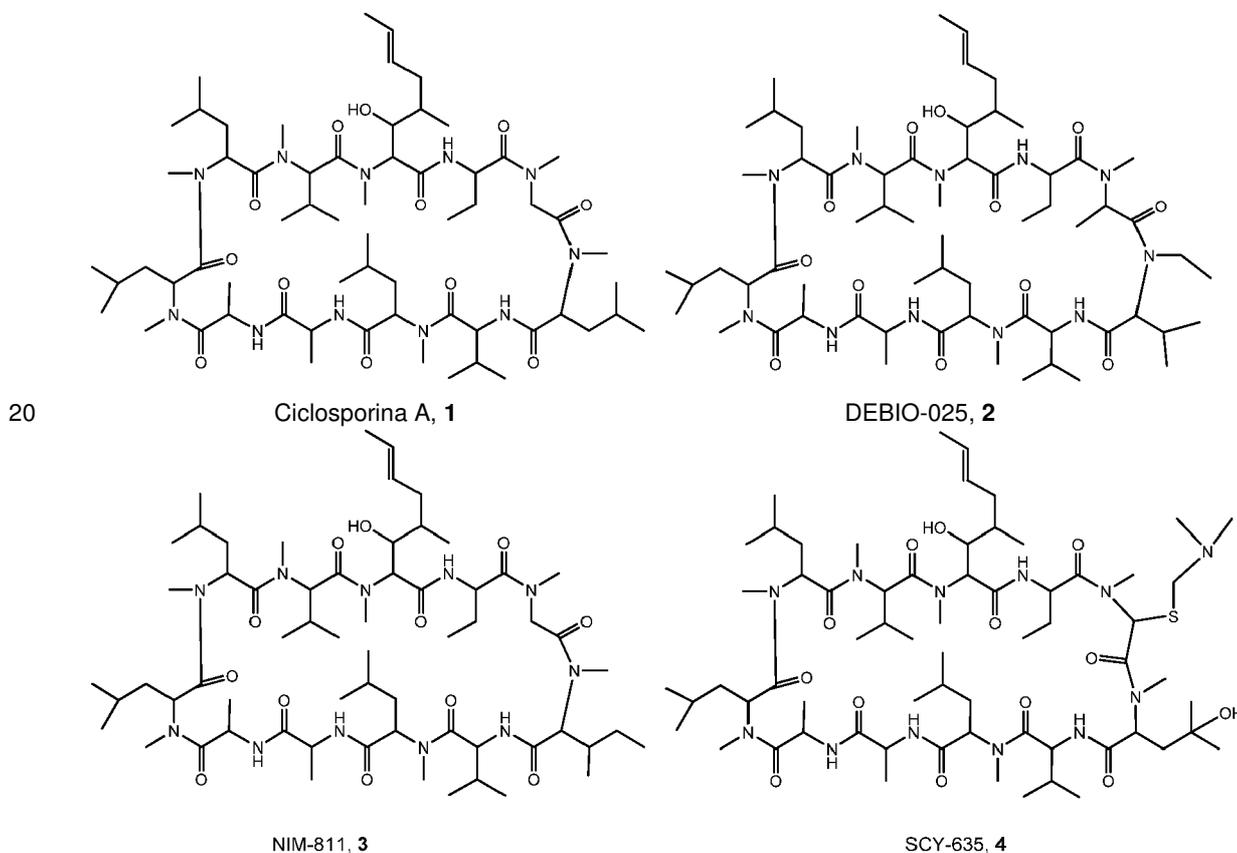
Un número significativo de pacientes con VHC no responde al tratamiento SoC, o no puede tolerar la terapia debido a los efectos secundarios, lo que conduce a problemas frecuentes con la finalización del transcurso completo. La tasa de RVS clínica global de SoC es sólo de aproximadamente el 50% (Melnikova,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

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

Está desarrollándose una terapia antiviral novedosa, específicamente dirigida para la hepatitis C (STAT-C), también conocida como fármacos antivirales de actuación directa (DAA) que se dirigen a proteínas virales tales como ARN polimerasa viral NS5B o proteasa viral NS3 (Jacobson *et al.*, 2007; Parfieniuk *et al.*, 2007). Además, también están desarrollándose compuestos novedosos que se dirigen a proteínas humanas (por ejemplo ciclofilinas) en lugar de dianas virales, que puede esperarse que conduzcan a una reducción en la incidencia de resistencia durante terapia farmacológica (Manns *et al.*, 2007; Pockros, 2008; Pawlotsky J-M, 2005).

Inhibidores de ciclofilina

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



Se conoce que la ciclosporina A (Inoue *et al.* 2003) ("CsA") y sus análogos clínicos no inmunosupresores estrechamente relacionados estructuralmente DEBIO-025 (Paeshuyse *et al.* 2006; Flisiak *et al.* 2008), NIM811 (Mathy *et al.* 2008) y SCY-635 (Hopkins *et al.*, 2009) se unen a ciclofilinas, y como inhibidores de ciclofilina han demostrado eficacia *in vitro* y clínica en el tratamiento de infección por VHC (Crabbe *et al.*, 2009; Flisiak *et al.* 2008; Mathy *et al.* 2008; Inoue *et al.*, 2007; Ishii *et al.*, 2006; Paeshuyse *et al.*, 2006). Aunque estudios de resistencia anteriores sobre CsA mostraron mutaciones en la ARN polimerasa de NS5B de VHC y sugirieron que sólo la ciclofilina B estaría implicada en el proceso de replicación de VHC (Robida *et al.*, 2007), estudios recientes han sugerido un papel esencial para la ciclofilina A en la replicación de VHC (Chatterji *et al.* 2009; Yang *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta que las mutaciones en la proteína viral NS5A también se asocian con resistencia a CsA y que NS5A interactúa tanto con CyPA como CypB para su actividad peptidil-prolil *cis/trans* isomerasa específica (PPlasa), además se sugiere un papel para ambas ciclofilinas en el ciclo vital viral (Hanoulle *et al.*, 2009).

35 El efecto anti-VHC de análogos de ciclosporina es independiente de la propiedad inmunosupresora, que depende de calcineurina. Esto indicó que el requisito esencial para la actividad de VHC es la unión a CyP y la unión a calcineurina no se necesita. DEBIO-025, el inhibidor de ciclofilina más avanzado clínicamente para el tratamiento de VHC, ha mostrado potencia *in vitro* e *in vivo* frente a los cuatro genotipos de VHC más prevalentes (genotipos 1, 2, 3

5 y 4). Estudios de resistencia mostraron que las mutaciones que conferían resistencia a DEBIO-025 fueron diferentes de aquellas notificadas para inhibidores de polimerasa y proteasa, y que no hubo resistencia cruzada con replicones virales resistentes a STAT-C/DAA. De manera más importante, DEBIO-025 también evitó el desarrollo de mutaciones de escape que confieren resistencia a tanto inhibidores de proteasa como de polimerasa (Crabbe *et al.*, 2009).

10 Sin embargo, los inhibidores de ciclofilina basados en CsA en el desarrollo clínico tienen varios problemas, que se piensa que están relacionados con su clase estructural compartida, incluyendo: determinados acontecimientos adversos que pueden conducir a retirada de terapia y han limitado los niveles de dosis clínicas; farmacocinética variable que puede conducir a eficacia variable; y un mayor riesgo de interacciones farmacológicas que pueden conducir a problemas de dosificación.

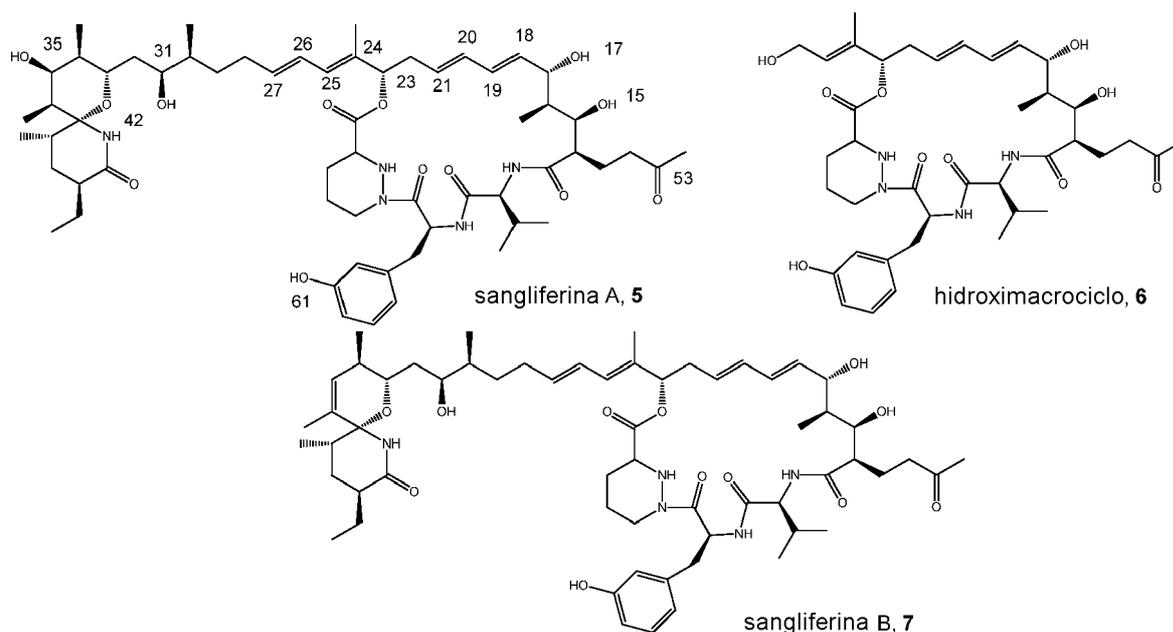
15 Los acontecimientos adversos que se producen más frecuentemente (AE) en pacientes que recibieron DEBIO-025 incluían ictericia, dolor abdominal, vómitos, fatiga y pirexia. Los AE más importantes clínicamente fueron hiperbilirrubinemia y reducción en el recuento plaquetario (trombocitopenia). Peg-IFN puede provocar trombocitopenia profunda y la combinación con DEBIO-025 podría representar un problema clínico significativo. También se han descrito tanto un aumento de la bilirrubina como disminución de plaquetas en estudios clínicos anteriores con NIM-811 (Ke *et al.*, 2009). Aunque la hiperbilirrubinemia observada durante estudios clínicos con DEBIO-025 se invirtió después del cese del tratamiento, fue la causa de la interrupción del tratamiento en 4 de 16
20 pacientes, y una reducción en los niveles de dosis para futuros ensayos. Puesto que el efecto antiviral de los inhibidores de ciclofilina en VHC está relacionado con la dosis, una reducción en la dosis ha conducido a una reducción en el efecto antiviral, y varios ensayos posteriores con inhibidores de ciclofilina basados en CsA no han demostrado, o han demostrado escasas, reducciones en la carga viral de VHC cuando se dosifica como monoterapia (Lawitz *et al.*, 2009; Hopkins *et al.*, 2009; Nelson *et al.*, 2009). Se conoce que DEBIO-025 y ciclosporina A son inhibidores de los transportadores biliares tales como bombas de exportación de sales biliares y otros transportadores hepáticos (especialmente MRP2/cMOAT/ABCC2) (Crabbe *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la interacción con los transportadores biliares, en particular MRP2, puede ser la causa de la hiperbilirrubinemia observada a altos niveles de dosis de DEBIO-025 (Nelson *et al.*, 2009; Wring *et al.*, 2010). Las interacciones farmacológicas relacionadas con la clase de CsA (DDI) por medio de inhibición de otros transportadores de fármacos tales como OAT1B1 y OAT1B3 (Konig *et al.*, 2010) también puede ser un problema, limitando
25 potencialmente determinadas combinaciones y uso en algunos pacientes que se someten a tratamiento para infecciones conjuntas tales como VIH (Seden *et al.*, 2010).

35 Además, DEBIO-025 y ciclosporina A son sustratos para el metabolismo por el citocromo P450 (especialmente CYP3A4), y se conoce que son sustratos e inhibidores de la glicoproteína P humana (MDR1) (Crabbe *et al.*, 2009). La ciclosporina A también ha demostrado ser un inhibidor de CYP3A4 *in vitro* (Niwa *et al.*, 2007). Esto indica que podría haber un riesgo aumentado de interacciones farmacológicas con otros fármacos que son sustratos, inductores o inhibidores de CYP3A4 tales como, por ejemplo, ketoconazol, cimetidina y rifampicina. Además, también se esperan interacciones con fármacos que se someten a transporte mediante glicoproteína P (por ejemplo, digoxina), lo que podría provocar interacciones farmacológicas graves en pacientes con VHC que reciben
40 tratamientos médicos para otras enfermedades concomitantes (Crabbe *et al.* 2009). También se sabe que CsA tiene una farmacocinética muy variable, mostrando formulaciones anteriores biodisponibilidad oral desde el 1-89% (Kapurtzak *et al.*, 2004). Sin monitorización costosa de los niveles sanguíneos del paciente, esto puede conducir a prevalencia aumentada de efectos secundarios debido a niveles plasmáticos aumentados, o respuesta clínica reducida debido a niveles plasmáticos reducidos.

45 Teniendo en cuenta que la inhibición de ciclofilinas representa un nuevo enfoque prometedor para el tratamiento de VHC, existe la necesidad de descubrimiento y desarrollo de inhibidores de CyP más potentes y más seguros para su uso en terapia de combinación frente a infección por VHC.

50 Sangliferinas

La sangliferina A (SfA) y sus congéneres naturales pertenecen a una clase de péptidos/policétidos no ribosómicos mixtos, producidos por *Streptomyces* sp. A92-308110 (también conocido como DSM 9954) (véase el documento WO 97/02285), que se descubrieron originalmente basándose en su alta afinidad a ciclofilina A (CyPA). SfA es el componente más abundante en caldos de fermentación y presenta aproximadamente 20 veces más afinidad por CyPA en comparación con CsA. Esto ha conducido a la sugerencia de que las sangliferinas podrían ser útiles para el tratamiento de VHC (documento WO2006/138507). Las sangliferinas también han demostrado presentar una menor actividad inmunosupresora que CsA cuando se somete a prueba *in vitro* (Sanglier *et al.*, 1999; Fehr *et al.*, 1999). SfA se une con alta afinidad al sitio de unión a CsA de CyPA (Kallen *et al.*, 2005).



Biosíntesis de sangliferinas

5 Las sangliferinas se biosintetizan mediante una policétido sintasa mixta (PKS)/péptido sintetasa no ribosómica (NRPS) (véase el documento WO2010/034243, Qu *et al.*, 2011). La estructura principal de macrólido de 22 miembros consiste en una cadena de carbono de policétido y una cadena tripeptídica. La cadena peptídica consiste en un aminoácido natural, valina, y dos aminoácidos no naturales: (*S*)-meta-tirosina y ácido (*S*)-piperazico, unidos mediante un enlace amida. La hidroxilación de fenilalanina (o bien *in situ* en el NRPS o bien antes de la biosíntesis) para generar (*S*)-meta-tirosina se piensa que se produce por medio del producto génico de *sfaA*. El documento WO2006138507 da a conocer que las sangliferinas A, B, C y D se aíslan de *Streptomyces* sp. A92-308110.

Acción inmunosupresora de sangliferinas

15 El mecanismo inmunosupresor de la acción de Sfa es diferente al de otros fármacos inmunosupresivos de unión a inmunofilina tales como CsA, FK506 y rapamicina. Sfa no inhibe la actividad fosfatasa de calcineurina, la diana de CsA (Zenke *et al.* 2001), en cambio 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 proliferación de células T dependiente de interleucina- (Zhang & Liu, 2001). Sin embargo, la diana molecular y el mecanismo a través del cual Sfa ejerce su efecto inmunosupresor se desconoce hasta ahora.

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

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

Otros usos terapéuticos de inhibidores de ciclofilina

Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

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

Tratamiento de VIH

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

Virus de la hepatitis B

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

Tratamiento de VHB

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

Inhibición del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP)

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

Usos terapéuticos adicionales

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 de la gripe 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 de la vaccinia (Castro *et al.*, 2003).

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

Comentarios generales sobre las sangliferinas

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

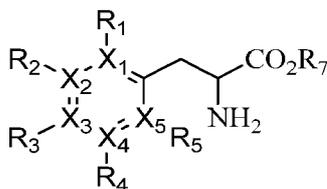
5 Por tanto, sigue existiendo la necesidad de identificar inhibidores de ciclofilina y agentes antiinflamatorios novedosos, que pueden tener utilidad, particularmente en el tratamiento de infección por VHC y estados antiinflamatorios, pero también en el tratamiento de otras áreas de la enfermedad en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

También existe la necesidad de desarrollar agentes inmunosupresores novedosos, que pueden tener utilidad en la profilaxis de rechazo de trasplantes, o en el tratamiento de trastornos autoinmunitarios, inflamatorios y respiratorios. Preferiblemente, tales inmunosupresores tienen propiedades mejoradas con respecto a las sangliferinas naturales conocidas, incluyendo una o más de las siguientes propiedades: mayor semivida o biodisponibilidad oral aumentada, posiblemente a través del metabolismo de P450 reducido y/o glucuronidación reducida, solubilidad en agua potenciada, potencia mejorada en actividad inmunosupresora, tal como puede observarse en ensayos de proliferación de células T, toxicidad reducida (incluyendo hepatotoxicidad), perfil farmacológico mejorado, tal como alta exposición al órgano diana y/o larga semivida (lo que permite dosificación menos frecuente), interacciones farmacológicas reducidas, tales como por medio de niveles reducidos de metabolismo e inhibición de CYP3A4 e inhibición de (Pgp) reducida (lo que permite combinaciones de múltiples fármacos más fáciles) y perfil de efectos secundarios mejorado. La presente invención da a conocer análogos de sangliferina novedosos que pueden tener una o más de las propiedades anteriores. En particular, la presente invención da a conocer análogos de sangliferina novedosos que, en al menos algunas realizaciones, tienen metabolismo por medio de P450 o glucuronidación reducido, por ejemplo tal como se muestra mediante la semivida de microsoma aumentada y pueden tener potencia inmunosupresora aumentada, por ejemplo, tal como se muestra mediante una CI₅₀ baja de proliferación de células T.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un método para la preparación de análogos de sangliferina novedosos, que se han generado mediante mutasíntesis. Estos análogos pueden generarse alimentando análogos de meta-tirosina a un organismo productor de sangliferina, tal como *Streptomyces* sp. A92-308110 (también conocido como DSM 9954), o más preferiblemente, alimentando análogos de meta-tirosina a un derivado modificado por ingeniería genética de un organismo productor de sangliferina, donde *sfaA*, o un homólogo de *sfaA* se inactiva o deleciona.

50 La presente invención se refiere a un procedimiento para producir una sangliferina mutasintética que comprende alimentar una bacteria que produce sangliferina, como *Streptomyces* sp en el que el gen *sfaA* u homólogo del gen *sfaA* se inactiva o deleciona, un compuesto de fórmula (III)



Fórmula (III)

en la que X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se definen como

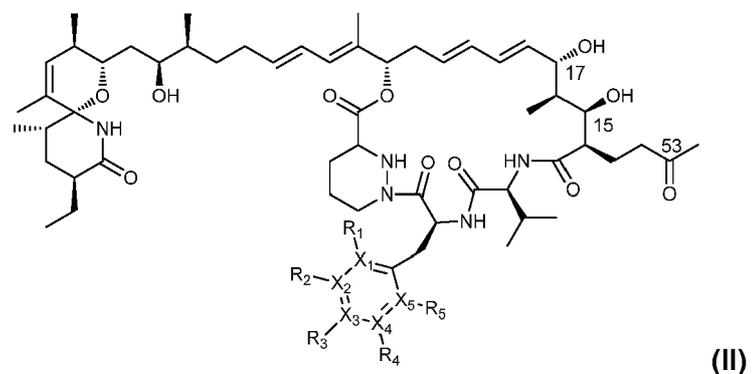
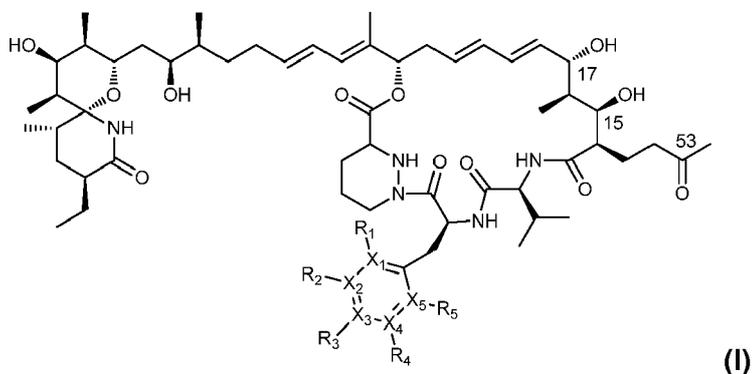
5 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C_{2-6} o alquilo C_{1-10} en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en donde p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más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

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

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

y R_7 representa H o un grupo formador de éster, o una sal del mismo, y

15 cultivar la bacteria para producir un compuesto de sangliferina según la fórmula (I) o la fórmula (II) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



20 en la que:

25 R_1 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C_{2-6} o alquilo C_{1-10} en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y $S(O)_p$ en donde p representa 0, 1 ó 2 y en la que el grupo alquilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más átomos de halógeno;

30 y en la que R_2 se selecciona de H, F, Cl, CF_3 , OH, NH_2 y alquilo C_{1-6} ;

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

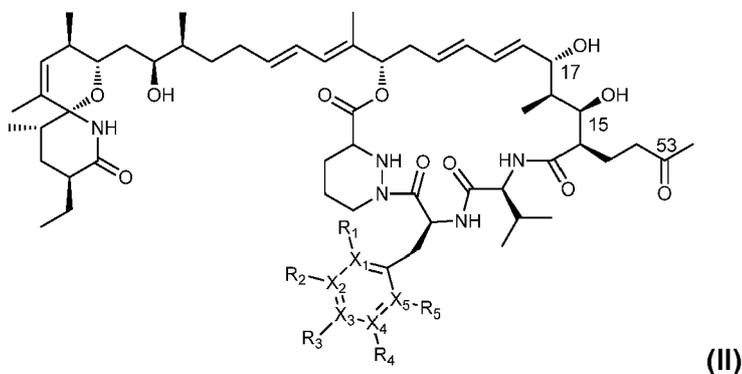
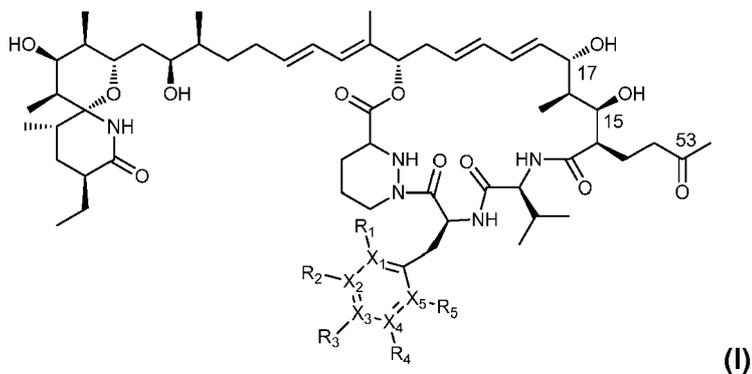
35 con la condición de que cuando R_1 , R_3 , R_4 y R_5 representan todos H y X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 representan todos C, entonces R_2 no puede representar OH.

El procedimiento puede comprender además la etapa de aislar la sangliferina mutasintética.

40 Como resultado, la presente invención proporciona métodos para la preparación de análogos de sangliferina mutasintéticos. En esta descripción se dan a conocer métodos para el uso de estos compuestos en medicina o como productos intermedios en la producción de compuestos adicionales.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona análogos de sangliferina mutasintéticos y derivados de los mismos según la fórmula (I) o la fórmula (II) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos:

5



10 en la que:

15 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C₂₋₆ o alquilo C₁₋₁₀ en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en donde p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por carbonilo y cuyo grupo alquilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más átomos de halógeno;

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

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

25 Las sangliferinas producidas pueden modificarse a cualquier tautómero de las mismas; o un isómero de las mismas en las que el enlace C=C en el C26, posición 27 C=C (como referencia a la estructura de sangliferina A) mostrado como trans es cis; y que incluye un aducto de metanol del mismo en el que se forma un cetel mediante la combinación del cetó C-53 y el grupo hidroxilo C-15 y metanol.

30 La estructura anterior muestra un tautómero representativo y los compuestos preparados mediante la invención pueden modificarse a cualquier tautómero de los compuestos de fórmula (I) por ejemplo compuestos cetó en los que se ilustran compuestos de enol y viceversa.

35 Los tautómeros específicos de fórmula (I) son aquellos en los que (i) el grupo cetó C-53 forma un hemiacetal con el hidroxilo C-15, o (ii) los hidroxilos C-15 y C-17 pueden combinarse con el cetó C-53 para formar un cetel. Todas las numeraciones usan el sistema para la estructura de sangliferina A original.

Definiciones

40 Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o 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 entre sí pero que difieren ligeramente en la composición (como en el reemplazo de un átomo por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular).

Tal como se usa en el presente documento el término “trastornos inflamatorios” se refiere a la lista de trastornos provocados por inflamación, incluyendo, pero sin limitarse a acné vulgar, aterosclerosis, asma, enfermedades autoinmunitarias (tales como encefalomiелitis diseminada agua (ADEM), enfermedad de Addison, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome de anticuerpo antifosfolípido (APS), anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad del oído interno autoinmunitaria, pénfigo vesicular, enfermedad celíaca, enfermedad de Chagas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), enfermedad de Crohn, dermatomiositis, diabetes mellitus tipo 1, endometriosis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, hidrosadenitis supurativa, enfermedad de Kawasaki, nefropatía de IgA, púrpura trombocitopénica idiopática, cistitis intersticial, lupus eritematoso, enfermedad de tejido conectivo mixto, morfea, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, narcolepsia, neuromiotonía, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, psoriasis, artritis psoriática, polimiositis, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide, esquizofrenia, escleroderma, síndrome de Sjögren, síndrome del hombre rígido, arteritis temporal, colitis ulcerativa, vasculitis, vitiligo, granulomatosis de Wegener), enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad inflamatoria pélvica, artritis reumatoide y rechazo de trasplantes.

Tal como se usa en el presente documento el término “sangliferina(s)” se refiere a compuestos químicos que son estructuralmente similares a sangliferina A pero que difieren ligeramente en composición (como en el reemplazo de un átomo por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular los generados por fermentación de *Streptomyces* sp. A92-308110. Los ejemplos incluyen los compuestos similares a sangliferina comentados en los documentos WO97/02285 y WO98/07743, tales como sangliferina B.

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

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 composición (como en el reemplazo de uno o más átomos por otro o en presencia o ausencia de un grupo funcional particular), en particular, aquellos descritos en la fórmula (III).

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 *Flaviviridae*.

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

Tal como se usa en el presente documento, el término “biodisponibilidad” se refiere al grado en el que o la tasa a la que un fármaco u otra sustancia se adsorbe o se vuelve 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 proteína y metabolismo etc. Diversas pruebas para determinar la biodisponibilidad que serían familiares para un experto en la técnica se describen en el presente documento (véase además Egorin *et al.* 2002).

El término “solubilidad en agua” tal como se usa en esta solicitud se refiere a la solubilidad en medios acuosos, por ejemplo solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,4, o en disolución de glucosa al 5%. Las pruebas para la solubilidad en agua se proporcionan a continuación en los ejemplos 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 ácidos o bases inorgánicos u orgánicos farmacéuticamente aceptables así como sales de adición de ácido de amonio cuaternario. Los ejemplos más específicos de sales de ácidos adecuados incluyen clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, nítrico, perclórico, fumárico, acético, succínico, glicólico, fómico, láctico, maleico, tartárico, cítrico, palmoico, malónico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico, hidroxinaftoico, yodhídrico, málico, esteroico, tánico y similares. Las sales de ácido clorhídrico son de particular interés. Otros ácidos tales como oxálico, aunque no son por 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 básicas adecuadas incluyen sales de sodio, litio, potasio, magnesio, aluminio, calcio, zinc, N,N'-dibenciletildiamina, cloroprocaina, 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.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "alquilo" representa un grupo alquilo de cadena lineal o ramificado. Alquilo a modo de ejemplo es alquilo C₁₋₆, por ejemplo, alquilo C₁₋₄.

"Alquenilo" se refiere a un grupo alquilo que contiene dos o más carbonos que está insaturado con uno o más dobles enlaces.

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

El término "tratamiento" incluye profiláctico así como tratamiento terapéutico.

15 Leyenda de las figuras

Figura 1: estructuras de compuesto y sistema de numeración de sangliferina A

Figura 2: ¹H-RMN de compuesto 14

20 Figura 3: ¹H-RMN de compuesto 15

Figura 4: ¹H-RMN de compuesto 16

25 Figura 5: ¹H-RMN de compuesto 17

Figura 6: ¹H-RMN de compuesto 18

30 Figura 7: ¹H-RMN de compuesto 19

Figura 8: ¹H-RMN de compuesto 20

Descripción de la invención

35 La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de análogos de sangliferina mutasintéticos, tal como se estableció anteriormente. Los compuestos pueden usarse en medicina.

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

40 En determinadas realizaciones un átomo de carbono del grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆ alquilo) en el que uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ pueden estar presentes, se reemplaza por un heteroátomo.

45 Si -CH₃ se reemplaza por N, el grupo formado es -NH₂. Si -CH₂- se reemplaza por N, el grupo formado es -NH-. Si -CHR se reemplaza por N el grupo formado es -NR-. Por tanto, los átomos de nitrógeno dentro de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ pueden ser átomos de nitrógeno primarios, secundarios o terciarios.

Si -CH₃ se reemplaza por O, el grupo formado es -OH.

50 Cuando un átomo de carbono del grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆), que pueden representar uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, se reemplaza por un heteroátomo, puede reemplazarse adecuadamente por O, S o N, especialmente N u O particularmente O.

55 Cuando uno cualquiera de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ contiene un grupo S(O)_p, la variable p representa adecuadamente 0 ó 1. En una realización p representa 0. En otra realización p representa 1. En otra realización p representa 2.

60 Cuando un grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆), que pueden representar uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, contiene más de un heteroátomo, estos podrían normalmente estar separados por dos o más átomos de carbono.

De manera adecuada, un átomo de carbono de un grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆) que pueden representar uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, no se reemplaza por un heteroátomo o de otro modo representa OH o NH₂.

65 Cuando un átomo de carbono del grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆) que pueden representar uno o más de R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅, se reemplaza por un carbonilo, el carbonilo se ubica adecuadamente adyacente a otro

átomo de carbono o un átomo de nitrógeno. De manera adecuada, los grupos carbono no se ubican adyacentes a átomos de azufre u oxígeno.

Por ejemplo, uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 pueden representar alquilo-COC₁₋₃, por ejemplo -COMe.

5 De manera adecuada, un átomo de carbono del grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo alquilo C₁₋₆) que pueden representar uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , no se reemplaza por un carbonilo.

10 El grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆) que pueden representar uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 , puede sustituirse por uno o más átomos de halógeno. Por ejemplo, uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 pueden representar -CF₃. Alternativamente uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 pueden representar alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆) sustituido por uno o más (por ejemplo, uno) átomos de Cl o F (por ejemplo -CH₂CH₂Cl).

15 De manera adecuada un grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆) de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 no se sustituye por halógeno.

Cuando uno o más de los grupos R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan un grupo alquilo C₁₋₁₀ (por ejemplo grupo alquilo C₁₋₆) de manera adecuada el/los grupo(s) representa(n) alquilo C₁₋₄ (por ejemplo alquilo C₁₋₂ tal como metilo).

20 En una realización, uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan alquilo C₁₋₆ (tal como alquilo C₁₋₂) o alqueno C₂₋₃ por ejemplo uno o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 representan metilo.

De manera adecuada R_1 representa H, F, Cl, CF₃, OH o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo metilo). De la manera más adecuada, R_1 representa H o F, especialmente H.

25 De manera adecuada R_2 representa H, F, Cl, CF₃, OH, NH₂ o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo metilo). De manera más adecuada, R_2 representa H, F, OH o NH₂, especialmente OH.

30 De manera adecuada R_3 representa H, F, Cl, CF₃, OH o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo metilo). De manera más adecuada, R_3 representa H, Me o F. R_3 también puede representar etilo.

De manera adecuada R_4 representa H, F, Cl, CF₃, OH o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo metilo). De manera más adecuada, R_4 representa H o F.

35 De manera adecuada R_5 representa H, F, Cl, CF₃, OH o alquilo C₁₋₆ (por ejemplo metilo). De manera más adecuada, R_5 representa H o F

De manera adecuada uno o más, de manera más adecuada dos o más (por ejemplo tres o más) de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 no representan H.

40 De manera adecuada uno o más, por ejemplo dos o más de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 o R_5 representan F.

De manera adecuada R_3 o R_4 o R_3 y R_4 representan F. En otra realización R_1 y R_3 representan F.

45 En una realización X_1 representa N (por tanto R_1 está ausente). En otra realización más preferible X_1 representa C.

De manera adecuada X_2 representa C.

De manera adecuada X_3 representa C.

50 De manera adecuada X_4 representa C.

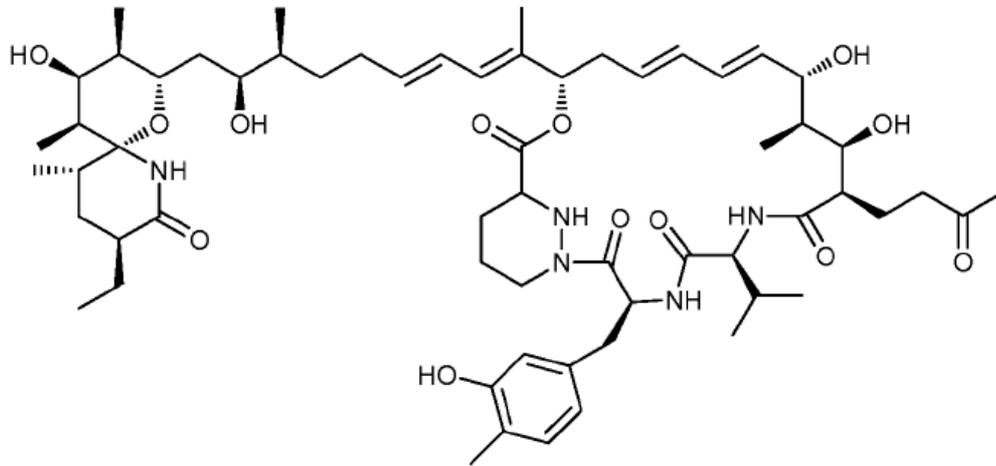
De manera adecuada X_5 representa C.

55 En una realización, el compuesto preparado según la invención es un compuesto de fórmula (I). En otra realización el compuesto es un compuesto de fórmula (II).

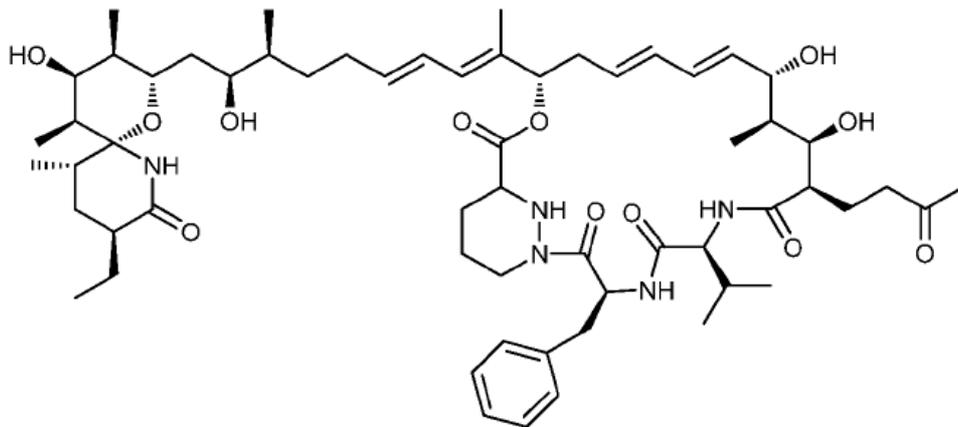
En una realización adecuada de la invención, R_1 representa H, R_2 representa OH, R_3 representa H, R_4 representa F, R_5 representa H y X_1 , X_2 , X_3 , X_4 y X_5 representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

60

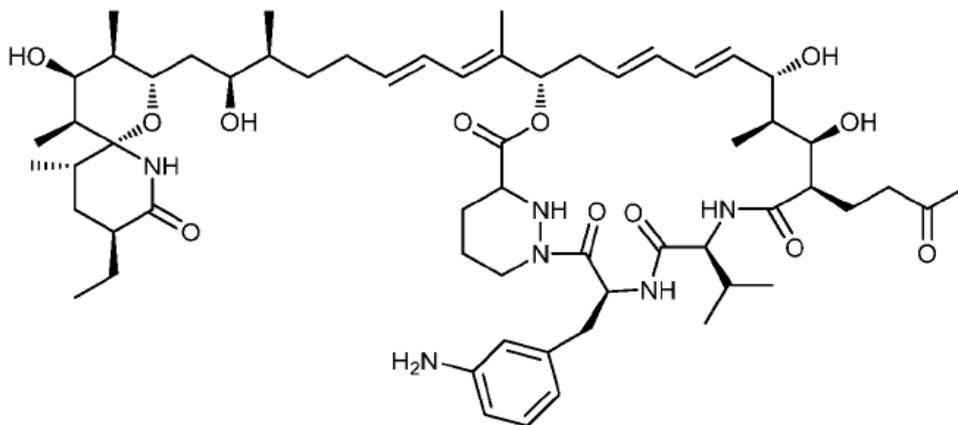
En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa Me, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



5 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

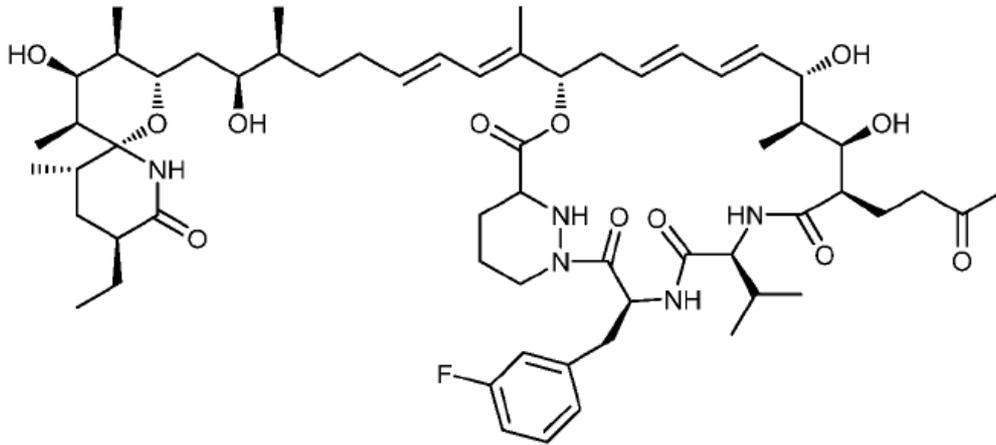


10 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa NH₂, R₃ representa H, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

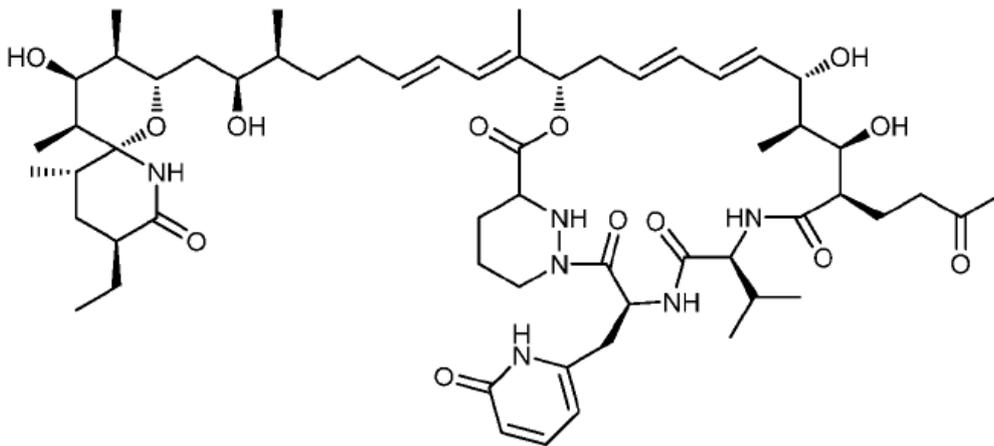


15 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa F, R₃ representa H, R₄ representa H,

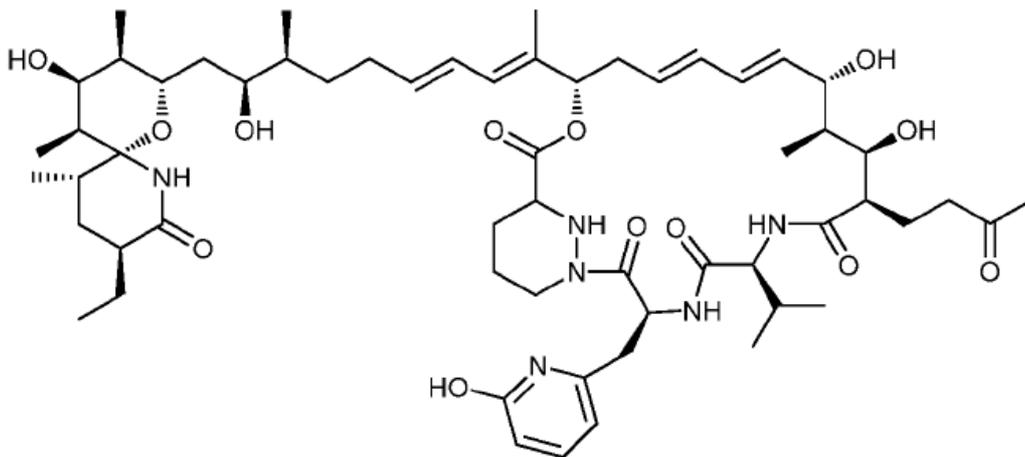
R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



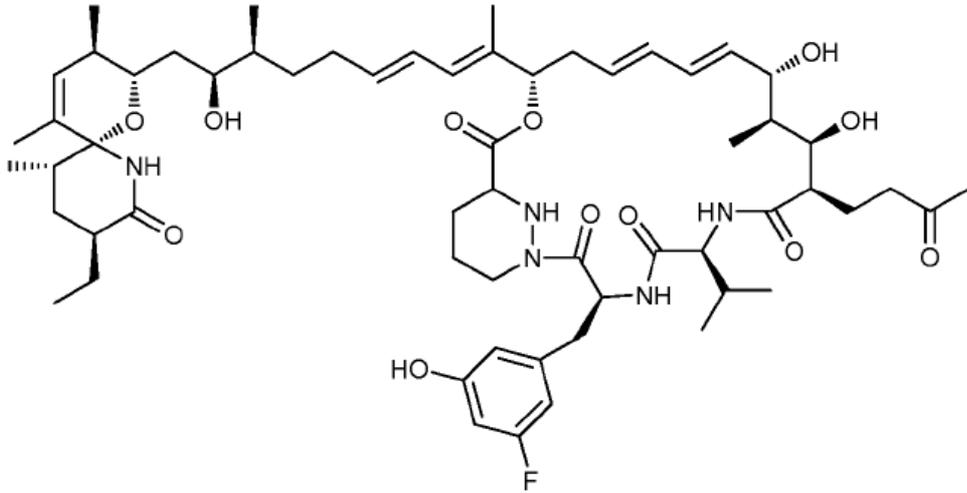
5 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa H, R₄ representa F, R₅ representa H, X₁ representa N y X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



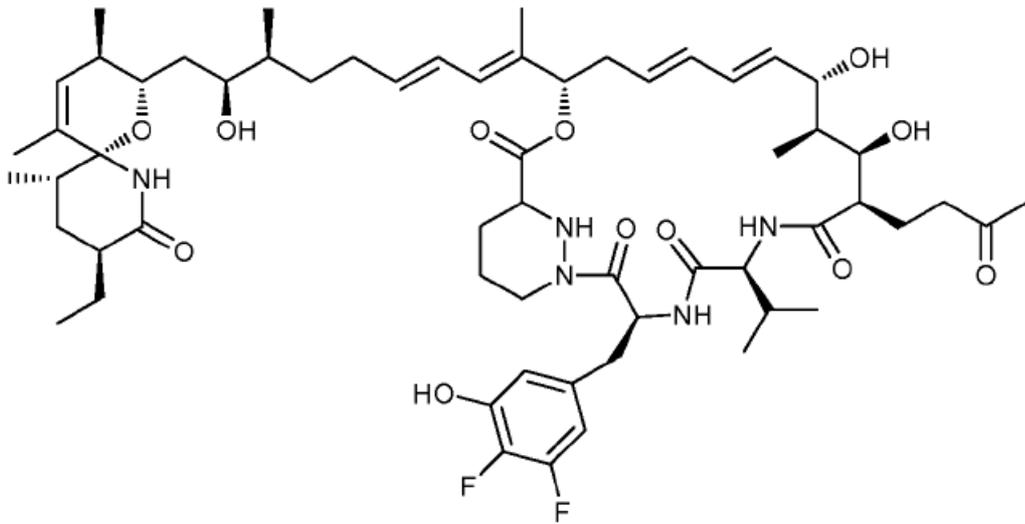
10 que también puede representarse como:



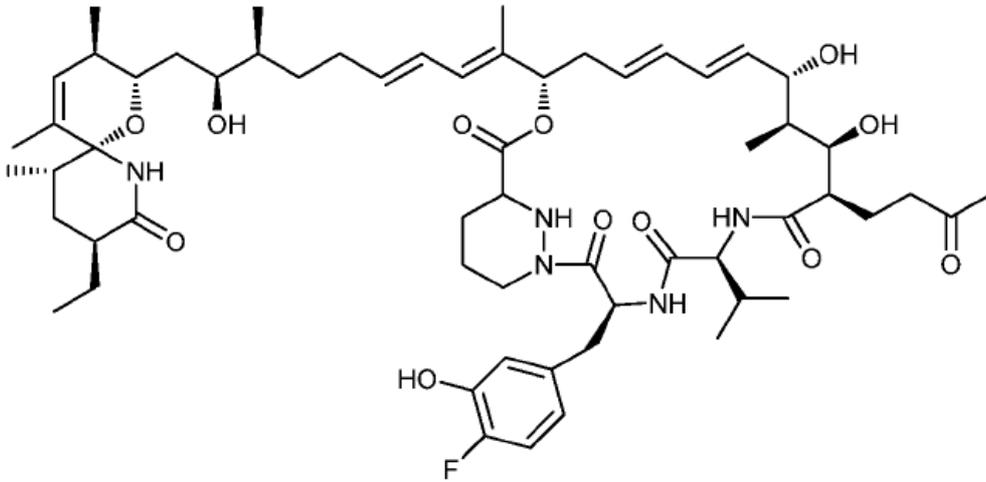
15 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa H, R₄ representa F, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



5 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa F, R₄ representa F, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

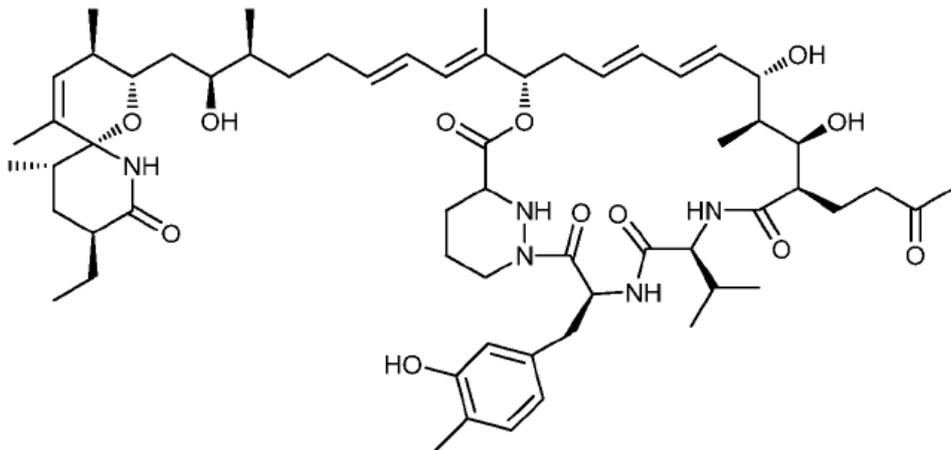


10 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa F, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



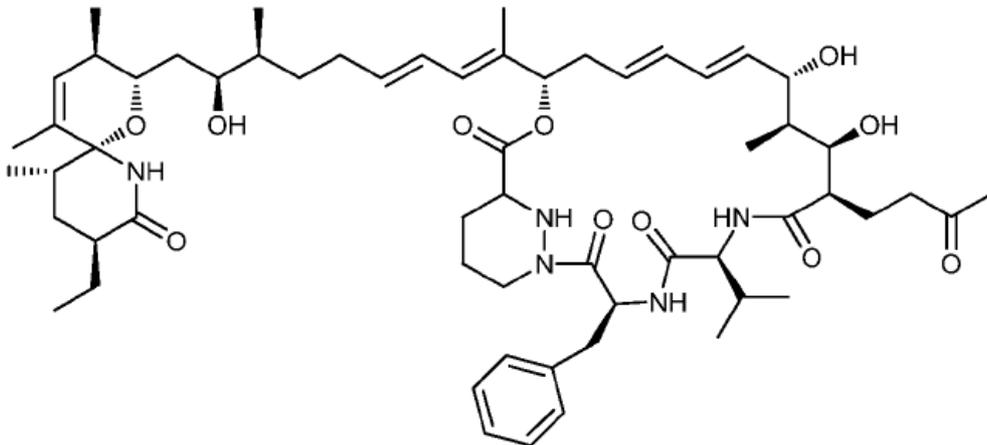
En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa Me, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

5

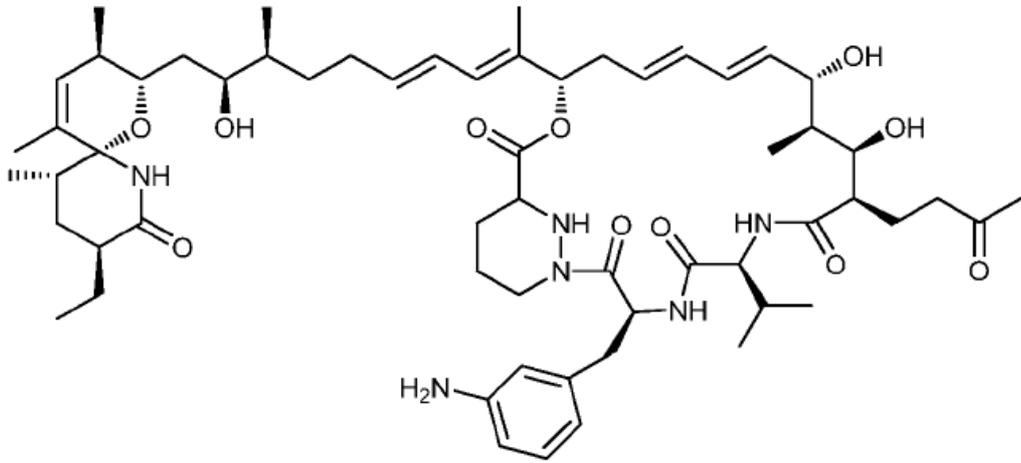


En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa H, R₃ representa H, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

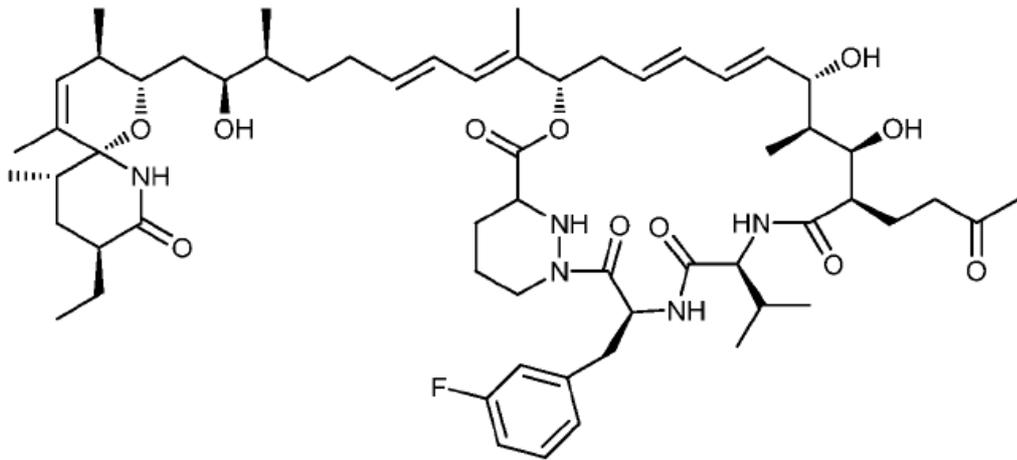
10



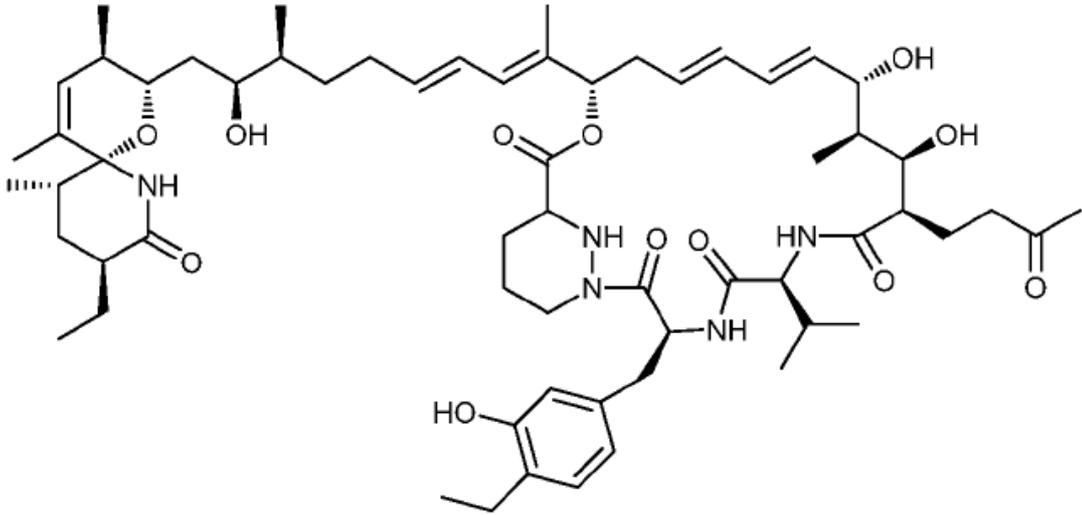
En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa NH₂, R₃ representa H, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



5 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa F, R₃ representa H, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

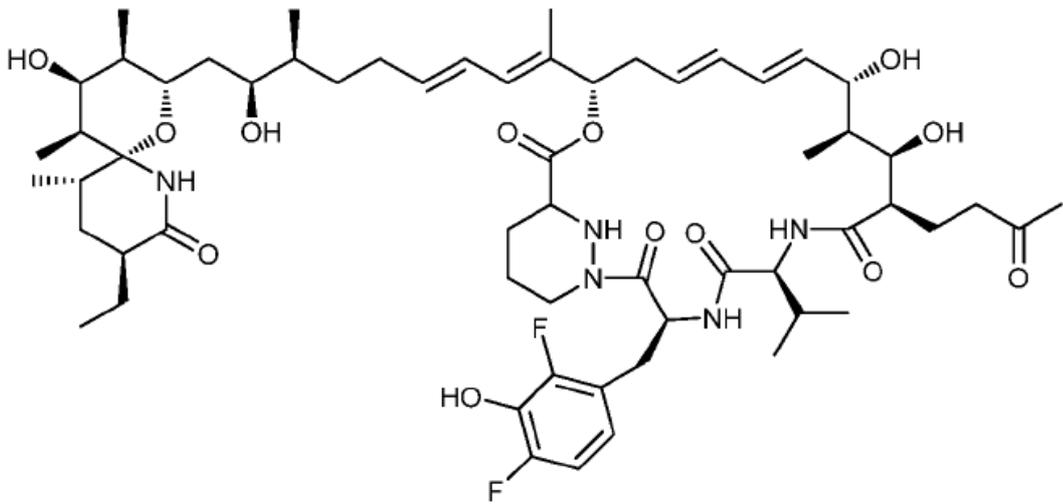


10 En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa Et, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:



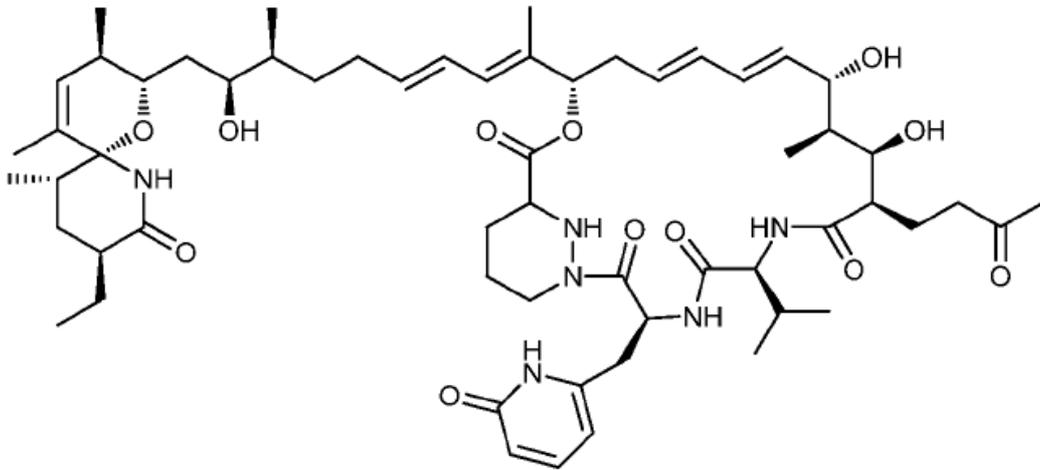
En una realización adecuada de la invención, R₁ representa F, R₂ representa OH, R₃ representa F, R₄ representa H, R₅ representa H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

5

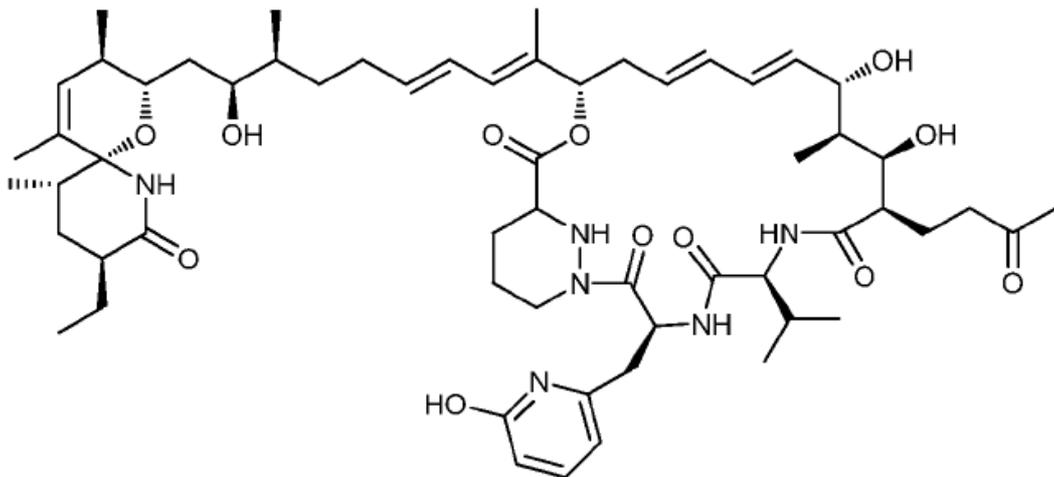


En una realización adecuada de la invención, R₁ representa H, R₂ representa OH, R₃ representa H, R₄ representa F, R₅ representa H, X₁ representa N y X₂, X₃, X₄ y X₅ representan C tal como se representa por la siguiente estructura:

10



que también puede representarse como:



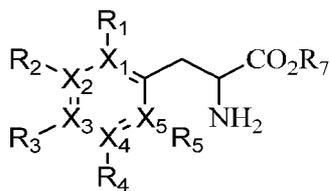
5

El doble enlace en la posición C26,27 (como referencia a la estructura de sangliferina A) puede estar en la forma cis en lugar de la forma trans.

10 En general, los compuestos preparados según la invención se preparan mediante mutasíntesis.

En general, un procedimiento para preparar determinados compuestos de fórmula (I) o (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo comprende:

- 15
- Inocular un caldo de fermentación con un cultivo de un productor de sangliferina (tal como *Streptomyces* sp. A92-308110 (también conocido como DSM 9954) o más preferiblemente, un productor de sangliferina con el gen *sfaA* u homólogo de gen *sfaA* inactivado o deleciónado;
- 20
- Alimentar el caldo de fermentación con un análogo de meta-tirosina (tal como se muestra en la fórmula (III))
 - Permitir que fermentación continúe hasta que se produzcan análogos de sangliferina
 - Extraer y aislar el análogo de sangliferina



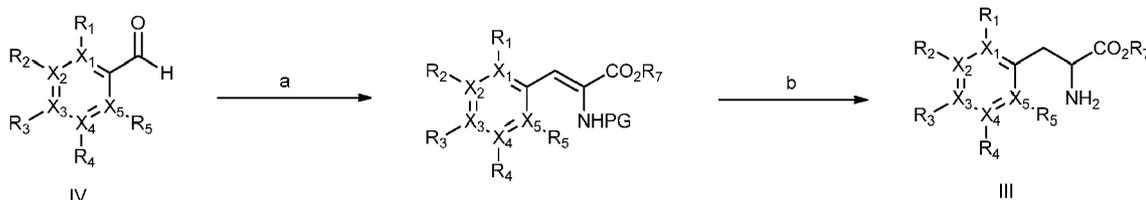
Fórmula (III)

en donde R₇ representa H o un grupo formador de éster tal como un grupo alquilo, por ejemplo, alquilo C₁₋₆ tal como Me.

De manera adecuada, los grupos X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ en la fórmula (III) son tal como se definen para compuestos de fórmula (I) y (II).

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

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



Esquema 1: a) acoplamiento de aldehído de fórmula (IV) con fragmento adecuado, por ejemplo (R₇O)₂P(O)CH(NHPG)CO₂R₇, b) hidrogenación y desprotección según sea necesario. PG = grupo protector.

Los aldehídos de fórmula (IV) pueden estar comercialmente disponibles o sintetizarse fácilmente por un experto en la técnica. Puede necesitarse emplear química de protección y desprotección en la generación de compuestos de fórmula (III) a partir de compuestos de fórmula (IV). Estas técnicas las conoce un experto en la técnica y se describen grupos protectores adecuados en Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (Wuts y Greene, 4^a edición, 2007)

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

Un análogo de sangliferina mutasintética preparado según la invención puede administrarse solo o en combinación con otros agentes terapéuticos. La coadministración de dos (o más) agentes puede permitir menores dosis de cada uno que va a usarse, reduciendo de ese modo los efectos secundarios, puede conducir a potencia mejorada y por tanto mayor RVS, y una reducción en la resistencia.

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

En una realización alternativa, un análogo de sangliferina mutasintética se coadministra con uno o más de otros agentes antivirales, tales como STAT-C/DAA (agente específicamente dirigido para el tratamiento de VHC), que podría ser uno o más de los siguientes: inhibidores de polimerasa no nucleósidos (por ejemplo IDX375, VCH-222, BI 207127, ANA598, VCH-916), inhibidores de polimerasa nucleósidos o nucleótidos (por ejemplo 2'-C-metilcitidina, 2'-C-metiladenosina, R1479, PSI-6130, R7128, R1626), inhibidores de proteasa (por ejemplo BILN-2061, VX-950 (Telaprevir), SCH503034 (Boceprevir), TMC435350, MK-7009, R7227/ITMN-191, EA-058, EA-063) o inhibidores de entrada viral (por ejemplo PRO 206).

Las formulaciones pueden presentarse de manera conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de poner en asociación el principio activo (compuesto de la invención) con el portador que constituye uno o más componentes de accesorio. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con portadores líquidos o portadores finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformar el producto.

Los compuestos preparados según la invención 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 orgánico o inorgánico no tóxica, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Según el trastorno y paciente a tratar, así como la vía de administración, las composiciones pueden administrarse a dosis variables.

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

Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa sódica y determinados silicatos complejos, y aglutinantes de granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia. Además, pueden incluirse agentes de lubricación 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 saborizantes, materia colorante o tintes, con agentes emulsionantes y/o de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.

Un comprimido puede elaborarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes de accesorio. Pueden prepararse comprimidos que se han comprimido mediante compresión en una máquina adecuada del principio activo en una forma que fluye libremente tal como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante (por ejemplo povidona, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo glicolato de almidón de sodio, povidona reticulada, carboximetilcelulosa de sodio reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Pueden elaborarse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo hidratado con un diluyente líquido inerte. Los comprimidos pueden recubrirse o puntuarse opcionalmente 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 el perfil de liberación deseado.

Las formulaciones de compuestos preparados según la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse como unidades discretas tales como cápsulas, obleas o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo; como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El principio activo también puede presentarse como un bolo, electuario o pasta.

Debe entenderse que además de los componentes mencionados particularmente antes, las formulaciones de esta invención pueden incluir agentes convencionales en la técnica que tiene que ver con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo aquellos adecuados para administración oral pueden incluir agentes saborizantes.

Ventajosamente, agentes tales como conservantes y agentes de tamponamiento pueden disolverse en el vehículo. Para potenciar la estabilidad, la composición puede congelarse después de introducirla en el vial y retirarse el agua a vacío. El polvo liofilizado seco se sella entonces en el vial y puede proporcionarse un vial acompañante de agua para inyección para reconstituir el líquido antes de su uso. La dosificación que va a administrarse de un compuesto de la invención variará según el compuesto particular, la enfermedad implicada, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, y la vía seleccionada de administración. La dosificación apropiada puede determinarse fácilmente por un experto en la técnica.

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

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

Aspectos adicionales de la divulgación incluyen:

- Un compuesto preparado según la invención para su uso como producto farmacéutico;

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

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

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

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

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

25 - Un procedimiento para producir una sangliferina mutasintética (tal como un compuesto de fórmula (I) o (II)) que comprende alimentar una bacteria que produce sangliferina, tal como una *Streptomyces* sp (por ejemplo, A92-308110), un compuesto de fórmula (III) o una sal del mismo, y cultivar la bacteria de modo que se produce una sangliferina mutasintética.

30 - Un procedimiento según el párrafo anterior en el que la bacteria que produce sangliferina es una *Streptomyces* sp en el que el gen *sfaA* u homólogo de gen *sfaA* se inactiva o deleciona.

- Un procedimiento según los dos párrafos anteriores que comprende además la etapa de aislar la sangliferina mutasintética.

35 Los compuestos nuevos de fórmula (III) (tales como los indicados en la tabla 1 y los ácidos y ésteres de cualquiera de los compuestos de fórmula (III) indicados en la tabla 1) y (IV) incluyendo sus sales y ésteres preparados según la invención, también forman un aspecto de la divulgación.

Métodos generales

40 Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

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

50 Se obtuvo pKC1139, un plásmido lanzadera de *Streptomyces-E. coli*, del John Innes Centre, R.U., y se describe en Bierman *et al.*, 1992 y Kieser *et al.*, 2000.

55 BIOT-4585 se hizo crecer sobre agar 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 agua destilada y se almacenaron en alícuotas de 0,5 ml a -80°C. Se usó reserva de esporas congeladas para inocular medios de siembra SGS o SM25-3. El medio de siembra inoculado se incubó con agitación entre 200 y 300 rpm a una excentricidad de 5,0 o 2,5 cm a 27°C durante 24 horas. El medio de fermentación SGP-2 o BT6 se inoculó con el 2,5%-10% del cultivo de siembra y se incubó con agitación entre 200 y 300 rpm con una excentricidad de 5 ó 2,5 cm a 24°C durante 4-5 días. Entonces se recogió el cultivo para extracción.

60 *Análogos de meta-tirosina*

Se adquirieron (2S)-2-amino-3-(6-hidroxilo(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 y éster metílico de L-4,5-difluoro-*meta*-tirosina de Netchem (EE.UU.).

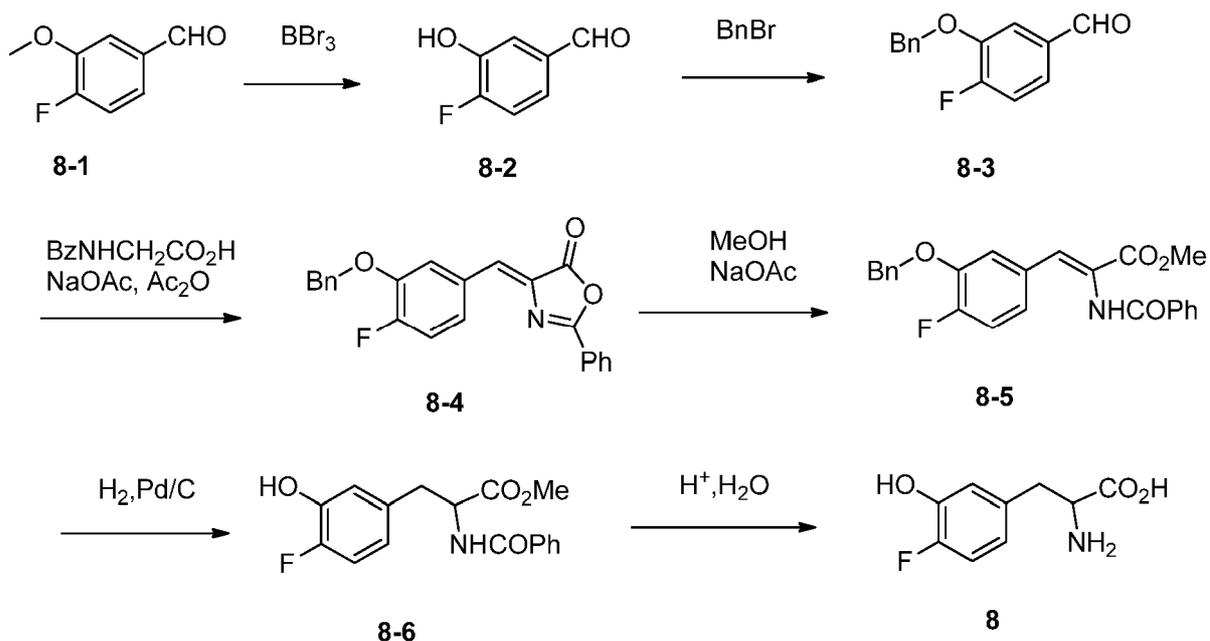
65 Se adquirieron DL-3-fluorofenilalanina y L-fenilalanina de Sigma (R.U.).

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

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

- 5 Se sintetizaron DL-4-fluorometa-tirosina (8), DL-5-fluorometa-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) tal como sigue:

10 DL-4-fluorometa-tirosina (8)



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

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

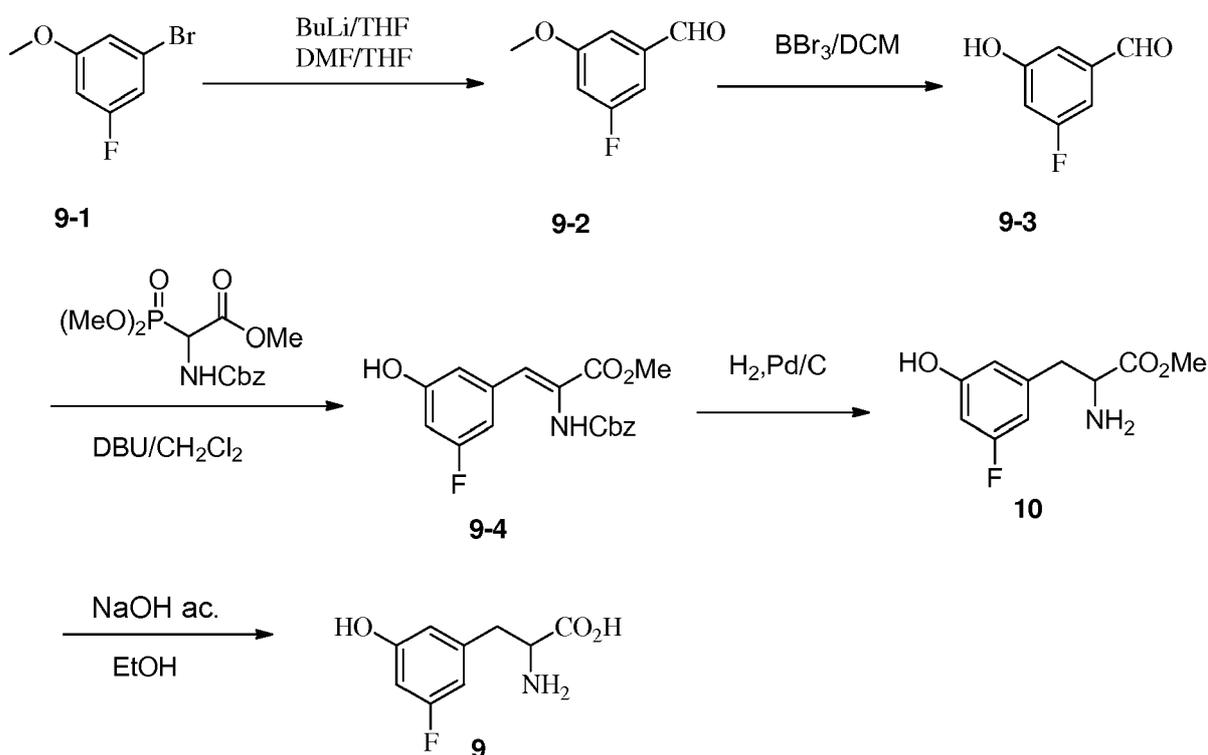
- 25 Se agitó una mezcla de 8-3 (1 g, 4,34 mmol), ácido hipúrico (860 mg, 4,80 mmol), NaOAc (400 mg) y AC_2O (2,2 ml) a 80°C durante 2 h. Se enfrió la mezcla de reacción amarilla y se añadió EtOH frío (10 ml), se enfrió la mezcla en un baño de hielo durante 15 min y entonces se vertió en 30 ml de agua helada, se enfrió y se recogió el producto mediante filtración. Se secó el sólido a vacío para dar 8-4.

- 30 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 retiró 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.

- 35 Se hidrogenó una disolución de 8-5 (360 mg, 0,89 mmol) en MeOH (50 ml) sobre Pd/C al 10% (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.

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

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



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

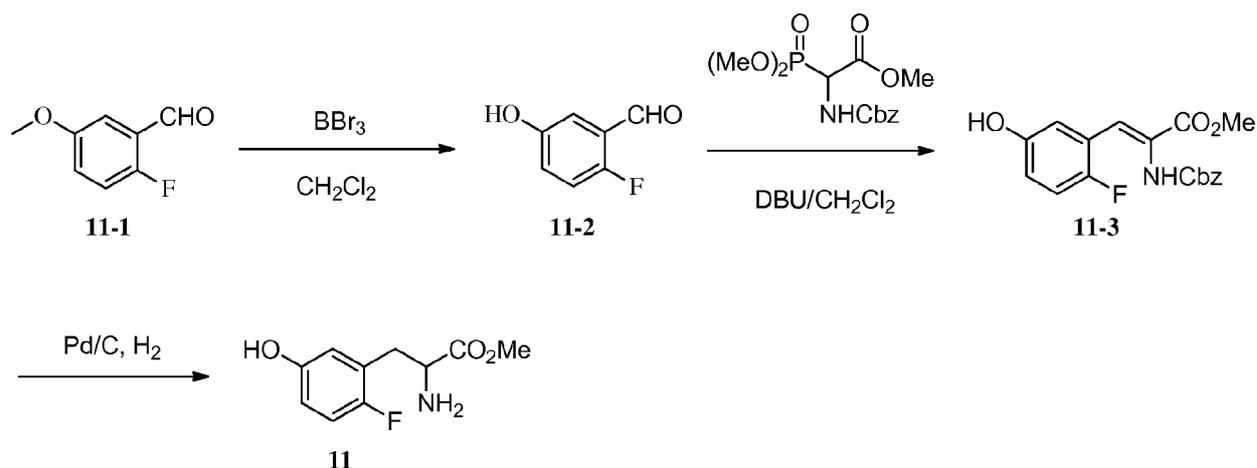
10 A una disolución de 9-2 (6 g, 38,9 mmol) en DCM seco (200 ml) se le añadió gota a gota BBr_3 (4 M en DCM, 30 ml, 116,8 mmol) a -70°C . Tras la adición, se agitó la mezcla de reacción a -20°C durante 3 horas, se añadió cuidadosamente agua helada, y se extrajo con DCM. Se lavaron las fases orgánicas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

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

Se hidrogenó una disolución de 9-4 (1 g) en MeOH (20 ml) sobre 200 mg de Pd/C al 10% 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 retiró el disolvente y se neutralizó el residuo a $\text{pH}=6$ con HCl 2 N y se recogieron los cristales blancos que se formaron mediante filtración para dar el compuesto objetivo 9.

30 *2-Amino-3-(2-fluoro-5-hidroxi-fenil)propanoato de metilo (11)*

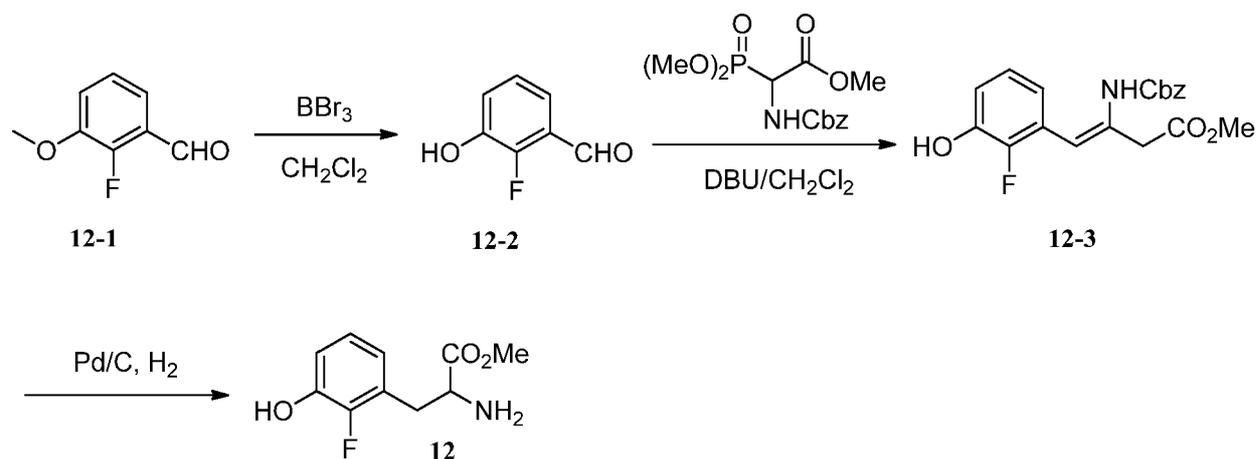


5 A una disolución del compuesto 11-1 (1,4 g, 9 mmol) en 50 ml de DCM se añadió gota a gota BBr_3 (4M en DCM, 3,6 ml, 13,5 mmol) a -78°C . Tras la adición, se agitó la reacción a -20°C durante 4 horas. Entonces se realizó adición lenta de hielo/agua, se separaron las fases, se lavaron las fases orgánicas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

10 A una disolución de 2-(benciloxicarbonilamino)-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 última etapa), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se diluyó la disolución con DCM (50 ml), se lavó con HCl 1 N (20 ml), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo=5/1) para dar 11-3.

15 Se hidrogenó una mezcla del compuesto 11-3 (500 mg, 1,5 mmol) en MeOH (20 ml) sobre 50 mg de Pd/C al 10% 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 CombiFlash inversa para obtener 11 como un sólido blanco.

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



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

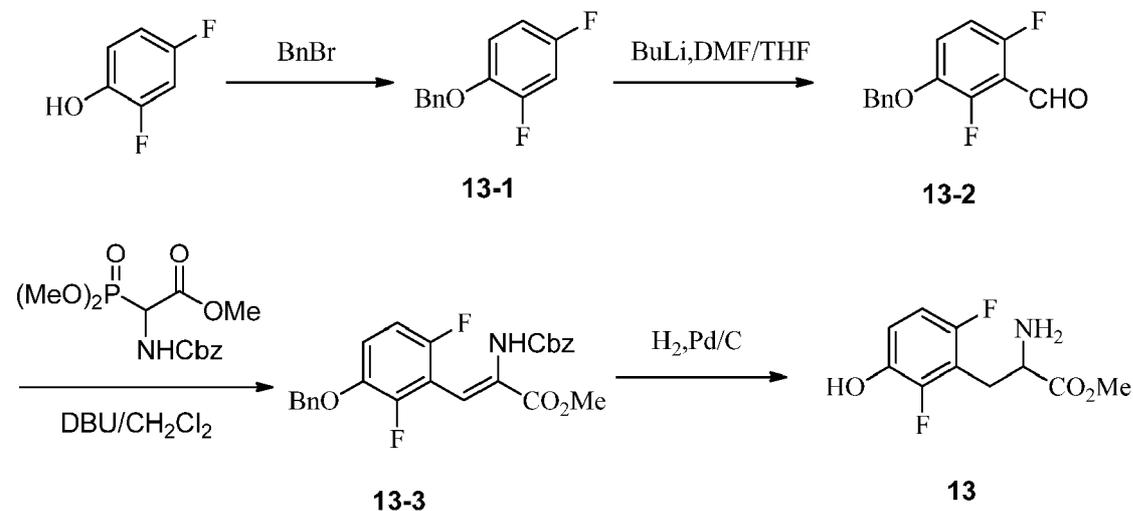
25 A una disolución de 2-(benciloxicarbonilamino)-2-(dimetoxifosforil)acetato de metilo (3 g, 9 mmol) en 100 ml de DCM se le añadió DBU (2,7 ml, 18 mmol) a temperatura ambiente, tras 10 min, se añadió el compuesto 12-2 (compuesto bruto de la última etapa), se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas.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

30 Se hidrogenó una mezcla del compuesto 12-3 (500 mg, 1,44 mmol) en MeOH (10 ml) sobre 100 mg de Pd/C al 10% 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 CombiFlash inversa para obtener el compuesto deseado 12

35

como un sólido blanco.

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



5

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

10

A una disolución del compuesto 13-1 (2 g, 9 mmol) en 10 ml de 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 durante 30 min de nuevo. Entonces se retiró el baño frío y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 hora antes de extinguirse con agua. Se extrajo con acetato de etilo (20 ml x3), se secó sobre Na_2SO_4 y se evaporó hasta sequedad. Se purificó el residuo mediante cromatografía en gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo =10/1) para dar 13-2 como un sólido amarillo.

15

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

20

25

Se hidrogenó el compuesto 13-3 (600 mg, 1,32 mmol) en MeOH (20 ml) sobre 60 mg de Pd/C al 10% 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 CombiFlash inversa para obtener el compuesto deseado 13 como un sólido blanco.

30

Recetas de los medios

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

35

Medio de siembra SGS

| Componente (y proveedor) | Receta | |
|---|--------|---|
| Glucosa (Sigma, G7021) | 7,50 | g |
| Glicerol (Fisher scientific, G/0650/25) | 7,50 | g |
| extracto de levadura (Becton Dickinson, 212770) | 1,35 | g |
| extracto de malta (Becton Dickinson, 218630) | 3,75 | g |
| almidón de patata (soluble) (Sigma, S2004) | 7,50 | g |
| NZ-amina A (Sigma, C0626) | 2,50 | g |
| harina de soja tostada, Nutrisoy (ADM, 063-160) | 2,50 | g |
| L-asparagina (Sigma, A0884) | 1,00 | g |
| $CaCO_3$ (Calcitec, V/40S) | 0,05 | g |

ES 2 703 433 T3

| | | |
|---|--------|----|
| NaCl (Fisher scientific, S/3160/65) | 0,05 | g |
| KH ₂ PO ₄ (Sigma, P3786) | 0,25 | g |
| K ₂ HPO ₄ (Sigma, P5379) | 0,50 | g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, M7774) | 0,10 | g |
| disolución B de elemento traza | 1,00 | ml |
| agar | 1,00 | g |
| Antiespuma SAG471 (GE Silicones, SAG471) | *0,20 | ml |
| RO H ₂ O <i>hasta vol. final de</i> | **1,00 | l |

se ajustó el pH de preesterilización a pH 7,0 con NaOH 10 M /H₂SO₄ 10 M
se esterilizó calentando a 121°C, 20-30 min (autoclave)

Notas

**antiespuma usada únicamente en fermentadores de siembra, NO matraces de siembra*

***volumen final ajustado para explicar por consiguiente el volumen de siembra*

5

Disolución B de elemento traza

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

Medio de producción SGP2

10

| Componente | Receta | |
|--|--------|----|
| 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 |
| Antiespuma SAG471 (GE Silicones, SAG471) | *0,20 | ml |
| RO H ₂ O <i>hasta vol. final de</i> | **1,00 | l |

pH de preesterilización ajustado a pH 6,8 con NaOH 10 M
esterilizado mediante calentamiento a 121°C, 20-30 min (autoclave)

Notas

**volumen final ajustado para explicar por consiguiente el volumen de siembra*

***se usó antiespuma sólo en fermentadores no matraces*

15

Medio SM25-3

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

pH de preesterilización no ajustado (es decir pH 7,0)

Medio ISP4

20

| | |
|---|------|
| Componente | |
| Almidón soluble (Difco) | 10 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 1 g |
| NaCl | 1 g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2 g |
| CaCO ₃ | 2 g |
| Disolución de sales traza de ISP | 1 ml |
| Agar | 20 g |

ES 2 703 433 T3

hasta vol. final de 1 l

Elaborar una pasta con el almidón en un volumen pequeño de agua fría y llevar a un volumen de 500 ml

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

Sales traza de ISP

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

- 10 Almacenar a 4°C

Método de fermentación general

- 15 Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos de siembra) transfiriendo 4,0 ml de reserva de esporas en 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 (excentricidad de 5,0 cm). Del cultivo de siembra, se transfirieron 25 ml a 250 ml de medio de producción SGP2+5%HP20 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Tras 24 h de cultivo a 24°C y 250 rpm (excentricidad 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-piperazico a cada matraz de producción para dar una concentración final 1 mM de los enantiómeros individuales de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm).

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

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

- 30 Condiciones de HPLC:

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

- 35 Equipada con un cartucho de seguridad C18 analítico de Phenomenex (KJ0-4282)

Temp. de columna a 50°C

Velocidad de flujo 1 ml/min

- 40 Monitorizar UV a 240 nm

Inyectar alícuota de 20 ul

- 45 Gradiente de disolvente:

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

10,05 min: el 55% de B

- 55 13,0 min: el 55% de B

El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%

- 60 El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%

ES 2 703 433 T3

En estas condiciones SfA eluye a 5,5 min

En estas condiciones SfB eluye a 6,5 min

5 Se realiza CL-EM en un sistema de HPLC integrado Agilent HP1100 en combinación con un espectrómetro de masas por electrospray Bruker Daltonics Esquire 3000+ que opera en modo iónico positivo usando la cromatografía y disolventes descritos anteriormente.

10 Método de QC CL-EM

Condiciones de HPLC:

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

15 Equipada con un cartucho de seguridad C18 analítico de Phenomenex (KJ0-4282)

Temp. de columna a 50°C

20 Velocidad de flujo 1 ml/min

Monitorizar UV a 210, 240 y 254 nm

Gradiente de disolvente:

25 0 min: el 10% de B

2,0 min: el 10% de B

30 15 min: el 100% de B

17 min: el 100% de B

35 17,05 min: el 10% de B

20 min: el 10% de B

El disolvente A es agua + ácido fórmico al 0,1%

40 El disolvente B es acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%

Condiciones de EM:

45 EM opera en modo de conmutación (conmutando entre positivo y negativo), barrido desde 150 hasta 1500 uma.

Análisis *in vitro*, método de CL-EM (por ejemplo para evaluación de estabilidad de microsoma)

Usando un instrumento API-2000, API-4000 o UPLC

50 Condiciones de HPLC:

Para 15: ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 mm)

55 Para cpds 5, 14, 16, 17, 18, 19 Ultimate XB-C18 (2,1 x 50 mm, 5 µm)

Temp. de columna a 50°C

Velocidad de flujo 0,6 ml/min

60 Gradiente de disolvente A1 (por ejemplo para cpd 15):

0,2 min: el 20% de B

0,6 min: el 95% de B

65 1,1 min: el 95% de B

1,15 min: el 20% de B

1,5 min: detener

5

El disolvente A es H₂O-FA al 0,025%- NH₄OAC 1 mM

El disolvente B es ACN-FA al 0,025%- NH₄OAC 1 mM

10 Gradiente de disolvente A2 (por ejemplo para cpds 5, 14, 16, 17, 18, 19):

0,3 min: el 10% de B

0,8 min: el 95% de B

15

2,3 min: el 95% de B

2,31 min: el 10% de B

20

3,5 min: detener

El disolvente A es H₂O-FA al 0,1%

El disolvente B es MeOH-FA al 0,1%

25

modo de barrido negativo:

configuración MRM:

| | transiciones [Da] |
|----|-------------------|
| 21 | 1089,7 → 504,2 |

30

modo de barrido positivo:

configuración MRM:

| | transiciones [Da] |
|----|-------------------|
| 5 | 1090,6 → 1054,6 |
| 14 | 1108,9 → 1072,5 |
| 15 | 1126,7 → 1090,0 |
| 16 | 1108,8 → 1072,3 |
| 17 | 1104,5 → 1068,5 |
| 18 | 1074,6 → 1038,8 |

35

Ensayo de replicón *in vitro* para la evaluación de la actividad antiviral de VHC

La eficacia antiviral frente al VHC, genotipo 1 puede someterse a prueba tal como sigue: un día antes de la adición del artículo de prueba, se recogieron células Huh5.2, que contenían el genotipo 1b de VHC I389luc-ubi-neo/NS3-3'/5,1 replicón (Vrolijk *et al.*, 2003) y se subcultivaron en medio de crecimiento celular [DMEM (n.º de cat. 41965039) complementadas con FCS al 10%, el 1% de aminoácidos no esenciales (11140035), el 1% de penicilina/estreptomina (15140148) y el 2% de Geneticin (10131027); Invitrogen] a una razón de 1,3-1,4 y hechas crecer durante 3-4 días en matraces de cultivo tisular de 75 ml (Techno Plastic Products), y se sembraron en medio de ensayo (DMEM, FCS al 10%, el 1% de aminoácidos no esenciales, el 1% de penicilina/estreptomina) a una densidad de 6500 células/pocillo (100 ul/pocillo) en placas de microtitulación de cultivo tisular de 96 pocillos (Falcon, Beckton Dickinson para evaluación del efecto antimetabólico y CulturPlate, Perkin Elmer para evaluación del efecto antiviral). Las placas de microtitulación se incuban durante la noche (37°C, el 5% de CO₂, el 95-99% de humedad relativa), produciendo una monocapa celular no confluyente.

50

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

55

Para la evaluación de los efectos antimetabólicos, el medio de ensayo se aspira, se reemplaza con 75 ul de una disolución de MTS al 5% (Promega) en medio libre de fenol rojo y se incuba durante 1,5 horas (37°C, el 5% de CO₂, el 95-99% de humedad relativa). Se mide la absorbancia a una longitud de onda de 498 nm (Safire², Tecan) y se convierten las densidades ópticas (valores de DO) en porcentaje de controles sin tratar.

Para la evaluación de efectos antivirales, se aspira el medio de ensayo y se lavan las monocapas celulares con PBS. El tampón de lavado se aspira, se añaden 25 ul de tampón Glo Lysis (n.º de cat. E2661, Promega) después de lo cual se permite que proceda la lisis durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añaden 50 ul de sistema de ensayo de luciferasa (n.º de cat. E1501, Promega) y se cuantifica la señal de luminiscencia de luciferasa inmediatamente (1000 ms de tiempo de integración/pocillo, Safire², Tecan). Las unidades de luminiscencia relativa se convierten en porcentaje de controles no tratados.

La CE₅₀ y CE₉₀ (valores derivados de la curva de respuesta a la dosis) representan las concentraciones a las que se observaría, respectivamente, el 50% y el 90% de inhibición de replicación viral. La CC₅₀ (valor derivado de la curva de respuesta a la dosis) representa la concentración a la que la actividad metabólica de las células se reduciría hasta el 50 % de la actividad metabólica de células no tratadas. El índice de selectividad (IS), indicativo de la ventana terapéutica del compuesto, se calcula como CC₅₀/EC₅₀.

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

Para los resultados, véase el ejemplo 12.

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

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

Las células de replicón se tripsinizan y se siembran a 5×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos con los medios anteriores sin G418. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplaza con compuestos que contienen DMEM diluidos en serie en presencia de FBS al 5%. El ensayo antiviral de replicón de VHC examina los efectos de compuestos en una serie de diluciones del compuesto. Brevemente, las células que contienen el replicón de VHC se siembran en placas de 96 pocillos. Se diluye en serie el artículo de prueba con DMEM más FBS al 5%. El compuesto diluido se aplica a pocillos apropiados en la placa. Tras 72 h de incubación a 37°C, las células se procesan. El ARN intracelular de cada pocillo se extrae con un kit RNeasy 96 (Qiagen). El nivel de ARN de VHC se determina mediante un ensayo de PCR en tiempo real de transcriptasa inversa usando reactivos de mezcla maestra TaqMan® One-Step RT-PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA) y un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) tal como se describió previamente (Vrolijk *et al.*, 2003). Los efectos citotóxicos se miden con reactivos de control de ARN ribosómico TaqMan® (Applied Biosystems) como indicación de números celulares. La cantidad del ARN de VHC y el ARN ribosómico se usa entonces para derivar valores de CI₅₀ aplicables (concentración que inhibe en replicación replicón en un 50%).

Evaluación de metabolismo de microsoma (ensayo de estabilidad de microsoma)

La velocidad del metabolismo en los microsomas puede someterse a prueba tal como sigue:

Se diluyen microsomas de hígado de ratón o humano con tampón C (tampón fosfato de potasio 0,1 M, EDTA 1,0 mM, pH 7,4) hasta una concentración de 2,5 mg/ml. Entonces se prepararon muestras de estabilidad microsomal añadiendo 50 ul de disolución con adiciones conocidas de compuesto 5 uM (0,5 ul de disolución madre de DMSO 10 mM en 9,5 ul de ACN, añadido a 990 ul de tampón C) a 50 ml de disolución microsomal (2,5 mg/ml), 110 ul de tampón C y se mezcló bien. Todas las muestras se preincubaron durante aproximadamente 15 minutos a 37°C. Tras esto, se inició la reacción añadiendo 40 ul de la disolución de NADPH (12,5 mM) con mezclado cuidadoso. Se retiraron alícuotas (40 ul) a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos y se extinguieron con patrón interno que contenía ACN (120 ul). Se retiró la proteína mediante centrifugación (4000 rpm, 15 min) y se analizó la placa de muestra para determinar la concentración del compuesto por CL-EM/EM. Entonces se calcularon las semividas mediante métodos convencionales, comparando la concentración de analito con la cantidad presente originalmente.

Para los resultados véase el ejemplo 13.

Evaluación de la estabilidad de hepatocitos

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 min \pm 15 sec. Entonces se añaden los hepatocitos a un volumen 10X de tampón bicarbonato de Krebs-Henseleit previamente calentado (KHB) (glucosa 2000 mg/l, sin carbonato de calcio y bicarbonato de sodio, Sigma), se mezclan cuidadosamente y se centrifugan a 500 rpm durante 3 minutos. Tras la centrifugación, el sobrenadante se retira cuidadosamente y se añade un volumen 10X de tampón de KHB calentado previamente para suspender el sedimento celular. Esto se mezcla cuidadosamente y se centrifuga a 500 rpm

durante 3 minutos. El sobrenadante se retira entonces y se descarta. La viabilidad celular y el rendimiento se determinan entonces mediante recuentos celulares, y estos valores se usan para generar suspensiones de hepatocitos humanos a la densidad de siembra apropiada (densidad de células viables = 2×10^6 células/ml). Se prepara una disolución de dosificación 2X en KHB calentado previamente (DMSO al 1%) (disolución con adiciones conocidas 200 μ M: 20 μ l de disolución madre de sustrato (10 mM) en 980 μ l de DMSO, disolución de dosificación 2X: 10 μ l de disolución con adiciones conocidas 200 μ M en 990 μ l de KHB (2 μ M tras la dilución).

Se añaden 50 μ l de disolución de dosificación 2X calentada previamente a los pocillos y se añaden 50 μ l de disolución de hepatocitos calentada previamente (2×10^6 células/ml) y se inició el cronometraje. La placa se incuba entonces a 37°C. Se añaden 100 μ l de patrón interno que contiene acetonitrilo a cada uno de los pocillos tras la finalización del tiempo de incubación (0, 15, 30, 60 y 120 minutos), se mezcló cuidadosamente, y se añaden 50 μ l de disolución de hepatocitos calentada previamente (2×10^6 células/ml). Al final de la incubación, se determina la viabilidad celular. Se centrifugan las muestras a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se diluyen los sobrenadantes 2 veces con agua ultrapura y se analizan los niveles de compuesto mediante CL-EM/EM.

Evaluación de solubilidad en agua

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

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

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

Se preparan los compuestos de prueba como disoluciones madre en DMSO a concentración 10 mM. Las disoluciones madre se diluyen por duplicado en PBS, pH 7,4 en tubos Eppendorf de 1,5 ml hasta una concentración objetivo de 100 μ M con una concentración de DMSO final del 1% (por ejemplo, 4 μ l de disolución madre de DMSO 10 mM en 396 μ l de tampón fosfato 100 mM). Los tubos de muestra se agitan entonces cuidadosamente durante 4 horas a temperatura ambiente. Se centrifugan las muestras (10 min, 15000 rpm) para precipitar partículas no disueltas. Se transfieren los sobrenadantes a tubos nuevos y se diluyen (el factor de dilución para el artículo de prueba individual se confirma mediante el nivel de señal del compuesto en el instrumento analítico aplicado) con PBS. Entonces se mezclan muestras diluidas con el mismo volumen (1:1) de MeOH. Las muestras se mezclan finalmente con el mismo volumen (1:1) de patrón interno que contiene ACN (hidroximacrociclo, 6) para análisis de CL-EM/EM.

Evaluación de la permeabilidad celular

La permeabilidad celular puede someterse a prueba tal como sigue: el compuesto de prueba se disuelve a 10 mM en DMSO y entonces se diluye adicionalmente en tampón para producir una concentración de dosificación de 10 mM final. El marcador de fluorescencia, Lucifer Yellow, también se incluye para monitorizar la integridad de membrana. Entonces se aplica el compuesto de prueba a la superficie apical de monocapas de células Caco-2 y se mide la permeación del compuesto en el compartimento basolateral. Esto se realiza en la dirección opuesta (basolateral a apical) para investigar el transporte activo. Se usa CL-EM/EM para cuantificar niveles de tanto los compuestos de prueba como control de patrón (tales como propanolol y acebutolol).

Evaluación *in vivo* de la farmacocinética

- También pueden usarse ensayos *in vivo* para medir la biodisponibilidad de un compuesto. Generalmente, un compuesto se administra a un animal de prueba (por ejemplo ratón o rata) tanto por vía intravenosa (i.v.) como oral (p.o.) y se toman muestras de sangre a intervalos regulares para examinar cómo varía la concentración en plasma del fármaco a lo largo del tiempo. El transcurso de tiempo de la concentración en plasma a lo largo del tiempo puede usarse para calcular la biodisponibilidad absoluta del compuesto como porcentaje usando modelos convencionales. Un ejemplo de un protocolo típico se describe a continuación.
- Se dosifican los ratones con 1, 10, o 100 mg/kg del compuesto de la invención o el compuesto original i.v. o p.o.. Se toman muestras de sangre a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 420 y 2880 minutos y la concentración del compuesto de la invención o compuesto original en la muestra se determina por medio de HPLC. El transcurso de tiempo de las concentraciones en plasma puede usarse entonces para derivar parámetros clave tales como el área bajo la curva de concentración en plasma-tiempo (AUC – que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco inalterado que alcanza la circulación sistémica), la concentración de fármaco en plasma máxima (pico), el tiempo al que se produce la concentración de fármaco en plasma máxima (tiempo pico), los factores adicionales que se usan en la determinación precisa de biodisponibilidad incluyen: la semivida terminal del compuesto, aclaramiento corporal total, volumen estable de distribución y % de F. Estos parámetros se analizan entonces mediante métodos no compartimentales o compartimentales para dar un porcentaje de biodisponibilidad calculado, para un ejemplo de este tipo de método, véase Egorin *et al.* 2002, y las referencias en el mismo.

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

- Para detectar análogos de sangliferina, se analizó sangre completa. Se formulan compuestos en el 5% de etanol/el 5% de Cremophor EL/el 90% de solución salina para administración tanto p.o. como i.v. Se les dosifica a grupos de 3 ratones CD1 macho o bien 1 mg/kg i.v. o bien 10 mg/kg p.o. Se toman muestras de sangre (40 ul) por medio de la vena safena, antes de la dosis y a las 0,25, 0,5, 2, 8 y 24 horas, y se diluyen con una cantidad igual de dH₂O y se ponen en hielo seco inmediatamente. Se almacenan las muestras a -70°C hasta su análisis. Se determina concentración del compuesto de la invención o compuesto original en la muestra por medio de CLEM tal como sigue: se le añaden a 20 ul de muestra de sangre:H₂O (1:1, v/v)/PK 20 ul de patrón interno (hidroximacroclido, 6) a 100 ng/ml, 20 ul de disolución de trabajo/MeOH y 150 ul de ACN, se agita con vórtex durante 1 minuto a 1500 rpm y se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. Entonces se inyecta el sobrenadante en CL-EM/EM. Se representa gráficamente el transcurso de tiempo de las concentraciones en sangre y se usa para calcular el área bajo la curva de concentración en sangre completa-tiempo (AUC, que es directamente proporcional a la cantidad total de fármaco sin cambios que alcanza la circulación sistémica). Se usan estos valores para generar la biodisponibilidad oral (F%) y otros parámetros PK cuando sea posible.

Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad

- Se hacen crecer células Huh-7 y HepG2 obtenidas de la ATCC en medio esencial modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%, penicilina-estreptomocina (pen.-estrep.) al 1% y glutamina al 1%; mientras que se hacen crecer células CEM (células de leucemia de células T humana obtenidas de la ATCC) en medio RPMI 1640 con FBS al 10%, pen.-estrep. al 1% y glutamina al 1%. Se aíslan PBMC humanas recientes de sangre completa obtenida de al menos dos donantes examinados normales. Brevemente, se sedimentan/lavan células de sangre periférica 2-3 veces mediante centrifugación a baja velocidad y resuspensión en PBS para eliminar plaquetas contaminantes. Entonces se diluyen las células sanguíneas lavadas 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS) y se estratifican sobre 14 ml de medio de separación de linfocitos (LSM; Cellgrow de Mediatech, Inc.; densidad 1,078± 0,002 g/ml; n.º de cat. 85-072-CL) en un tubo de centrifuga de 50 ml y se centrifugan durante 30 minutos a 600 X g. Se aspiran suavemente las PBMC en bandas de la superficie de contacto resultante y posteriormente se lavan 2X con PBS mediante centrifugación a baja velocidad. Tras el lavado final, se cuentan las células mediante exclusión de azul tripano y se resuspenden a 1×10^7 células/ml en RPMI 1640 complementado con suero bovino fetal al 15% (FBS), L-glutamina 2 mM, PHA-P 4 µg/ml. Se permite que las células se incuben durante 48-72 horas a 37°C. Tras la incubación, se centrifugan las PBMC y se resuspenden en RPMI 1640 con FBS al 15%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomocina 100 µg/ml, gentamicina 10 µg/ml e IL-2 humana recombinante 20 U/ml.

- Se evalúa la citotoxicidad de los compuestos sometiendo a prueba concentraciones semilogarítmicas de cada compuesto por triplicado frente a las células descritas anteriormente. Un medio que contiene células solas sirvió como el control de células (CC). Se siembran células Huh-7 y HepG2 en placas de 96 pocillos a una concentración de 5×10^3 células por pocillo. El día siguiente, se aspira el medio, y se añaden 100 ul del medio correspondiente que contiene FBS al 5%. Se preparan diluciones de fármaco de prueba a una concentración 2X en tubos de microtitulación y se colocan 100 ul de cada concentración en pocillos apropiados en un formato convencional. Tras 72 horas, se procesan las células para la evaluación de la citotoxicidad.

- Se diluyen PBMC en medio nuevo y se siembran en placa en los pocillos interiores de una microplaca de fondo redondo de 96 pocillos a 5×10^4 células/pocillo en un volumen de 100 ul. De manera similar, se siembran en placa

células CEM a 1×10^4 células/pocillo. Entonces, se añaden 100 μ l de preparaciones 2X de los fármacos de prueba en pocillos apropiados en un formato convencional. Se mantienen los cultivos durante de seis a siete días y luego se procesan para la determinación de la citotoxicidad.

- 5 Se determina la citotoxicidad usando el kit de ensayo de integridad de membranas homogéneo CytoTox-ONE™ (Promega). El ensayo mide la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) a partir de células con membranas dañadas en un formato fluorométrico, homogéneo. Se mide la LDH liberada al medio de cultivo con un ensayo enzimático acoplado que da como resultado la conversión de resazurina en un producto de resorufina fluorescente. La cantidad de fluorescencia producida es proporcional al número de células lisadas. Se aplican seis concentraciones diluidas en serie de cada compuesto a las células para calcular cuando sea aplicable los valores de TC50 (concentración tóxica del fármaco que disminuye la viabilidad celular en un 50%) y TC90 (concentración tóxica del fármaco que disminuye la viabilidad celular en un 90%).

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

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

25 Ejemplos

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

1.1 Construcción del constructo de delección de sfaA

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

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

40 (SEQ ID NO. 1) SfaA17161f 5'-
CGCTCTGTGGCGCCTGGTTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATTA
ACCCTCACTAAAGGGCG-3' (SEQ ID NO. 2)

45 SfaA17825r 5'-TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCAGAATTCACCTGCGACGTCCYCCAGATGCATTAATAC
GACTCACTATAGGGCTC-3'

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

- 50 Se transformó el plásmido pSGK268 en *E. coli* DH10B usando técnicas convencionales y se seleccionó en placas que contenían apramicina (50 μ 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 μ g/ml) y se transformó con el plásmido pRedET (tet) y se seleccionó sobre apramicina (50 μ g/ml) y tetraciclina (3 μ g/ml) a 30°C. Se usó una única colonia para preparar un cultivo durante la noche de esta cepa en 3 ml de apramicina 2TY (50 μ g/ml) y tetraciclina (3 μ g/ml) a 30°C. Se usaron 0,5 ml de este cultivo para inocular 10 ml de apramicina 2TY (50 μ g/ml) y tetraciclina (3 μ g/ml) at 30°C y se hizo crecer hasta una $DO_{600\text{ nm}} \sim 0,5$. Se transfirieron 1,4 ml de este cultivo a cada uno de 2 tubos eppendorf y se añadieron 50 μ l de arabinosa al 10% a un tubo para inducir la expresión de las proteínas de recombinación Red/ET. Se agitaron los tubos durante ~1 hora at 37°C. Se sedimentaron las células inducidas y no inducidas en una centrífuga de sobremesa y se lavaron dos veces con agua estéril enfriada; resuspendiendo y centrifugando las células cada vez. Se resuspendieron los sedimentos resultantes en aproximadamente 30-40 μ l de agua y se mantuvieron sobre hielo. Se añadió el fragmento de alteración de 1,7 kb previamente aislado a los tubos inducido y no inducido y se transfirió a electrocubetas Biorad de 1 mm sobre hielo. Se sometieron las muestras a electroporación (Biorad Micropulser a 1,8 kV, constante de tiempo resultante ~4 ms) y se añadió 1 ml de 2TY (sin antibiótico) y se mezcló para retirar las células de la cubeta. Se incubaron las células durante ~3 horas a 37°C con agitación (1100 rpm, termomezcladora eppendorf compacta) antes de sembrar en

placa sobre placas de 2TY que contenían apramicina (50 ug/ml y kanamicina 25 ug/ml e incubando durante la noche a 37°C). Se sembraron en estrías colonias de las muestras de placas inducidas sobre placas de 2TY que contenían kanamicina a 50 ug/ml para purificar y confirmar la introducción del casete de resistencia a kanamicina. Se usó PCR sobre colonias bacterianas individuales para confirmar la introducción del casete. Se prepararon plásmidos a partir de estos cultivos y se digirieron para confirmar el plásmido esperado pSGK270. Se digirieron entonces los plásmidos con *Nsi*I para eliminar el fragmento de marcador, y volvió a ligarse el resto para producir el constructo de delección en marco de *sfaA* pSGK271.

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

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

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

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

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

Se usó un único tapón de agar de ~7 mm de una cepa bien esporulada para inocular 7 ml de medio SM25-3 estéril y se incubó a 27°C a 200 rpm en un agitador excéntrico 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 medio SGP2 con resina HP20 al 5%. Se hicieron crecer los cultivos a 24°C 300 rpm en un incubador de agitación excéntrico de 1 pulgada durante 5 días antes de la recogida. Se retiraron 0,8 ml de cultivo bacteriano y se tomaron alícuotas en un tubo eppendorf de 2 ml garantizando una dispersión adecuada de la resina por todo el cultivo antes de tomar alícuotas. Se añadieron 0,8 ml de acetonitrilo y 15 ul de ácido fórmico y se mezcló el tubo durante aproximadamente 30 minutos. Se clarificó la mezcla mediante centrifugación y se retiraron 170 ul del extracto en un vial de HPLC y se analizaron mediante HPLC.

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

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

Posteriormente, volvieron a hacerse crecer ocho cepas que mostraban pérdida de producción de sangliferina para evaluar si la posible mutación de *sfaA* podría complementarse químicamente permitiendo un proceso mutasintético

para sangliferinas novedosas. Se hicieron crecer las cepas en medio simiente SM25-3 durante 48 horas antes de transferirlas al medio de producción SGP2 con el 5% de resina. Tras 24 horas adicionales de crecimiento, se alimentaron las cepas por triplicado con DL meta-hidroxitirosina 2 mM (adición de 100 μ l de una disolución 0,16 M en HCl 1 M) o L-fenilalanina 2 mM con una cepa sin alimentar usada como control. Se alimentaron también las cepas con ácido piperácico (2 mM) en metanol para potenciar los rendimientos de producto. Se recogieron las cepas tras 4 días adicionales de crecimiento y se extrajeron y analizaron mediante HPLC. Se mostró que la metahidroxitirosina complementaba completamente la mutación de *sfaA* y la adición de L-fenilalanina aumentaba los niveles del compuesto de -16 μ g. Se eligió la cepa Biot-4585 para su estudio adicional como mutante de delección de *sfaA*.

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

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

En un procedimiento alternativo para generar la delección de *sfaA*, se usan dos oligonucleótidos 15209F 5'-CAGAGAATTCGCGGTACGGGCGGACGACAAGGTGTC-3' (SEQ ID NO. 4) y 17219R 5'-GCGCATGCATGTGCCGGTGCCGGTCCGCGAGCCGCTTGG-3' (SEQ ID NO. 5) para amplificar una región de homología en el sentido de 5' usando el cósmido TL3006 (SEQ ID NO. 3) como molde y ADN polimerasa KOD. El producto amplificado se trata con polinucleótido cinasa de T4 (NEB) y se clona en pUC18 que se ha desfosforilado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón (Roche). Se comprueba el constructo resultante mediante digestión por restricción y se secuencian concienzudamente para garantizar que se genera la secuencia deseada y que no se han introducido errores durante la amplificación por la polimerasa. Se digirió este constructo con *EcoRI* y *NsiI* y se analizaron los productos mediante electroforesis en gel. Se corta del gel la banda que contenía la secuencia deseada (es decir, homología en el sentido de 5' ~2 kb) y se purifica usando procedimientos convencionales (resina QiaEX). Se usa una segunda serie de oligonucleótidos (SEQ ID NO. 6) 17766F 5'-CCTCATGCATCTGGAGACGTCGCAGGTGAATTCTGGGCG-3' y 19763R 5'-GGGCAAGCTTCTCCTGGCTGAGCTTGAACATCG-3' (SEQ ID NO. 7) para amplificar una región de homología en el sentido de 3' usando el cósmido TL3006 (SEQ ID NO. 3) como molde y ADN polimerasa KOD. Se trata el producto amplificado con polinucleótido cinasa de T4 (NEB) y se clona en pUC18 que se había desfosforilado mediante tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón (Roche). Se analiza el constructo resultante mediante digestión por restricción y se secuencian concienzudamente para garantizar que se genera la secuencia deseada y que no se han introducido errores durante la amplificación por polimerasa. Se digiere este constructo con *HindIII* y *NsiI* y se analizan los productos mediante electroforesis en gel. Se corta del gel la banda que contiene la secuencia deseada (es decir, homología en el sentido de 3' ~2 kb) y se purifica usando procedimientos convencionales (resina QiaEX). Se digiere el vector pKC1139 con *EcoRI* y *HindIII* y se aísla el fragmento de vector grande mediante electroforesis en gel y se purifica mediante métodos convencionales (resina QiaEX). Se clonan entonces los fragmentos de homología en el sentido de 5' y en el sentido de 3' aislados en este fragmento de pKC1139 en una ligación de tres vías para generar el constructo de delección de *sfaA* deseado.

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

Se introducen estos constructos de delección de *sfaA* alternativos en *Streptomyces sp.* A92-308110 (DSM9954) mediante conjugación usando los métodos en la sección de ejemplos 1.2.

55 Ejemplo 3 - Alimentación de matriz del mutante de delección de *sfaA*

Se prepararon reservas de esporas de un mutante con *sfaA* alterado (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 simiente) inoculando la reserva de esporas (1% v/v) en 7 ml de medio simiente (medio SM25) en tubos de centrifuga de 50 ml con tapones de espuma. Se incubaron los tubos de cultivo a 27°C, 250 rpm (excentricidad de 5 cm) durante 48 h. A partir del cultivo simiente, 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 (excentricidad de 2,5 cm). Para la producción de análogos mutasintéticos de sangliferina, se añadieron 0,05 ml de una disolución 0,32 M (en HCl 1 N) del compuesto 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 piperácico (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.

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

10 La tabla 1 muestra los mutasintones que se alimentaron de este modo, junto con los aductos de H⁺ y Na⁺ de CLEM, la masa molecular anticipada y el tiempo de retención de los productos mutasintéticos de sangliferina observados. Se muestran los picos principales, que se refieren a los análogos de sangliferina A. En todos los casos, también se observaron picos de CLEM para los análogos de sangliferina B (masa - 18).

Tabla 1

| Alimentación de mutasintón | Nombre del mutasintón | [M-H] ⁻ observado (m/z) | [M+Na] ⁺ observado (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)propanoato de metilo | 1106,4 | 1130,4 | 1107,4 | 5,7 |
| | (S)-2-Amino-3-(3-hidroxi-4-metilfenil)propanoato de metilo | 1102,5 | 1126,7 | 1103,5 | 6,0 |
| | Ácido 2-amino-3-(3-fluorofenil)propanoico | 1090,4 | 1114,5 | 1091 | 6,1 |
| | (2S)-2-Amino-3-(3-hidroxi(2-piridil))propanoato de metilo | 1089,5 | 1113,7 | 1090,5 | 4,4 |
| | 2-Amino-3-(2-fluoro-5-hidroxifenil)propanoato de metilo | 1106,5 | 1130,6 | 1107,5 | 5,5 |
| | 2-Amino-3-(2-fluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo | 1106,5 | 1130,6 | 1107,5 | 5,1 |
| | 2-Amino-3-(2,6-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo | 1124,4 | 1148,5 | 1125,5 | 5,1 |
| | 2-Amino-3-(4-etil-3-hidroxifenil)propanoato de metilo | 1116,7 | 1141,0 | 1117,7 | 7,2 |
| | 2-Amino-3-(2,4-difluoro-3-hidroxifenil)propanoato de metilo | 1124,7 | 1148,8 | 1125,7 | 6,0 |

15 *Ejemplo 4 - Aislamiento de 63-fluoro-sangliferina A, compuesto 14*

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

Tras la recogida, se agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Entonces se realizó una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto en bruto final (1,3 g).

Se disolvió el extracto en bruto (1,3 g) en acetato de etilo (2 ml) y se cargó sobre una columna de gel de sílice (10 x 2 cm) condicionada con acetato de etilo (500 ml). Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales de acetona (el 10%, el 20%, el 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 A 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 ejecutó 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 fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (20 mg).

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

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

Tras la recogida, se agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Entonces se realizó una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto en bruto final (1,6 g).

Se disolvió el extracto en 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) condicionada con 500 ml acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 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 ejecutó 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 producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (15 mg).

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

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

Tras la recogida, se agruparon los caldos de cultivo y 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. Se agitaron las células y la resina con 2 volúmenes de acetonitrilo durante 1 h usando un agitador magnético. Se recuperó el extracto de acetonitrilo o bien mediante centrifugación o bien permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Se realizó entonces una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones.

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

Se disolvió el extracto en 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) condicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos

graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 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 ejecutó 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 fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (38 mg).

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

Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos simiente) transfiriendo 0,4 ml de reserva de esporas en 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 (excentricidad de 2,5 cm). A partir del cultivo simiente, 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 (excentricidad 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 se añadieron 2 ml de una disolución metanólica 400 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración de 1 mM final de los enantiómeros individuales de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm).

Se agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. 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 permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Entonces se realizó una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el extracto en bruto final (7,6 g).

Se disolvió el extracto en bruto (7,6 g) en 5 ml acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) condicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 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 ejecutó 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 fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (14,9 mg).

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

Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos simiente) transfiriendo 0,4 ml de reserva de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm). A partir del cultivo simiente, 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 de 1 mM final 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 agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. 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 permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Entonces se realizó una segunda extracción con 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 un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto en bruto final (55 g).

Se suspendió el extracto en 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 que se llevó hasta sequedad. Se disolvió este extracto secado (48 g) en 30 ml acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (20 x 5 cm) condicionada con 1 l de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 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 ejecutó 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 fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (34 mg).

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

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

Se agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. 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 permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Se realizó entonces una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el extracto en bruto final (7 g).

Se disolvió el extracto en bruto (7 g) en 4 ml de acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (15 x 2 cm) condicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 30%, etc. en acetato de etilo hasta el 100% de acetona, luego el 1% de metanol hasta el 5% de metanol gradual 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 ejecutó 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 fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (4 mg).

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

Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos simiente) transfiriendo 0,4 ml de reserva de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm). A partir del cultivo simiente, 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 (excentricidad 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 se añadieron 2 ml de una disolución metanólica 400 mM de ácido DL-piperázico a cada matraz de producción para dar una concentración de 1 mM final de los enantiómeros individuales de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm).

Se agruparon 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 clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. 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 permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Se realizó entonces una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se obtuvo un tercer extracto mediante centrifugación de la mezcla de células y resina residual. Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el extracto en bruto final (10,5 g).

Se disolvió el extracto en 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) condicionada con 500 ml de acetato de etilo. Se eluyó la columna con acetato de etilo y luego con aumentos graduales en acetona (el 10%, el 20%, el 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 ejecutó la columna de manera isocrática al 53% de B durante 30 minutos tras la inyección. Se identificaron fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinaron. Se llevaron estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino (6 mg).

Ejemplo 11 - Aislamiento de 61-deshidroxi-61-amino-sangliferina A, compuesto 21

Se descongelaron reservas de esporas crioconservadas de BIOT-4585 a temperatura ambiente. Se prepararon cultivos vegetativos (cultivos simiente) transfiriendo 0,4 ml de reserva de esporas a 400 ml de medio SM25 en matraces Erlenmeyer de 2 l con tapón de espuma. Se llevó a cabo el cultivo durante 48 horas a 27°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm). A partir del cultivo simiente, 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 (excentricidad de 2,5 cm), se añadieron 2 ml de una disolución 200 mM de (S)-2-amino-3-(3-aminofenil)propanoato de metilo en ácido clorhídrico 1 M a cada matraz de producción para dar una concentración de 1 mM final de los precursores. Se continuó el cultivo durante cuatro días adicionales a 24°C y 250 rpm (excentricidad de 2,5 cm).

Se agruparon los caldos de cultivo y se ajustaron a aproximadamente pH 3 con ácido fórmico y se centrifugaron a (3300 g) durante 25 min para separar las células y la resina del caldo clarificado. Se desechó el caldo clarificado tras el ensayo habiendo confirmado menos del 5% de compuesto objetivo presente. 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 permitiendo que se asentara bajo la gravedad. Se realizó entonces una segunda extracción con acetonitrilo de las células y la resina en las mismas condiciones. Se obtuvo un tercer extracto mediante centrifugación de la mezcla de células y resina residual.

Se concentraron los extractos de acetonitrilo combinados hasta un volumen acuoso residual a presión reducida y luego se ajustaron a pH 6. Se extrajo esto dos veces con acetato de etilo y se llevaron las fases orgánicas combinadas hasta sequedad a presión reducida para dar el producto en bruto final.

Se disolvió el extracto en bruto en acetato de etilo y se cargó sobre una columna de gel de sílice (condicionada con acetato de etilo). Se eluye la columna con disolvente orgánico con polaridad creciente. Se recogen fracciones de aproximadamente 250 ml y se identifica el compuesto objetivo mediante CL analítica, se combinan y se llevan hasta sequedad. Se disuelve este material en metanol y se purifica mediante HPLC preparativa. Se identifican fracciones puras mediante HPLC-UV y se combinan. Se llevan estas fracciones hasta sequedad a presión reducida para producir el compuesto objetivo como un sólido amorfo blanquecino.

Ejemplo 12 - Datos biológicos - Evaluación in vitro de la actividad antiviral de VHC en el sistema de replicón

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

| Nombre | CE50 (µM) | CC50 (µM) | Índice de selectividad (CC50/CE50) |
|----------------------|-----------|-----------|------------------------------------|
| Ciclosporina A, 1 | 0,2 | 4,3 | 21,5 |
| Sangliferina A, 5 | 0,318 | 9,1 | 28,7 |
| Hidroximacrociclo, 6 | 8,4 | 83,6 | 9,9 |
| 14 | 0,135 | 12,8 | 121 |
| 15 | 0,195 | 16,6 | 88 |
| 16 | 0,89 | 29,7 | 32 |
| 17 | 0,083 | 11,6 | 143 |
| 18 | 3,4 | 11,7 | 3,5 |
| 19 | 24,3 | 48,1 | 3,5 |

Tal como puede observarse, 14, 15, 16 y 17 son todos muy potentes en el ensayo de replicón de Huh5.2 (tal como se muestra mediante la baja CE50), con buena selectividad frente a la línea celular (tal como se muestra mediante un alto índice de selectividad). La sangliferina A previamente descrita, 5, es menos potente que 14, 15 y 17 en la inhibición de VHC, y la ciclosporina A, 1 es menos potente y tanto 1 como 5 tienen peores índices de selectividad.

Ejemplo 13 - Estabilidad en microsomas

Se analizó la estabilidad de los compuestos en microsomas de hígado de ratón y humano tal como se describe en los métodos generales. Se incluyó sangliferina A, 5 como comparación.

5

| Nombre | Semivida en microsomas de hígado humano (min) | Semivida en microsomas de hígado de ratón (min) |
|-------------------|---|---|
| Sangliferina A, 5 | 6,38 | 6,15 |
| 14 | 9,32 | 9,78 |
| 15 | 10,81 | 9,22 |
| 16 | 6,61 | 5,48 |
| 17 | 9,50 | 9,67 |
| 18 | 7,64 | 3,46 |
| 19 | 10,37 | 4,71 |

Tal como puede observarse, los compuestos de la invención, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 tienen todos una estabilidad aumentada en microsomas de hígado humano en comparación con sangliferina A (5) y 14, 15 y 17 son todos más estables en microsomas de hígado de ratón.

10

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.

15

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.

20

Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Nagaraja Rao, R., y Schoner, B.E. (1992) Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116: 43-49.

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

25

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.

30

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.

35

E. Lawitz, R. R., T. Nguyen, M. Huang, J. Ke, J. Praestgaard, D. Serra, M. Koziel, T. Evans (2009). "Safety And Antiviral Efficacy Of 14 Days Of The Cycophilin Inhibitor Nim811 In Combination With Pegylated Interferon .2a In Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S379.

40

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.

Fehr, T., J. Kallen, *et al.* (1999). "Sangliferins 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.

45

Flisiak, R., A. Horban, *et al.* (2008). "The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus." *Hepatology* 47(3): 817-26.

Furniss, B. S., Furniss, A.I., Vogel, A.I., Ed. (1989). *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry*, Prentice Hall.

50

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.

- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- Hanouille, X., Badillo A, Wieruszeski JM, Verdegem D, Landrieu I, Bartenschlager R, Penin F, Lippens G (2009). "Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase activity of Cyclophilins A and B." *J Biol Chem.*
- 15 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.
- 20 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.
- Hite, M., Turner, S., Federici, C. (2003). "Part 1: Oral delivery of poorly soluble drugs". *Pharmaceutical Manufacturing and Packing Sourcer.* Summer 2003 issue.
- 25 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.
- 30 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.
- 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.
- 35 Ishii, N., K. Watashi, *et al.* (2006). "Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication." *J Virol* 80(9): 4510-20.
- J. Ke, 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.
- 40 Jacobson, I., McHutchison, JG, Sulkowski, M. (2007). *Gastroenterol & Hepatol* 3(S34): 1-10.
- Illing, G.T., Normansell, I.D. y Peberdy J.F. (1989) "Protoplast Isolation and Regeneration in *Streptomyces clavuligerus*." *J. Gen. Microbiol* 135, 2289-2297.
- 45 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.
- 50 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.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., y Hopwood, D.A. (2000) *Practical Streptomyces Genetics*, John Innes Foundation, Norwich.
- 55 Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz y 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.
- 60 Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbach, *et al.* (1999). "Macrolide Analogues of the Novel Immunosuppressant Sanglifehrin: New Application of the Ring-Closing Metathesis Reaction." *Angew Chem Int Ed Engl* 38(16): 2443-2446.
- 65 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.
- 5 Metternich, R., Denni, D., Thai, B, Sedrani, R. (1999). "Toward a Total Synthesis of the Immunosuppressant Sanglifehrin A. Preparation of Two Relay Compounds by Degradation and Their Use in the Reassembly of the Natural Product." *J. Org. Chem.* 64: 9632-9639.
- 10 Millay, D. P., M. A. Sargent, *et al.* (2008). "Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy." *Nat Med* 14(4): 442-7.
- 15 Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D., y P. Groscurin, Porchet, H., Crabbe, R. (2009). "Efficacy And Safety Of The Cyclophilin Inhibitor Debio 025 In Combination With Pegylated Interferon Alpha-2a And Ribavirin In Previously Null-Responder Genotype 1 Hcv Patients." *Journal of Hepatology* 50(S1): S40.
- Niwa, T., Yamamoto, S, Saito, M, Shiraga, T, Takagi, A. (2007). "Effect of Cyclosporine and Tacrolimus on Cytochrome P450 Activities in Human Liver Microsomes." *Yakuaaku Zasshi* 127(1): 209--216.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Pawlotsky, J. M. (2006). "Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets." *J Hepatol* 44(1 Suppl): S10-3.
- Pemberton, T. J. y J. E. Kay (2003). "Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A." *FEBS Lett* 555(2): 335-40.
- 35 Pockros, P. (2008). "Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus." *Gastroenterol and Hepatology* 4(10): 729-734.
- 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.
- 40 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.
- 45 Robida, J. M., H. B. Nelson, *et al.* (2007). "Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro." *J Virol* 81 (11): 5829-40.
- Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y. y 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.
- 50 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.
- 55 Schneider, M. D. (2005). "Cyclophilin D: knocking on death's door." *Sci STKE* 2005(287): pe26.
- 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.
- 60 Seden, K. D. Back y S. Khoo (2010), *J Antimicrob Chemother*, 65, 1079-1085.
- Smith, M. B. a. M., J., Ed. (2001). *March's advanced organic chemistry*, John Wiley and Sons Inc., RU.
- 65 Steinschulte, C., T. Taner, *et al.* (2003). "Cutting edge: sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant blocks bioactive IL-12 production by human dendritic cells." *J Immunol* 171(2): 542-6.

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

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

Vrolijk, J. M., A. Kaul, *et al.* (2003). "A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C." *J Virol Methods* 110(2): 201-9.

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

Yang, F., J. M. Robotham, *et al.* (2008). "Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro." *J Virol* 82(11): 5269-78.

15 Zenke, G., U. Strittmatter, *et al.* (2001). "Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action." *J Immunol* 166(12): 7165-71.

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

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

25 Todas las referencias incluyendo la patente y las solicitudes de patente a las que se hace referencia en esta solicitud se incorporan en el presente documento como referencia en el grado más completo posible.

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

30 **Lista de secuencias**

<110> Biotica Technology Limited
Moss, Steven James
35 Gregory, Matthew Alan
Wilkinson, Barrie
Kendrew, Steven Gary
Martin, Christine Janet

40 <120> COMPUESTOS NOVEDOSOS Y MÉTODOS PARA SU PRODUCCIÓN

<130> BOA-P1201PCT

45 <150> Documento GB1021522.6
<151> 20-12-2010

<150> Documento GB1113626.4
<151> 08-08-2011

50 <160> 8

<170> PatentIn version 3.3

55 <210> 1
<211> 77
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador

<400> 1
cgctctgtgg cgcctggttt ccaagcggct cgcggaccgg caccggcaca tgcataatta 60

accctcaacta aagggcg 77

ES 2 703 433 T3

<210> 2
<211> 78
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> cebador

10 <400> 2
tggatgtatc gtcgcaggac gcccagaatt cacctgcgac gtcctccaga tgcattaata 60
cgactcacta tagggctc 78

<210> 3
<211> 46596
15 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cósmido

20 <400> 3
acaccggcca caccggcggc ggctgctg tgcccgatgt tggacttcac cgaaccgagc 60
cacagcggct cgtcccgtc ctgcccgtag gtggcgagca gcgcctgcgc ctcgatcggg 120

ES 2 703 433 T3

tcgcccagcc gcgtgcccggt accgtgcgcc tccaccgcgt ccacgtccgc gggcgtgagc 180
 ccggcaccgg agagcgcctg acggatcacc cgctgctgcg aaggaccgtt cggggccgctc 240
 agaccgttcg acgcgccgctc ctggttgatc gcggtgccgc gtacgcagggc cagtacctgg 300
 tggccgtggc ggcgggcgctc ggagagccgt tccacgagga gcatgccggc gccctcggac 360
 cagccgggtgc cgtcggccgc ggcggcgaag gacttgcagc ggccgtccac ggccaggccg 420
 cgctggcggg agaagtgcgac gaagacgtcg ggggcggaca tgacggtgac accgccggcc 480
 agcgcctcgc agcactcgc gctgcgcagc gcctggatcg cccagtgcag ggcgaccagc 540
 gacgccgagc acgcgggtgtc cacgggtgacc gcagggcctt ccaggccgag gacgtagggc 600
 atgcggcccg acagcacgct ggcggagttg ccgatgccga cgtagccctc cgcgctctcg 660
 acggtcctgc gcacgagctg ggcatagtcc tggccgttgg tgccgaggta gacgccgacg 720
 tccgcgccgc gcagggactt cgggtcgatg ccggcgcggt cgacggcctc ccaggcggctc 780
 tccagggccca gccgctgctg cgggtccatc gccagcgcct cgcgcggcga gatccogaag 840
 aagtccgcgt cgaaccggc gacgtccgcg aggaagccgc cctcccgcac gtacgcagctg 900
 cccgcgtgct ccggatccgg gtggaagagg cccgcgaggt cccagccccg gtcgtcgggg 960
 aacgggggtga gcgcgtcgc ctcgtcggcg agcagccgcc acaggtcctc gggcgaggtc 1020
 acgccgccgg ggtaccggca cgcctatgcc acgatcgcga tgggatcgtc gtcggcgggg 1080
 cgggcgacgg cgggcaccgg cgcctctcc tcggcgcggt cgccgaggag ttcggccagc 1140
 aggtggccgg ccagggagcg cgggttgggg tggtcgaaca cgagggtcgc gggcaggcgc 1200
 agcccgggtg cggcggacag ccggttgcgg agttcgcagc cggtcagcga gtcgaagccc 1260
 agttccttga acgcccggcc gggggtcacg gcgggtgctc cgggtgtggc gaggaccacg 1320
 gcggcgtgcg agcggacgag cgtgagcagg gtccgctcgc gttccgcggc ggtgagtcg 1380
 gtgagctttc cggccagggt gtccggtccg gcgcccgcgg tggcggcgcg ccggacgggg 1440
 ccacggacca gccggcgcct cagcgcgggt acggcgggtga cgcgggtggc gaacgaggtg 1500
 aggtccagcc aggcggggac gacgacgggg gcggagccgg cgggtggcgcg gtcgaacagg 1560
 gcgagcgcgt cgggcgtcgg cagcggcacc acgcccgcgc gggccgcgcg ccgcaggtcg 1620
 gcgccgccca ggtggccgggt catgccgctg gcgtgcgccc acaggcccca cacctgggag 1680
 gtggcgggca ggcctgggc gcggcgggtg gccgcgagcg cgtccacgaa ggcgctgccc 1740
 gccgcgtagt tgccctgtcc gggcgccccc aagaggccgg aggtggagga gaacagcacg 1800
 aagacggccg gccgggtgcgg ggcgggtgagt tcgtgcaggt tccaggcggc gtcgaccttg 1860
 gggcggagca ccttggcgag ccgctcgggg gtctgggagg cgatgacgcc gtcgtccagg 1920
 acgccggcgg cgtggacgac tccggtcagg ggggtgctcgg cgggtgatccg gtcgagcagg 1980

ES 2 703 433 T3

gcggccagtt cgggtcggtc ggcggcgtcg caggcggcga cggtcacctc ggcgccgagg 2040
 gcgcgcagtt cgccggcgag ggtcacggcg tcggggggccg cgtcgcccg cccgtccggcc 2100
 aggaccagcc ggcgtacgcc gtgctcggtg accagggtggc gggcgcagag ggcgccgagc 2160
 gtgccgggtgc cgccggtgac gaggaacgac cccgtcggacg gccacagggc cgcctggctc 2220
 gtgggctcgt cgggtcgcgg ggcgcggacc agccgggggtg cgaggaccgc gccggagcgc 2280
 acggcgatct cgggttcgcc ggtggcgagg acagcgggca gctgttgag tgcgtcgggg 2340
 cccgtcgatgt cgaccagcac cagcctgccg ggggtgttcgg cgcgggcgga gcggatcagg 2400
 ccccacacgg gcgcgtgggc gaggtcggtg acgtcctcgt gctcgaccgg gaccgcgccg 2460
 tgggtgagga cggccagacg ggtgccggcc agtcgctcgt cggcgagcca ctctgaaga 2520
 gcggtcagca cgcgccgggc gccggcgtgg gccgcgccgg cgggtgtcgt gccccgactgc 2580
 tgccgacacg gcagcacgag ggtgccgggc acgggtgtcca gggcggcgac ggcggcgagg 2640
 tcggggcagg aggggtatcc gggcagcggga aggccgccga gcacggcgat gccgtcgacg 2700
 tcggcccgcg gcagcggcac gggcgtccac tcgaccgggt acagctcgt gtccggggccg 2760
 gggccggccg tggccggcgg gcgcagggtc acccgcgtcga cggtgagcac ggcggctccg 2820
 ctgtcgtcgg tggcgtgcag ggtgaccgtg tgctcgcccg cggggtgcag gcgtaccgcg 2880
 agccgggtgg cgccacggc gtgcagggtg acccgcgtcc aggcgccggg gaccaggccg 2940
 ggggtgtacg ccgcgagggc gtcggtgagc agggcgggggt gtacgccccca gccgccggcg 3000
 gtctcgtcgg tcagctcaac ggtcacgtcg gtcagctcga cggtcacgtc ggtgtccggg 3060
 tcccctggcg cggcggccgg ggcggtgccg gtgtgcggga ggaggacgcc ggtcgcgtgc 3120
 cgggtccagg gctggtcgtc gtcggcgtcg gcggggcggg agtggacgac gaccgggcgg 3180
 gcgccgtcct cgttctccgc gccacgggtg acctggaggc ggcgggcttc gccgacgggtg 3240
 tcgagcggtg cctcctcggc cagttcgccg agcgtcctgc cgtcggccgc gtgcagggcc 3300
 aggtcgagta cggcgcgggc cggcagctcg gtgccggccg gcacgcgcc cccgtgaacacc 3360
 tgtccgccgg atccggcgag cggggtgacg gcgccgagca gcgggtgcc gccgccggtc 3420
 agggccaggc cggcggcgtc ggaggcgacc gggccgctgg gccagaagcg gcggcgctgg 3480
 aaggcgtagg tgggcaggtc gacgtggcgt cccgtcggggc agcccaccgt ccagtcgacg 3540
 gacacgccgt ggacggcggc ctccggcagc gaggtgagga ggcggcggcg gccgtcctcg 3600
 tcgcggcgga gggtgccgac gacgacggcg gtcgcgtcgg tggcctccgc cgtctcctgc 3660
 acggcggccg tcagcaccgg gtgcgggctg atctccacga acacggcgtg gccggagtcg 3720
 agcaggccgc gcaccacggg ctccaaccgt acgggctccc gcagggtgag gtaccagtag 3780
 cggcgtcga gccgtgtct gccgaggggg ccgccagca ggggtggagt gaaggcgatg 3840
 ccggcctcac cgggccgag ttccggcagc gcggcgcgca actcggcttc gagggactcg 3900

ES 2 703 433 T3

acatgggccc agtgggaggc gtagtcgacc gcgatgcggc gcagtcgtac cccgtcggcc 3960
 gaccaggcgg ccatcacctc gtccagcgca tcggggctgc cgctgaggac caccgacgac 4020
 gggccggtga gggcggcgac gcaaaccgct ccggaccacg gtgcgagccg ccgtgtgacg 4080
 gtggcctcgg gcagggcgac ggagaccatg ccgccgcgcc cggccagccg ctccggcgatg 4140
 agccgcgacc gcagggcgac gatccggggc ccgcccgcca gcgacagcac acccgccaca 4200
 caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac 4260
 gaacgccaca cctccgcca cgacaccatc accgcccaca acaccggctg aacgacatcc 4320
 acccgctcca acgccaccgg atcaccacgc acaccacgca acgaccagcc cacgaaacggc 4380
 tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga 4440
 tccaccgcca tccccaccca ctgcgcccc tgaccgggga acacgaacac caccggccc 4500
 tcaccgggca acccggaac acccgacacc acaccctcca ccggctcccc cgcggccaac 4560
 gccgccagag aagcccgcgc accggccaca tcagcggcca ccaccaccgc acgatgcggc 4620
 aacaacgccc gcgacgcggc aagggaccag gagaggcca ccgggtccag gccgggggtgg 4680
 gtgtcgaggt gggcggcgag ccgggtggcc tgctcggcga gggcggcctg ggagcgggcg 4740
 gagagcagcc acggcaccga gcgcggcgcg gcgccgcgcg cgggcgcggc cggttccgcc 4800
 ggggcctcct ccaggatgag gtgggcggtg gtgccgctgg ccgccaacga cgacacgccc 4860
 gcgcggcgcg gccggtcggg cggggggccag acggcggcgc cggtgacgag ttcgacggag 4920
 ccggaggccc agtcgatgtg cggtgagggg gcgtccacgt gcagggtgcg gggcacttcg 4980
 ccggcgcgca gcgcgagcac cgtcttgatc acgccggcca cggccgcccgc ggggcccggg 5040
 tggccgatgt tggacttcag cgagcccagc cgcagcggct gtgcgcggtc ctggccgtag 5100
 gtggccagca gggcggtggc ctcgatgggg tcgccgaggg tgggtgccggg gccgtgtgcc 5160
 tccacgacgt cgacgtcggc ggcgggtgag ccggcggcgg ccagcgcgga gcggatgacc 5220
 cgctgctggg cggagccggt gggggcgggt agcccggagg aggcgcccgc ctggttgatc 5280
 gccgagccgc ggaccacggc cagcacgggg tggccggtgc ggcgggcgtc ggacagccgc 5340
 tccagcacga ccacgcccgc gccctcggac cagccgatgc cgtccgcggc ggcggcgaac 5400
 gccttgacgc ggccgtcggg ggcgaggccg cgctgccggg agaactccac gaaggcacgc 5460
 ggggtcgaca tgaccatcac gccgcggcg agggccagcg agcattcgcc gctgcgcagg 5520
 gactggccgg ccagggtgcag ggcgacgagc gaggacgagc aggcgggtgc cacgctgacg 5580
 gccgggcctt ccaggccgag ggtgtaggcc acccggccgg agagcacgct ggcgtagttc 5640
 ccggtgccga gcagcccctc gtccacgccc gcgaccgcgc cgtgccgtga gtcgtagcgc 5700
 tggtcgggtg cggcccggaa gacgcccggg gcgctgccgc gcaggccggt cggatcgacg 5760

ES 2 703 433 T3

ccggcgtgct cgaacgcctc ccaggcgact tccaggaaca gccgctgctg cgggtccatc 5820
 gccagcgcct cgcgcgggct gatgccgaag aagtcggcgt cgaagccggc ggcgtcgttc 5880
 aggaagccgc cctggcgcag gtaggtgtgt ccggcccggc ccgggtcggg gtcgtagagg 5940
 ccgtcgaggt cccagcccg gtcggcgggg aagtcgccga tgacgtcacg gccttcggcg 6000
 aggagctgcc acaggtcgtc gggcgaggcc actccgccgg ggaagcggca ggccatgccg 6060
 accacggcca gcggctcgtc gccgggggtg gcgcggacgg cggggcgggc cgggacgggc 6120
 gcgcctcga gccgggtgag cagatggtcg gtgagggcgg ccgggttcgg gtggtcgaag 6180
 acgacgctgc tggccagcgt caggccggtc gcctcggcca gcgcggtcgc cagccgcagg 6240
 gaggcgaggg agtcgaagcc gagggcggcg aaaccgccgt gcggttcgat cgcggcgggg 6300
 tcggcgtggc cgagcacggc gccgggtccgc agccgtacca ggtccatgac gcgggtgccg 6360
 cgttcggcgg gggtcagccc ggccagctcg tcgcgccagg gcgtgccctc gtcggcggtc 6420
 cgctgcgcgg ggagcgcgac ggggggtggcg gccgggggca gcgggcgggc cgctgcgtcc 6480
 acgggcggcc agtaccggtc gcgctggaag gcgtacgtcg gcaggtcggc cgggtgggct 6540
 ccggtgcccc ggaagaaggc ggtccagtcg atgcgcacgc cgtgcgtgtg cgcctcggcc 6600
 aggttgggtca gcagggtcgg caggccggcc cggtcgcgct ggaggggtgcc gacgaccgcg 6660
 gctccggtct ccgtgcgctc gacggtctcc tgggtgccga cggtcagtac ggggtgcgga 6720
 ctgacctcga tgaagccccg gtggccctgg gcgagcaggg cggcgacggc gtcggcgtag 6780
 cggacggggt cgcgcaggtt gcggtaccag tagccggcgt ccagcgcctg gccgtccgcc 6840
 cactcccccg tcacggtgga gaacagcggc accgtgccct cacccgccg cacgccctcc 6900
 agatcagcca gcagagcctc acgcaccggc tccaccagca ccgaatgcga ggcatagtcg 6960
 acagcgatac gccgggcccc cccccccga ccccgcaat gagccaggaa ctccctcagc 7020
 gccaccccct caccgcgac gacgaccgac tcaggaccgt tgaccgcagc caccgccaac 7080
 cggcccggcc agcccaccaa cagctcctcg acaccggacg gcccggcagc gaccgacacc 7140
 atccccccac tgcccgcag cgccgtcaaa gccctgctgc gcagggcgac gaccggggcg 7200
 ccgtccgcca gcgacaacac acccgccaca caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga 7260
 ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac gaacgccaca cctccgcaa cgacaccatc 7320
 accgcccaca acaccggtg aacgacatcc acccgctcca acgccaccgg atcaccagc 7380
 acaccacgca acgaccagcc cacgaacggc tccaacgcca ccgcacactc agccatccgc 7440
 cccggaaca ccggcgacga atccagcaga tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc 7500
 tgaccgggga acacgaagac ggcgcggcgg tcgccgacgg cgcggcccg caccacgtcg 7560
 gccgactcgg cgccttcgc cacggcggtc agggcggcga gcaggggtgc gtggtccgcg 7620
 ccgaggacga ccacgcggtg ttcgaaggcc gtacgggtgg tggcgagggc gagggccacg 7680

ES 2 703 433 T3

tcgtgggggg cggcgtcgtg cgcgggcccgg tgggcgagga ggcgttcggc ctgggcgcgc 7740
 agtccggccc ccgcccgga ggacagcgtc caccggacga ccggcagggg gcgggtccgtg 7800
 gcctcgtcgg tgggctcggg ccgggcccggg gcctgctcca ggatggcgtg ggcgttggtg 7860
 ccggacacgc cgaacgacga caccgcccgg cggcgcgggt gctccccgcc cggccagtcc 7920
 cgctcctcgg tgagcagttc cacggcgcgg gcgggtccagt cgacgtgagg tgacgcctcg 7980
 tccacgtgga gcgtgagcgg cagcgtgccc tggcgcgatgg cctgcacccat cttgatcaca 8040
 ccggccacac cggcggcggc ctgcgtgtgc ccgatgttg acttcaccga accgagccac 8100
 agcggctcgt cccgctcctg gccgtagggt gcgaggaggg cctgcgcctc gatcgggtcg 8160
 cccagcccgg tgcccgtacc gtgcgcctcc accggcgtcga cctgggtcgc ggccaggcgg 8220
 gcgtcggcca gcgcctggcg gatcacgcgc tgctgggcga gtccgttggg ggcggtgagt 8280
 ccgctgctcg cgcctcctg gttgatggcg gtgccgcgga ccacggccag cacggggggg 8340
 ccgttgaggc gggcgtccga gagccgttcc aggacgagca tgcccgcgcc ctcggcgaag 8400
 ccgaaccctg cggcccgcgc ggcgaaccgc ttgcagcggc cgtcggccgc gagggcccgc 8460
 tgccggctgt actcggtgaa caccgcccgg gtggacagca cggtcgcccc gccggtgagc 8520
 gccagcgtgc actccccggc gcgcagcagc cggaccgcga ggtgcagggc gaccagggac 8580
 gaggagcagg cgggtgtccac ggagagggcg gggccctcca ggccgagggg gtaggcgacc 8640
 cggccggaga gcacgctggg cgagggtgcc gtgacgacgt acccctccag ctcggtgggc 8700
 accgggcccg tgatgtcggg gtagtcctcg ctgctgaagc cgacgaacac gccggtgggc 8760
 gtggagcgcg ggcgggcccg gtcgatgccg gcccgctcca gggcctccca tgagggtctcc 8820
 agcaccagcc gctgctgagg gtccatggcc agcgcctcgc gcgggctgat gccgaagaag 8880
 ccggcgtcga agtccgcggc gccgtcaggg aatccgcctt cgcgggctga ggagggtccg 8940
 ggccgggtcg ggtccgggtc gtagaccgag gccatgtccc agccgcggtc ggcggggaac 9000
 gccgagaccg cgtcgggtccc atcgggtcacc agccgccaca ggtcctcggg cgagggtcacg 9060
 ccgcccgggt agcggcaggc catgcccacg atcgcgatcg gttcgcggtc gcgggcctcg 9120
 gcctcgcgca gccggcggcg ggcgacctgg agatcggccg tgacctgctt gaggtagtcg 9180
 agcagtttgg cctcgtcagc catcggtgca cccccgtgcg gttcgttcgg cgcgggtcac 9240
 gagacgcccc ggtcgtatcag gtcgaagagt tcgtcggcgg tgacgcccgc cagagcggcc 9300
 cgctcgggtg tgccgtcggc cgtgccggcg tcccagcggg ccgcgaggtc ccgcaggtgc 9360
 gccgccaccc gggcgcggtc ggtgccgtcg gccggcagtg cgcggagcgc gctctccacg 9420
 cgggccagtt cggcgtatgat ccggtcggcg ctgcctcgc cggactcgtc cggcaggagc 9480
 gcgtcagagga ggtggtcggc gagcgcggcc gggttcgggt ggtcgaacac gatggtggtg 9540

ES 2 703 433 T3

ggcagtcgca ggccggtggc ggtgccgagg cggttgcgca gttccacggc ggtcagcgag 9600
 tcgaagccca gttccttga gcccgggtcg ggtgccaccg cgtcgcgtcc ccggtgtccc 9660
 aggacgtcgg cgacctggcc gcggacgacg tcgagcaggg cgggggcgcg ctccgggcgcg 9720
 ggcagcccgg tgatccgcgc caccagggcc gccgcaccgg gcaccgggcg ggcggcggcc 9780
 gggccggccg ggggtggcgac caggccgcgc agcagcggcg ggggtggcgcg ggcggaggcg 9840
 gtggcgaggt ccaggcgcgc ggtgacggtc acggcgtcgc cgggtggcggg ggccgtgtcg 9900
 aacagggcca gtccttcggc ggcggccatc ggcacgatgc ggttgcggcc ggcgcggggc 9960
 acgtcggcgg cgtccaggtg ccgggtgagg ccgggtggcgt cggcccacag gcccagggcc 10020
 gcggcgggtg cgggcaggcc ggcggcgcgg cgccttcggc cgagcgcgtc gaggaaggcg 10080
 ttggcggcgg cgtagtggc ctgcgcgggg gtgccgaggg tggccgccgc ggaggagaac 10140
 agcacgaagg cggacaggtc cttgtcctcg gtgagttcgt gcaggtgcca ggcggcgtcg 10200
 gccttcgggc gcagtacgcc cggcagccgg ccggcgcgca gttcggtcag caccgcgtcg 10260
 tcgagggcgc ccgcgggtgt caccaccgcg gtcagcgggg cctcggcggg cagcttggcg 10320
 agcagcgcgt cgagggcggc gcggtcggtg acgtcgcagg tctcgaagcg gacggtggcg 10380
 cccgccgcgg ccagttcggc gaccaggtcc gcgctgccgg gggcggcggc gccgcgccgg 10440
 ctggccagca ccaggtcacg ggcgccgtgt tcggacacca gatgccgggc gagcatgccg 10500
 ccgagcacgc cggcgcgggt gatcaggacg gtgccgtcgg cgtaccgggc gacggtgagc 10560
 acgatcttgc cgggtgtgcc ggcctgggcc atgaaccgga acgcggtgcg cgcgtcggcg 10620
 aggggccagg tccgggtggg cagcccggtc agctcgcgccc cctcggcgtg ggcgacgacc 10680
 tcggtcagca ggctctggac gcggtcgggg ccggcgtcca gcagcaggtc gaacgggagg 10740
 tagtcgacac cgggcaggcc ggcgggggtcg cggcgggtcgg tcttgccgag ttccaogaac 10800
 cgtccgccgg gacggagcag tcgcagcgac gcgtccacga actcaccctg gagggagttc 10860
 agcacgacgt ccatctccgg gaaccgctgc gcgaactccg tatcccgcga cgacgccaca 10920
 cgcgcctcgt ccagaccggc cgcgccgagc acctcgtgct tgccgggact cgcgctcgca 10980
 tacacctcgg cgcggcagc cccgcgccacc cgcaccgcgg ccatgcccac accaccggcc 11040
 gccgcgtgca ccagcaccgg ctcccccgcc cgcaccccgg ccacatcgcg cagcgcgaac 11100
 caggcgggtg cgaacacgga cggcagggcc gggcgcggga cccaggacca gccggcggga 11160
 acgggcacca cgagccgccg gtccaccacg gcgaggggtg cgaagccgcc cggcaccatg 11220
 ccgaggactc ggtcgcggac ggcgaggtcg gtgacgtccg gggcgaccgc gaccacgggtg 11280
 cccgcggcct cggagccgat cgcgtcgacc tcgtccgggt acatgtcgag cgcgcacagc 11340
 acgtcgcgga agttcaggcc cgcgcgcggc acggcgtatg ggacctggcc ggggtgccagg 11400
 ggggcgggtg cgtcgggagc ggcgacggcg tcgacgccgt cgatgctgcc gggccggacc 11460

ES 2 703 433 T3

acgtcgacgc gccaggcgtc ggcgcccagc ggcggggcgca ggcggtctc agcggcccgg 11520
 gtgagccggg cgacgaggcg ttccgctcg cggagcgcgg tctgcggtc gtcgcccagc 11580
 gccggcacag cgtccagggg ggcgggtgtg ccgtcgggtg cgacgagcag gaaccggctc 11640
 ggggtgctcgg tctgcgcgga ggcaccagg cccagaccg cggcggcggc cgggtcgggt 11700
 tcctcgccgg gccgggccc gacggcgtgc cgggtgacga tcgagagccg ggcctgccc 11760
 aaccggctgt cggcgagcca ctctgacgc agttccagca cctgggagggt ggcccgggtg 11820
 gcggcggcga ccacatcggc tcctgtgctg acgggagcga ggacgaggtc caccgccc 11880
 gcgtcgatgt cggcgagggc ggtgctcagg ggcgcccga ggccttcgg tccgtcgccc 11940
 aggacggcgc agcgcgcggc ggcgggtgtc tcggcgtcgg gggctgcca ggtcacgcgg 12000
 aacagcgcgt cgcgcgtgcc ggcggcggcc acggcgcgga gctgcccggc cgacgcgggc 12060
 cgcagccgca ggcggccag ctccacgacg ggcggccct cgcggctcgg cgcggtgagg 12120
 ctacgctgt cggcgtctc ccgggcccgc cgcaccgca ggaccgggc cgggcccggg 12180
 tgcacggctc cgcgggtcca ggtgaacggc agcagcagcg gcgctctc gggctcggcg 12240
 gcgggcacgg cctgggtgac ggcgtcagc agcgcgggt gcacgagatg gccggcgggtg 12300
 tcgacgggtg cggggagttc gacctcggcg tagacctcg tgtcccggcg ccacagggcg 12360
 cgcaggccct ggaaggcggg cccgtagccg tagccgcggg cggcgaaacg gtcgtacacg 12420
 ccgtccaccg ggaccggctc agcgcgcc cggggccacg cgcgggtctc gggctcggcc 12480
 ggctcggccg gctcggccgg tcccaggacg cccgtggcgt gccgggtcca gccgtcggcg 12540
 gagtgggagt ggacggcgac cgtgcccgg cccgaccct cggcggcgtg cacggtgacg 12600
 cgcagggtca ggcgtcggc ggggacccc atgggcgcgg ccagggtcag ctctcgatc 12660
 tgggcgcgggt cgagccgggt gccggcgtg gccaccatct ccaggacggc ggtgcccggc 12720
 agcagggcgg tcccagcac ggtgtgctc gtcagccagg ggtgctctc ggggtgatc 12780
 cggccgggtg ggagcaggcc gtcctcgtc gggagttcgg cctcggcggc gagcagcggg 12840
 tgcctccgg cggtgaggcc gacggcgtc aggtcgcgg cggcggcctg gggggtgagc 12900
 cagtagcgt cgcgtggaa ggggtaggcg ggcagttcga cgggcccggc gccggtgccg 12960
 tcgaacaggg ggcgccagtc gaccggcacg ccgtcggcgg ccacctcggc cagtgcgggtg 13020
 gtcaggcga gccggctcgt ctctcggc cgcagggtg cggcgaccgg cagttcgggtg 13080
 cccgccct cggcggctc ctgcatggcg accgtgagca cggggtgccc gctgatctcc 13140
 acgaagccgt ggtggccggc ggcgagcaga tcgctgatc cgttctggaa gagcacgggc 13200
 tcgagcagg tgcggtagca gtagcggcg cccagttcgc tgcgctgat ccagtcggcg 13260
 gtgacgggtg agtagagggg cacgtcggc tcccgggggc ggatgccctt gaggtcggcg 13320

ES 2 703 433 T3

agcagccgct gccgtacggc ctccacctgc ggggagtgcg aggcgtagtc ggcggcgacg 13380
 cggccggcgc gcagcccctc gtcgtcgcag aggtcgagca gtcctccag ggcacgcggg 13440
 tcgcccgcga cgaccagcga gcgggggctg ttggcagcgg cgatgccgag ccggccgggc 13500
 cagcgctcca gcatccgctc gacgttcgcc gcggggggcg cgacgaaggc catgccgcag 13560
 cggccgggca ggtcggcgac ggccttggcg cgcagcgcga cggctctcgc ggcgtcgtcc 13620
 aggggtgaggg cgccggcgac gcaggcggcg gcgatctcgc cctgggagtg gccgaccacg 13680
 gccgcccggca cgacgccgtg ggagcgcacc accgcggcca gcgagaccat gagcgcgaac 13740
 agcaccggct gcaccacgtc gacgcggctg agcggcggcg cgtcctcggc tccgcgcagc 13800
 acgtccacga ccgaccagtc caggtagggg gcgagggcgc gctcgcactc ggccatgcgc 13860
 gcggcgaaca ccgggtgggt gtcgagcagt tccacgcca tgccgagcca ctgtccgccc 13920
 tggccggcga agacgaagac gacgctgccg tcggctccgg cggtgccgcg gacgacggcc 13980
 gggtcggcgc cgcccgcggc gagcacgtcg agcgcggcga gcagttcggc gcgggtcccgg 14040
 cccacgacgg cggcgcgggt ctgaaacgcg gtgcccgggg tggccagggt gaaccgcagc 14100
 gaggcgggct cgaggccggg gtcggcggcg acgaactcgc gcagccgggc ggcctgttcg 14160
 agcagcgcgg cctcgggtgc cgccggacagc tgccagggca cggggagcgc accggcccggc 14220
 ggcgccgtcg ctctcctcggg ttccggcgcc tccgccacga tcacatgggc gttggtgccg 14280
 ctgacgccga acgaggacac gccggcccgg cggggacgct cgccccgggg ccaaggcggg 14340
 gcctcgggtca gcagccgtac gtcgccggac acccagtcca cgtgcggggg gggctcgtcg 14400
 acgtgcagcg tcttcgggag cagtccgtgc cggagcgcga gcaccgtctt gatcaactcg 14460
 ccgacgccgg cggcggcctg ggcgtggccg aggttgact tcagcgagcc cagccacagc 14520
 ggcgggtcgc ggtcctggcc gtaggaggag aggagtgcct ggcctcgat ggggtcgccc 14580
 agggcgggtgc cggtgccgtg gccctccacg gcgtccacgt cggcgggacg cagtccggcg 14640
 tcggccagtg cctgccggac cacgcgctgc tgggcggcgc cgtcggcgc ggtgaggccg 14700
 ttggaggcgc cgtcctggtt gacggcgggt cggggcagca gggcgagcac cgggtggccg 14760
 tttcgccggg cgtcggagag ccgctccagc aggagcatgc cgacgccctc ggaccagccg 14820
 agtccgtcgg cggccttggc gtacgagcgg cagcgaccgt cctcggacag gccgccctgc 14880
 ttggtgaagt cgacgaacag ctccggcgtc ggcacgagcgc tcacaccgcc ggccagcgcg 14940
 aggggtgctct cgcccagcgc cagcgaccgc accgcctggt gcagggcgac gagggaggac 15000
 gagcagggcg tgtccaccgt gaaggcgggg ccttccaggc cgaggacgta ggagatgcgg 15060
 ccggccacca cgctggccag gcggccggtc agggcgtgcc cgtcggccc ttccgggatg 15120
 ccggcgagca gcgaggagta ggactgggcg ttggcgccga cgaacacgcc gacgcgtccg 15180
 ccccgccacg agccgggtgc gacgccggcc cgctccagcg cctcccagct ggtctccagc 15240

ES 2 703 433 T3

agcagccgct gctgggggtc catcagctgg gcctcgcgcg ggctgatgcc gaagaagccg 15300
 gcgtcgaaca gggcgacgtc gtcgaggaat ccgccgtgcc gggcgaggct gggcgagggg 15360
 ccgtccgggt cggcgagggc ggcgaggtcc cagccgcggc cggcggggaa cggcgtgatg 15420
 gcgtcgcgct cctccagcac gagccgccac agctcgtcgg gggcgggtcac accgcccggg 15480
 aagcggcagg ccatgccgac cacggcgacc gggcgtcgt cggccgcgcg ctgtacgggc 15540
 tcgtcgtcct cggcgagccg gacgtgccgg ccggaggcgg cgtcgaccag gacgtccgcc 15600
 agggcgaggc cggcgggggtg gtcgtagatg gcggcgggtg gcagcttcac gccggtgccg 15660
 cggctgagcc gcagcagcag ttgtacggcg gtcagcgagc gcagtcagag ttcccggatc 15720
 gcccggtccg gcgggtacgtc ggcggcgggtg ccgaggtcga gcacctccgc gacctgtgtc 15780
 cggaccaggc ccaggacgac gcgccggcgc tcgggttcgg gcagaccggc gagccgggtg 15840
 gcgagcgagg gcggctgagc agccttcggg tcggtcagcg gctcagtcac gggcgggtccc 15900
 ctccagcggg tccgggtcgt gcagtcgga gacgggcagg ccgggttcgg cgagtgaggc 15960
 ctgtagcagc gcggcgggtg cggccagcag gccgtccacg acgcgtcggc cgagggcggc 16020
 ggcgcgggtg acgacgtgtc cggcggggcc gccgtcgggg tcctcgacca ggtgcacctc 16080
 gaggtgccag cgggcgtacg cctgttgccc cgtgaactgc tcgacgcggg ccgacggcag 16140
 gccgagttcg ccgagttcga cgttgacgag ctggaacacg acgtcgacca gcggctgttc 16200
 ggggtccagg ccgaggcctt cgacgacgcg tcccaggggc agggcctggt gggcgtaggc 16260
 gtcgagggcg gtgtcccga cccgctccag caggccggcg aaggacgggt ccgctcagag 16320
 gtcgacgcgc aggggcacga agttggcgaa gaagccgatc agcccctcga cctcggcccc 16380
 ggtgcggccc gccaccgggg agccgacggc gaggtcgtcc gtgcccgcc agcgggcgag 16440
 cgtggccgtg aacgcggcca gcagggtcat gtagagggtg gcgtcgtgct cggcgccgac 16500
 ccggcggggc gtggcgacca ggccggcggg cagccgccac tcggtcagca cgccgggtggc 16560
 gtcgtgggccc gcgtcggccc ggacgcccgg cagggcgagg ggcgcaggc cgtccagccc 16620
 gcggcgccag tggccgagct gggcgtcag cgcggctccg gtcagccagg accgctgcca 16680
 gaaggcgaag tcgccgtact ggacgggcag tcggggcagc tcggccggac ggttctctcg 16740
 tagtgccgcg taggcgccgg acagttcggc ccagagcacg ccctgggacc agccgtcggc 16800
 ggcgatgtgg tgcaccgtca gcagcaggac gtggcgtcgt ggggcgatcc gcagcagtg 16860
 gggccgcagc accggtcccc ggacgaggtc gaacggccgg gccgctgcct cgtcggccag 16920
 ggcgcggggc gcggctctgt cggccacgtc caccgggtcc agcacgatgt ccgtggcggg 16980
 caggatcacc gacgccggct cgtcggcggg cacgaagacc gtgcgacgag cctcgtgccg 17040
 gcgcacgacc tcggtcaggg cgcggcccag caggctccgg tcagttcgc cggcgtatcc 17100

ES 2 703 433 T3

cacggccagc gggatcgtcc agaccgggtc gccggggctg gcctcgtgca gccgccacag 17160
ccgcagctgg cccagcgaca gcggcagggg ctcttgccgg gacaccggca ccagggggcgg 17220
tacggccgtg cgcggggcca cggcgacgac ctccggcgagg gcgcgcgggg tgcggtgctg 17280
gaacagctcc cgcagggaca cctcggcgcc cagcgcctcg cggatccggg cgaccgtgcg 17340
ggccgcgacc agcgagtgcc cgccgagcgc gaagaagtgc tcgtcgtatc cgacccccgc 17400
ggtctccagc acctcggcga acacctcgca cagcgtctgc tccgcaccgg tacgggggtgc 17460
ggtgaagccg gtgtcgagcg tggtagcag gtccggggcg ggcagcgcgg cccggtcgat 17520
cttgccggtg gtggtcagcg ggaacgcgtc cagcgcgacg agcggccagc gcaccatgta 17580
gtccggtacg gcgtcggcca ggtgggcgcg cagccggggc ggcagccctc cgtcgggtacc 17640
ggggacgggc acgacgtagc cgacgagccg cttgacgccc ggggcgtcct cgcggggcgac 17700
gatgacggcg cgggtgacct cggggtggcg cagcaggacg gcctcgacct cgcccagctc 17760
caccgggaag ccccggatct tgacctggtg gtcgagccgg cccaggtatt ccaggctgcc 17820
gtcggggccg cagcggccca ggtccccggt gcggtagagg cgggagccgg gcggggccgaa 17880
cgggtcgggc acgaacttct gcgccgtcag ttccggcttg ccgacgtagc cgcggggcgag 17940
tccggggccg gcgaagcaga gttcgccggc cacgcccacg gggaccggcc gcagccggtc 18000
gtccaggacg taggcgcggg agttgtcgac cggctcggcc aggtgtgcgg tccggggcca 18060
gtcggcgacg tcagcgggca gggtagagga ggtgacgacc tggatctcgg tggagccgta 18120
gtggttgtgc agacgcagac gggccggggc ggcgcagaac tcgcgcagca cgggtgtccag 18180
cgacagcggc tcgcccgcct gggagatgtg ccgcagcgag gtgagccggg cccggccggc 18240
gccggcctcc tcggcgagcg cgcggatcat caggttgggc acgaatatct gctcgacggc 18300
ccgttcgtcg agccagcggg cgaagcgggc cgggtcgcgg cgggtctcct cgggtggggat 18360
gaccagcgtc tcgccgtaca ggagcgcgga gagcacctcc tgcacatgca cgtcgaaggt 18420
gagggcggtg aactgggcgg tgcgcgtgcc gggctcggccc ggtaccgtct tcttctgcca 18480
ggcgagcatg ttgaccacac accgggcggg catggcgatg cccttgggca cgccgggtgga 18540
gccggaggtg tagacgacgt aggcgagggg gtcggggccg ggtcgtccgg cggccggtgc 18600
cgcggggcggc tcctgcccgg ccggggcgtc cacgaggacg agggcgggtc cctcggcgaa 18660
gacgtccgcg tgagcccgtt cggtagcggc gacggctatc cgggcgtcgt cgacgatgag 18720
ccggatccgg tcccgggggt ggctcgggtc gatcggcaca taggcggcgc cggccttgag 18780
gatgccgatc agagcggcca tctgcacggt gccgcgctcc aggcagaggc cgacgaggtc 18840
gtccggcccc acgccctggg cccgcagccc ggcggcgatc cgctcggcct cgtggtccag 18900
cgcggcgtag gtgaggacgt cgtcctcgca ctccacggcg cgggcgcccg ggggtgcccc 18960
gacctgctcg gcgaacagct ccacgagcgg gacgtcccgg tacgggaggg cgggtgtcgtt 19020

ES 2 703 433 T3

ccaccgctcc agcagcaggc gccgggtcgtc gtcgtccagc agcagagagcg cggacagcgg 19080
 cgcgtccggg tcggcgaggg cggcgcgcag cagcaccgtg tggatgatgca gcaggcggcg 19140
 gaccgtgtcc gcctcgaaca gcgcgggtgga gtgcagcacg gtgccgcgca cccggtcgcc 19200
 gtctcgggtg aggtgcactt cgaggctcagc gcgggtgaag gcgtgctcgt ccagcagcgg 19260
 ttccaggcgg gcggcgccga ggcggtcgcc cttgtccccg ggcgcccgca tcagctggaa 19320
 gaccacctgg accagcgggt tcggggacag gtcccgtcgt ggtgccaggg tctccaccag 19380
 gtgctcgaag ggcaggctct ggtggtccat ggcgcccacc accgtctcgc gcaccggcc 19440
 cagcaggctc cggaaggctc ggtcgccgga gacgtcgggt cgcagcacca gcatgttgac 19500
 gaagaagccg atcagccgct ccacctcggg gcgggtacgg cctgccacgg gggcgccgac 19560
 ggcgacgtcc tcgggtgccg cgaaccgtgc caggaccacg gtgaaggcgg tcagcagcgt 19620
 catgtagagg gtggcgccct cgggtgtcgcc gaacgcgcgc gcggcccgga ccaggctctc 19680
 gggcagttcc cacggctggg aggcgcccgc cgagccggcg acccgggggc ggggcccgtc 19740
 caggggaagt tccagggggc gcagcccggc gagccgcgcc cggcagtagg tgaggtagcg 19800
 ctccagttcg gcgccggtga gccggccctg ctgccagacg gcgaagtgc cgtactggac 19860
 aggcagttcg ggcagttcgg cggggtcgcc ggacagttcg gcgcggtagg cctcggccag 19920
 ctgcgccag aacacggcgt gcgaccagcc gtccgtgacc gcgtggtgcg cggatgatcag 19980
 gacggcgtgg tctcggccg cgaggcgcag cacgcggggc cgcagcagcg gtccccgggc 20040
 caggtcgaag gggcgcgcg cgtccgcctc ggccaggggc cgtacctcgg cctcgtcggc 20100
 gacgtccgtg acctccaggc ggagcggggc cgcgggccgt acgacggcca taggctcgcc 20160
 ggcgtcggcg gcgaagacgg tcgcgcgcgc ctcgtggcg gagaccacca gggacagtgc 20220
 ccggccgagg gcgtcgacgt cgagcggggc gtgggcgcgt acgcccacgc ccacgttcca 20280
 gaagccgctg tccggggtga gccgggtccag gaaccacagg ccgctcggg aggacgacag 20340
 cggaaagcgc gcgccgtccc ggcgggccgg ccggatgacg tccgtggccg tgccgggctc 20400
 gccgagggtc tcggccagcc ggcgcgggga gcgccgttcg aacaccgcct ggagcggcac 20460
 gtcgggcccg aagcgggcgc ggatccgggc gatggcgcg gtggccagca gcgagtgcc 20520
 gccagggcg aagaagtct cgtcggcgcc caccgggtgg acgtccagca cctcggcgaa 20580
 gatctgcac agcaccgct ccgcctcggc cgcggggcg acgtaccgc tctcggcgac 20640
 cgagcgggtg tcgggcgcgg gcagggcccg gcggtcgatc ttgccgggtg tggacagcgg 20700
 gaacgcgtc agcgcgacga acgcccagc caccatgtag tcgggtacgg agcccgggc 20760
 gtgggcgcgc agggcgggca gcacgctcgc gccggcctcc ggctccagca ccacataggc 20820
 gaccaggcgc ttgtcggccg ggatgtctc gcgcacggcg accgtgacct gcgagaccgc 20880

ES 2 703 433 T3

cgggtgccgc agcagcgcgg cctcgacctc gccgggctcc acccgggaagc cgcggatctt 20940
 gacctggacg tcggcgcggc cgaggaactc cagcgcgcgg ccgggcagcc accgtacgac 21000
 gtgcgccgta cggtagatcc gctcgcccgg cccgccccac gggtagcggca cgaacttctc 21060
 ggcggtcagg tcgggcccgg ccaggtagcc gcgcgccacc cggggcccgc cgatgaccag 21120
 ttgcgccgcc acgcccagcg gcgcccggcg gaggggtgctg tcgaggacgt acaccgggtt 21180
 gttgtcgatc ggcgcgccga tgggcacccg ggagccggcg agccgggaagc cgggttccat 21240
 cgggaacagc gtggtgaacg cggtagcctc ggtcggggcg taggcgtcgg ccacggtcag 21300
 gtgcgggtgg gcggccatca cctgggcgac ggtctcgccg gacacggcct cgccgcccgt 21360
 gagcacctcg cgcagcccgc cgaagcactc catgactcct tcggccagga ggctgaacag 21420
 gggtagcggc aggcacatcg cggtagcgcg gtgctcgccg atgagccggt cgaagggtgtg 21480
 cggttcgacg tgctcgtcgg tggcgacgac gatctgcttg ccggtcagca ggaacggcca 21540
 cagctcgtag gtggagatgt cggtagccag cggatagtgc agcagcaccg gttcgtggtt 21600
 gccgttgctc cagcggcggg cggcggccag cacgacgacg ttgcgggtggg tcacggccac 21660
 gcccttgggc tcgccgctgg acccggaggt gtagatgacg tacgccgtgg tgtcgggggtg 21720
 cgggtcgata ccggggtcgg tgtcggggcc ggggcccggg tcggtagcgt cgaggacggg 21780
 gatgccgtcg gtgccgggca ccgggcggtc ggcgatgacg acgcgcagcc ccgaggtggc 21840
 cacgatgcmc tcggtagcggc ccgggggggtt gcgcgggtcg agcggcacgt aggcgggcgc 21900
 cgccttgagc acgccgagca cggcggccac catgccggtg gagcgtccgg tggcgacgcc 21960
 gaccggttcg tcggcgcgca cgccgtgggc cagcaggagg tgggcgaagc ggttggcccg 22020
 ccggtccagt tcggcgtagg tgacccgctc gtcgccgacg atcagggcga cggcgtcggg 22080
 ggtgcggggc gcctgctcgg cgtagagccg gggcacgcag ccgtccggca gcggtagcggc 22140
 cgtgtcgttc caggcgacca gggtagcggg ccggtcggtc tcgtcgagca tggtagccgc 22200
 ggagaccggc cggtagcggg cggcgagcac ctgcgccagg accaccgaca cgtggtgcat 22260
 cagctggcgg acggtgctcg cgtcgaacag gtcggccgcg tacaggacgg tcgcgccgac 22320
 ctgtagcggc gtctcgacgg cgtgcacctc cagggtccatc cgggtgtacg cgtggtcgat 22380
 gtcgaacggc tcggcccggg cggcctgcca ccagggccgc cggggcgcgt cggcgagcag 22440
 ctggaacgcc acctgcacga gcgggttgcg ggacaggtcg cgtcggggc gcagccgttc 22500
 caccaggtgc tcgaagggga cgtcctggtg ctgcagcggc ccgaccaccg actcccgtac 22560
 ccggcccagg agttcccgga aggtcgggtc gccggacagg tcggtagcggc cggcgacgac 22620
 gttgacgaag aagccgatca gcgcctcggg ctccggcgcg gtccggcccg ccgtcggcga 22680
 gccacggcg atgtcctcgg tcggggcgta ccgggacagg acgaggtga acgcggccag 22740
 gagcaccatg tagagcgtgg ctccctcgcg ggcggcgacg gccggggcgt cccggatcag 22800

ES 2 703 433 T3

ctcggcgggc agctgccagg gcagggtgcc cgcccgcccg gtggcgacgg cgggccgggc 22860
 cttgtccagc ggcagttcca gcggggcgag gccggccagc cggccgggtcc agtagccggc 22920
 ccggcgctcc agcacctcgc cggtcagcca ggaccgctgc catacggcgt ggtcgccgta 22980
 ctggacgggc agttcgggca gcggggcgcc gtcgtacgcg gcggcgatct cggcccacag 23040
 cagggcctgg gaccagccgt cggtcgcgat gtggtgcacg gcgacgacga ggacgtggtc 23100
 gtcggggggcg agccggagca gcgtggcgcg cagcagcggg ccccgcgta ggtcgaacct 23160
 ggtggacagc tcggcggagg ccgcgggcgcg tgcccgctcg gcgtcgggta cgtcgacgat 23220
 ccgccccggc accggggcgg cggcgccgat gaccgcgggc ggcaacggcgt cggcgaccgt 23280
 gaaggtggtg cgcagggctc cgtgccgggc gacgaccgcc gacagggcgc cggccagccg 23340
 ctcggggtcc agcgggtccg gcacgcgcag ggctccgccg gaggtgtacg aggcgctgcc 23400
 gggggcgagc tgggtccagga accacatccg ctgctggggc aaggacagcg gcagcagccg 23460
 gtcgcgggtcc gcgggcaacca gcggcgggc cgggtcggcc gggagcggcg cgcggcgac 23520
 caccgaggcc agggctcgcg ggggtgcggtg ctogaacacc tcgcgacagc ggacctcgg 23580
 gccgaaggcg cgggcgattc gggcgacgag gcgggtggcg agcagcgagt ggccgcccgc 23640
 tacgaagaag tcgtcctcgg ccgccaacgc gtcggcgtcg agcagctcgg cgaagatctc 23700
 gcacagcgcc cgctcggcgt cgggtgcggc ggcggccagg ccggcgtccg ccgtctccgc 23760
 cggggcgggc agcgcggcgc ggtcgacctt gccggtggcg gtcagcggca gcgcgtcggc 23820
 gaggacgaag gccgagggca ccaggtagtc gggcagggcc gcccgggcgt gggcgcgag 23880
 ggcggcggtg tcgggtggtg ggccggcgcg cgggacgacg tgggcgacga gccgcttgcc 23940
 ggccgggccc tcaccgcgca ccacgacggc ggcgtgcgcg acggcggggg gggcggccag 24000
 gacggcctcg acctcgccgg gctcgacctg gaggcgcgc agcttcgctt ggtcgtcggc 24060
 gcggccgagg aactccagga ccgctcggg gcggcgggc accacgtcgc cgggtcggta 24120
 catgcccgtg cccgccggtc cggacgggtc gggcaggaag cgctcggcgg tggccgccgg 24180
 ccggccggcg tagccgcggg ccaggcgcgg gccgccgacg tacagttcgc cgggcacgcc 24240
 gaacgggacg ggccgcagcc ggtcgtcgag gacgtggggc cgggtgttgt ccagggggct 24300
 gccgatgggc acccgccgc cggggggccg gtcggccggc gcgatcgggt ggagggtggc 24360
 gaaggtggtg gtctcgggtg ggccgtagcc gttgacgacc gtcaggtccg ggtgggcgcc 24420
 gcgcacgcgg gccacggtcg ccggggacac ggtgtcgccg ccgacgacga gttcgcgac 24480
 gccggccagg caggtgacgt cctcctcgac cacgaggtcg aagaggccgg aggtcagcca 24540
 cagcgcgggt acgccctggt cggcgacgac acgggcgagg gcggcgggtc cgagggcgcc 24600
 gggcggggcc accacgacgc ggccggccgga cagcagcggg gaccacagtt cgtaggtgga 24660

ES 2 703 433 T3

ggcgtcgaac gcctgcgggg agtgcagcag gacccgttcg tgggcgccgc cggaccagcg 24720
 ccggtggagg gcgagggcgg ccacggcgcg gtgggtcgtg gcgacggcct tgggcgtgcc 24780
 ggtggaaccg gaggtggaca tcacgtacgc gaggccgtcc gggccgacgg tggtcggcaa 24840
 agccgtgtcg ggggctgtgc cggggacggc gcgcaggtct acggccggca ggtgctcggg 24900
 gccggcgggt gcgggaccgc cgtcggtcag cagcagcgcg gcaccggtgt cggcgaggac 24960
 ggcgcgggtc cgggcggccg ggttgcgggc gtcgagcggc aggtaggcgc cgccggcctt 25020
 gaggaccgcg agcacggcga cgaccagggtg ggcggaacgt tccgtcgcca gcgcgacgac 25080
 gctctcgggt ccggctccgt ggccggccag gacatgggcg agccggttgg cggcgcggtc 25140
 cagctgggcg taggtgaggt gttccgtccc gtcggccacg gcgacggcgt ccgggggtgcg 25200
 ggcggcctgg gcggcgaaca gctcgggcag cgaggcctcg ggcagcggtg cgccgggtgcc 25260
 ccgggcggcc cgggccaggg ccgcgtcctc gcccgcgctc gtcatcgtca gccgggacag 25320
 cggccgggtc ggctcggcgc aggcggcgcg cagcagggcc gtcaggtggc gggccagccg 25380
 ctcgacggtc tcccggtcga acagggcgcg gctgtagttg atcagtccct cgacgcccgc 25440
 ctggcgctcc tcgccgaggt agacctccag gtccatgcgg gtgaaggcgc ggtcgcccgc 25500
 gaagggttcg gcggtggtgc cggggaacgg cgcggggcgc gcggcgggcc ggggcacgta 25560
 ctggaagacg acctgggcga gcgggttgcg ggacaggtcg cgctcgggga ccagccgctc 25620
 caccaggtac tcgaacggca cgtcctgggtg cgccatctcg tccaccgagg cggcgcgagc 25680
 gcgttcgacg agttccgcga aggtggggtc gccgccgagg tcggtgcggg tgacgacggt 25740
 gttgacgaag aatccgatga gttgctcgac ctcgccagg gcccgcccg cgaccggctg 25800
 ggcgacggcg acgtcctcgg tgcgggcgtg ccgcccgagg accgcgctga acgcggccag 25860
 cagggtcatg tgcagggtcg gcacctgccg tgcgggcgac gcccgggcgg cggcgacggc 25920
 gtccgccggc agccgccagg tgacgacgcc gccctcggcg gaggcgacgg ccgggcgggg 25980
 ccggtcgagc ggcaggtcca gcgggggcag gccggccagc cggtcctgcc agtacgccag 26040
 ccgccgctcc agcacggcgg gcgacagggc acggcgctgc caggcggcga agtcggcgta 26100
 ctgcaccggc agttccggca gcgcgggctg ccggccgtcg gccagggcgg tgtagggcgc 26160
 ggtcagctcg gccacagca ggccgtgcga ccagccgtcg gtggcgatgt gatgcaccgt 26220
 cagcagcagg acgtggtcgt cgtcggcgag ccgcagcagg cgggcgcgga gcagggggcc 26280
 cttggtgagg tcgaaggggc gcgcggcctc ctcgccggcc agccgctcgg cgtcggcctc 26340
 gtccacggcg tcggtcacgg gaacgggcac cggctccggc ggcaggacga cggcgccggc 26400
 cacgccctcg tggtcggcga agacgggtgc cagggtctcg tgccgggcga cgacacagct 26460
 cagcggccgg gccagcaggc cggcgcgag cgggcccggc acgcgcacgg cggtgccgaa 26520
 gttgtagaag gcgctgtccg gcatcagccg gtcgaggaac cacagccgct gctgggcgaa 26580

ES 2 703 433 T3

cgacagctcc agcggccggt cgcgggggac ccggtgatg cccgcgggtg tctgcccggg 26640
 cctcgcctg cgctcccga gccggtgag tgccagatcc agtcccggcc gtcgcgagct 26700
 cccctgcgtc atccggctgt ctcccgtcc tctcggctt cggtgagtcc gcggtcgcgc 26760
 atcacgctgg ccagggcgcg gtgggtgccg gactcgcttg cttcgaactg ctcgaccacg 26820
 cgccgccga tcggggcggg cttctcctgg ctgagcttga acatcgtctg cacggaatcg 26880
 acccgcaggg tgaaggcgcc cacgccgggc gcgatctggc ggaagtagtc gagggaggac 26940
 tcctggtccc agccgcgcc gaagccggac tccagccgcc gggcgggtgc ggagacgatg 27000
 tccagcacgg cggcggggtc ggcgggtggc tccactgtgc cgttcacgtg gacggcgatg 27060
 aagtcccagg tgggggcccgc gggcgtgacc ccgtagaccg tcggcgagac atagccgtgc 27120
 gggccctgga agacgatgag cgcgccgtcg ccggagcgca tccggcgcca ctgcgggttc 27180
 tcgacgttca tgtggccgat cagggtggag ccggcgagcg ggacggtgcc cgcggcgacg 27240
 gcctcggcgt cggcgcctgc gggctcgtgc cggaacagca ccggcgcgtg ggtggccacc 27300
 gggacgtcgt cgtgcgaggt gacgaccatt gccagtgggt tgtgtcgcag aaacgccagg 27360
 acgacgccgt cgcaatcctc ccggtacagc ggacgttcgt acacttcagc ccctgttccc 27420
 cgctgctgcc ttgcttccgg tggagcggtc cgggtcgcac cggccgccgg tgatcgaccg 27480
 ggcgatctcg cccgcgcgga ccgccaccat ggacagcagg gtggaggcga tgccgtgggt 27540
 cgctcggtg gcgccctgga cgtagatgcc gcaccgaaa tcccgggtgg tgccgagccg 27600
 gtagtcgcgg ccgatcagca actccccgc ctcgtcccgg cggagggcgc cggagacgcc 27660
 gccgagcagt tcggccgggt cgggtggagtc gtaccgggtg gcgtacacga ccaggtcggc 27720
 gtccaggctg gtgtgttcgc ccgtgggcag gaactccacg cgtacggcgg cggattcctg 27780
 gcgcggttcg acggacacca ggcgggaggc gttcatcacc cgcagcccg gcggcggcga 27840
 caccttctgc tctactggc ggcggtagag gccctggagg acgtcctcgt cgacgacggc 27900
 gtagttggtg ccgccgtggt agcgcgatgat ggcctgcttg acctcgggcg gggcgaagta 27960
 gaagtctcc acggcggccg ggtcgaagac gcggttggcg aacgggctgg agtcggcgac 28020
 gctgtagccg tagcgggcca acaccgcga cacctcggcc tcgggtagc ggtccatgag 28080
 gtgcgcggcg acctcggccg cgctctggcc ggcgccgacc acgacggccc ggcggggcgg 28140
 gcgttcgtcg aacgcgggca gccggtgcag caactgggag ctgtgccaga cgcgttcgcc 28200
 ggtctccgcg ccctcgggca gccgggggcg caggccggag gcgaggacga ggtttctggt 28260
 ccgggcgacc acccgggtccc cggcgagcac gtcgagcgcg acgacctcac cggcttcggt 28320
 caccggccgc acaccggtgg cctccacgcc gtactcgacc aggtggttca gccggtcggc 28380
 ggcccactgg aggtagtcgt ggtactcgat ccgggagggc agcagggtgt gctggttgat 28440

ES 2 703 433 T3

gaagtcgacc agccggctcct tctcctggag ataggacagg aatccgaaat cactgggtggg 28500
 attgcgcatc gtggcgatgt ccttgagaaa ggacacctgg agcgaggagc cccccaggag 28560
 catccccga tgccagccga attccttctg cttctccagg aaaagggcct tcccggcggc 28620
 ttcggattca tggagcgcca ccgccagggc gagattcgcg gcaccgaatc cgattccggt 28680
 gacgtccagt acttctgatt ccgggctctg ctgcgcagtg gatgattgct ctgcgagccg 28740
 ggtcatatat caaccgcat tagtttttca atggatgtat cgtcgcagga cgcccagaat 28800
 tcacctgca cgtcctccag atgctgagg gaacgcgcgc tgtaaaaggt ggtctggtac 28860
 tgggttatgt cgtagtcgac gtgggccatg tcggcgatgt ccagcggccg gatctccgcg 28920
 gaacggaagt gctccagctc gccgtaggag gagacgacgc tggcgccgta ggccccggggc 28980
 ccgtcggcgg cgtccagcag gccgcattcg agcgtgaacc agaaggtctt ggcgacgaac 29040
 tggacggcgt cctcggactc caccctgcgc acggcctcgc cggccaggcg gtacaggttg 29100
 gcgaaccggt cgtcggccag ggcgctgccg tgcccgatga cctcgtgcag gatgtccggt 29160
 tccgtcgagt agaaggggtg cgcgctgtcg cggaggact ggggtggagt gaagtaccg 29220
 tcggccagag agccgcagaa cagggcgaag ggaaccacgc cggacgcggg gcgtaggcgg 29280
 aatccggtca gctggtcgag ccggtcggac acttcacgca actgcgggac gccgtcgccg 29340
 cccacctca gccgctccgc cgcctcgacg 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 ctacaagcca cccgcagcac 29700
 tcgcaagagt tttctatgcg cccgctatgt acccttttg gcagactcac cggaaattat 29760
 cgtcatccgc accgccgaa ccggagtcaa gcgttggtc ggcagggcgg cttcaagttc 29820
 ccgataggag cgggccctag gcgattcctc agatccggcc ggcgcgttcg ggtgtgtccc 29880
 aatcactgg ctaaatcct tcatgaggac ccgtcagctt gccgacggac gctctttcgc 29940
 ttgtggtgcc gggcgtttcg gtgtccgggc aggccgcgcg ggagcgcccc aactgccgcg 30000
 tcgggctgtc gcgtcgggtg ggcgcgggt tccacggctc cgggagtcct tcgacagggc 30060
 ccggcgaata tctccaggac caagccgtgg gcggtgaggt ggtcggcgag ggcggtgagt 30120
 tcggcggcgt tgcgaccgag ccgcttcgc tcgtacaccg tgaagatgac acggcagttg 30180
 ggggcgtgcg ccttgacctc ccgcgccgc ctcagcgcct cctcccggaa cttcgggctg 30240
 cccgcgccc ggggtgctgat cttctgcgcg aagatgtagt cgcgcgagat gccgtgtttg 30300
 gcgagcgcgt cgagctggga gtcacttcgc ctgcatccgc ccgcgcgcg agtggtgcgg 30360

ES 2 703 433 T3

catcgtggca gcgcgcgtca gatgcgcggc gtcgccccca ggtgaactcc gtccgcccctg 30420
 gggcaggggtg ggcggagttc accgcgtcgt gcggttcaac ggggtccaatg gaggtcgcga 30480
 tacgggtccgc ccggcgcgcg ggccgcgata atcattccgg cggggcggag ccgtcagtgc 30540
 ttgacgggtga acgtggcgcc ttggggcgcg aaggctcgtgt cgtggtcctt ggcgggtggcc 30600
 agcacggata cgtgccagac gcccttgggc aacgcggcgg cttccttggc cgagctcttc 30660
 acgggtgtagg tgcacaccga ggccgtcgcg gaagtgcctt tgcacgtggc ttctctgaca 30720
 tcccgcacatc cgcccgcctt gggcgcaagg cccgaactcg ccggccaggc gagcaccgcg 30780
 aggctcttga ttccggagtt gtcggccacg gtggcgctga aggtgagcga ggcgctccca 30840
 ccggccgtac tgggtgtagt ggcgggtggcc tttgagatct ccggcttggc cggcacagcg 30900
 gcgtcggccg aggagacgaa caccacggtg ccggcaacga cggctgcggc cacggcgagc 30960
 gacgagacga caaggcgctt ggacatgaag tatcccctca tagatgaccg ctactggtct 31020
 cttcgcagag cgctctgcgc accgcggcgt tgtgtacaca gcctgtctcg acggccctgc 31080
 ccctcacatg ggcagaacta ctcaaccgaa gtactcagac gccctgagct tgtcgttcaa 31140
 cctcgtctcc gttgggggcy ggtattgagc aggcgctttt cgaatgtggc gtccagcacc 31200
 gccgtccagg atgtgcagcc ggtctgcaag cttcgtcgcg atcaggacct tcagcagatc 31260
 cagcgcgtcg tccaccgccc gcgacgtgag gtacaccgcc gcggccagca gcgttgtgag 31320
 gctgcgagag tccgagtgcc ggcgcggcaa cgacaccttg tcgtccgcc cgtaccgcga 31380
 ccactctgcg ccgccccgtc acccgtaccg gtccgcggcg cagccggtcc agctccacca 31440
 ggcggcccga cgagcagaga atccagcacc gcccgctgca cgacgcgcgg catcccgcac 31500
 aaggcgtccc aaaacgccga ttccgccctt cccacaccga tcccacagga caggccggac 31560
 agctcgcgcc cagcagcagc ggctactgtc acccgttcgg cggcggggcg gacagagccc 31620
 gtgacaacca gattgtgacg ttccggtgatc gtgacaccaa ttccggagctg gcccgctgac 31680
 ctgtgacagc ggactggcct cgaagggtga ccgaatgcag ttcttgacag caaagacgga 31740
 ccgccgcagc tcaggggcy agtgcccgcc cgcagcacag tcggttcagg gctcgcagcc 31800
 ggctacggac agacgtggat cgcgggtcgc ggtcagcgcg aacgctgtcc ggtgaagagg 31860
 cggtagcagca ggagcacgat caccgagccg acgaccgcgg cgatccatgt cgagaggtgg 31920
 aagaagccgt tgatggagtg cacgccgaag atcaccttgc cgagccagcc gccgagcaga 31980
 ccgccgacga tgccgatgag catcgtgacg aggcagccgc ccgggtcctt gccgggcatg 32040
 agtgcccttg cgatggcgcc cgcgatgagg ccgatgagaa tccaggcgat gatgcccacg 32100
 gtgtgcgtcc tttgctgtag gtggtgccga ggaaggcccg acgaggctcc gccggggctg 32160
 cccgccggtc gctccgcgcg gacgaccggc gacatacggg tatccgctcc ggaacactcc 32220

ES 2 703 433 T3

acacgggtca aaggtcccgt ttcctccgac cgaccacccc ggcattccgat ccgtcggccg 32280
 atccgggtcga cggcggattc ggtgactggt caaccttcga tggcgctcga tcaaggttcg 32340
 ctgtcacagg tcatccgccc tcagtccctc aggtcgcccc tcggaaggcg tccaccagag 32400
 gtcaggcggg tccattcctc cggatcccca gctgcctcac agggtgctgg ggacccgggg 32460
 acggccctcg gtgttatgga taagccgaag ctcaggacgt tctcacggcg acgccggatg 32520
 agctggcgag gaggcgtgc cgaggcagtt cggttgtcac cgaggaggca tcccacttct 32580
 cacgcgtgct cattcggcgg acttccctgt accggcgccc acgagccgga gttcccgggc 32640
 tccccggctg ggcccggctg agggctgagc ccttccacgg cgaggcgaa gaggcggctc 32700
 gcctgggtgt cggggtctgt gtggtgctcg gtggccaggg cgatgccgac ggcgagggtc 32760
 agcagggtcgt gaaaggtgac gtgcggtgca accgccttgt cgcgatggc ccgctggagc 32820
 aagggagttg cggctgcttc gattacgccc ccgcagctct tcggggaggg ttcttcgggtg 32880
 ggcggctcgt agctgaggat atgggcgaat ccgcgggctg agacggcgta gcggacgaag 32940
 gcgtggaacc actccagcag tgcggtgcgg ccgtcctcgg acgcactcag ccgatgggcg 33000
 cgctcgcaca ggcccgaat gcgctcctgg aagacggctt cgaggagcgc ccggcgggtg 33060
 gggaagtgac ggcgcacggt cgccgaaccg acgcctgcca tgcgggcat ctgctcctgg 33120
 gatgcctcgg cgcctgctgc ggcgacttcc gcttcggcga cggcgaggat gcgctgatag 33180
 ttgctcggg cgtccgagcg ctggccagtc atggtctcct cgttgctaag tggcgggccc 33240
 cgccatatct tagcggcaca cgaaacggcg ggccccgccc ttttgtctct ccggcccttg 33300
 aggagcagca ccatgcccag cagcagcgat accgtcctgg tcaccggcgc caccggccag 33360
 caaggcgggg ccacggctcg cgcgcttttg gccgccaagg tgcccgtacg tgcgctcgta 33420
 cgcgatccct cgtcgaagtc cgcccgggcg atcgaggcgc tgggcgcgga actggtacgc 33480
 gcggatcttt ccgaccgggc ctccctcgac ccggcggctc agggggtccg cgcggtgttc 33540
 tcggtgcaga tgccgcccac gaccgagacc agcgtggact tcgcgagcga actcgcccag 33600
 gccaccaacc tgggtggacgc ggcgaagata gggggagtac ggcagttcgt acagtccctc 33660
 accagtggag tcggtgaaca caccgggtc gccggctggg ccgagggccg ctggggggcg 33720
 atggcggagt acttccacac caagcaggcg atcatggagg cggtgctggtg tgcgggtttc 33780
 gcccgctgga cggatgatcaa gcccgcttc ttcattggaga acctgcccct gctggcacc 33840
 aaggggcccc gcggcggact gctgacggta ctgaagccgg acaccgaact ggccttgggtg 33900
 gccgtgcggg acatcggcac gcccgcgga cacgccctcc gagaccccga ccggttccac 33960
 caggtggaac tggaactggc tggtagcctt cgcacgatgg agcagatcgc gcagaccttg 34020
 tcgcccgcct ggggcgtgcc cgtgaccgcg ccctccctga gcgtggaaga ggcccttgcc 34080
 gcgggcatgc cgaagtgggg agccggacac gagtggaaaca acgtggtcct ccagcccgcc 34140

ES 2 703 433 T3

cgccccacat tgcgccgga gttgggcatc ccgctcacca ccttcgccga gtgggcggat 34200
 gagcagttga cacatgtgtc tgattagggg tgtggcgga agggcgcc attgaccct 34260
 acggggagcg cggcggttc ccgcagagg cattgcggtc ggggggcatc ggtgccggtc 34320
 ccctggacgg gctgcaatga gcaggacagc gcagaggggt ggacacgaga tcctggagt 34380
 gcacgacgtg gccatcaggg ggtcgggcgg tacgggatgg ggatgatgta gcgcgggtgt 34440
 ggaggcatcg gccagtgcg ctgcttcgc tgttcgcgg ggtgccggca gcctgttcgt 34500
 tggagtctc gtggcttcgg agcccgccg ggaagtacac gccgtggcg ctggcccatg 34560
 ctgcccgggt gtgcctcgc tgggggaac agtaccgca ggacgcgggc gatgcggctt 34620
 cggcggcctc cctcgggtcc tcgccctct cctcgtcgt ctcgttcag tcgagagcgc 34680
 ggccgggtcc cgcctatcc cagcagcaca ccgcgcgca cgtgccgcc cgcggtcgc 34740
 catgaggccg gccgtcgtag acgctccgct ccgatagcca cctggcctcc gctccggaag 34800
 agctgaggaa gagcacagga tccgggacgg tgccatcggc cagcaacacc ccgaccgac 34860
 ccacgtggga cgaccgaac tcctcgtcg tccacgtct cctctcacct tcacccatcg 34920
 tctcgccct ctctcatcg ccgcatcgc acccggccga acgcacggat acagacgatt 34980
 ccggagtcca aggttcgcga cagcgagatc ctcgaaaagg tgacctcga cctccaccgt 35040
 gcaccaggcc tcaaagcca cgacgagcc accgagcga gaccaccgaa gacgaagcgc 35100
 atcgccgctt ccagtgcg tggttgatga ggttcaggaa agcggggtca cttctctaca 35160
 tcggacagct accgcagctt gccgcgccg ccgcccggag cggcggttc tcggcgcccg 35220
 cgtgcgggtc ggaagcggag gctcggccgg cgaggttcgc cgtcgatgcc ggcggcacga 35280
 cgggccagct ctccgatct ctctcgggc agtccggaca tcctgacggc ctggcgcaact 35340
 gcggcccggc agtcgggccc tgagcagtc gccgacgata ccggccgtcc gaccgtcggga 35400
 tgctcggcg gcaggtagat cgtcgcgag ccgacgcaca gatagattga tcgcaaggcg 35460
 cttccccttc gtcagctgag gccgctgcc tggcaggtat tgcaggagcc ggtccagcta 35520
 cgggcgacgg gcttctggtt ccgctctta tcgacttcga cagagtgtc ggtgtgctca 35580
 gtgactccgg atccgctgca agcggagcaa ggcacgtcag acattttccc aggatgcccg 35640
 attctgtggg gccgtgtcag tcgtcccgg acactcgcgc gctaccggac cgggcgggcc 35700
 catcccgaga atctcccgcc tgcatcacgg cggcgccaac ggcgagccc aacctctggg 35760
 ccacgcggtc gctcgcggc ccggtggcg acctcgtgcc gccacgttcc cactgcgcgc 35820
 tgttcgcca ctccccgcc cccagggcg agtcctcgt gcgctcgcag tactgccga 35880
 cgagcaggtc gcccgctccc ggagagggc cagcatcacg gcccgtaag gtgctccgga 35940
 tcggtggtgg ccgttgtgaa ccgccacgc ccgcccggct cgtcggcctg gccatcgccc 36000

ES 2 703 433 T3

ggctgtgccc cgctcaggat gccggggcgg tcaggacggc cttggcagcc agccggaaat 36060
 tcctgatcat cggattcggg tcgcccttgc ggctgaccag gacgaccggg ctggggggag 36120
 cgccctcgac cgggacgggt acgaggtcgg gacgcagtga gctgcgccga tcgccgaccg 36180
 gtagcacggc gatggccctg ccgctcgcga cgagttcgag cttgtcctcg tagctctcga 36240
 tcggcggcac gccggtcccg aggaactggt aggaagccca gcctgcggtc tcgaacgcac 36300
 acggcgccgc ctcttcgccg gccagttctt ccgcggtcac cgacgcggcg tcggccagag 36360
 gatggccggc cgggaccacg agcatccggg gctcctcgta cagcgggggt gtgaacacgt 36420
 cgtcggcgac gagcggcagc ggggcccggc cgatcagggc gtcgacggc ctgtcggaca 36480
 gtgccccgac gtcgcgccag tgcagatgcc ggggtggcgat ctggcgctcg gggtaacggc 36540
 ggcgcagttc ccgcacggcg gcagtgatca ccaggtcttc gacgtagccg atggcgattc 36600
 gttcgggtccg ggcttgttca cgcacggcca gctcggcctg gcgggcggcc cgcagcaggg 36660
 cctgggcccg ggggaggaac gtccggccgg ccggagtgag ccgggtgcc tgggggggtgc 36720
 ggtccagcag tcgtgtgcc agatatttct cgagccgttg gatctgacgg ctccagcgccg 36780
 gctgggctac gtgcaggtcg gcggcggccc ggccgaagtg ctggtgcgcc gccaccacgg 36840
 tgaagtagcg caccagccgc agttccaggt cctgcccag atcgttcacc ctccgaggg 36900
 acgcgtcatg ccgtttcgg aatggtcagat tgccgaaccg gtcttgagc gccatgccgt 36960
 cccgggcttt gactgaagga gcaacgtttc cccgagaaag cgacagggcg gatgaaggcg 37020
 atccagatcc acgaagcggg tgggccggaa gttctgcgg acgacgaggt gccggctccc 37080
 gagatcggcc cgggcgaggt gctcgtccgg gtgcacggcg cgggcatcaa cccgccggac 37140
 tggtagctgc gtgaagggat gaaggtcatg ccggccggga tgaggccggc gctggagttc 37200
 cctctgatcc ccggaacgga catgtcgggc gtggtccagg cggtcgctcc ggacgtgccg 37260
 gggttcggcg tcggcgacga ggtcttcggc atgctgcgg tccccgatt cgacggccgg 37320
 acgtacgcc agtacgtggc cgcgcgggt tctgacctg ctcaaacgc gcccggtatc 37380
 gaccacgtgc aggcggccgg ggcgccgatg gccgtgctca cggcctggca gtacctggtc 37440
 gacctcggcc acgaggtgcc gtctcctttc accggccagg tgcaccagcc ggtgccgatc 37500
 acgccgggga tgaccgtgct ggtcaacggg gccgccgggt gaggggcca tttcgcgggt 37560
 caattggcga aatggaagg ggcacacgtc atcgcgggtg cctcaagtgc gcacgagcgg 37620
 ttctgcgcg agctcgggtc cgatgagttc atcgactaca ccacgacgca ggccgcggac 37680
 gtggtcagcg gtgtcgacct ggtgatcgac accgtcggcg gcccgacgg ctccagcttc 37740
 ctgaccgtac tcaagcgcgg cggcaccctg ctcccgggtg tcttcgccga gtaccgccc 37800
 gaagagacgg cgagtctgga catcacggtc tcgaacattc aggtacgttc ccacggcccc 37860
 cagctcggcg agatcgggcg cctgttcgac gagggcacac tccgggtcgg ggtggacagc 37920

ES 2 703 433 T3

acctaccgc tgtccgaagc ggtcagcgc cacacgcgag ccgcgaggg ccacatccaa 37980
 ggcaagatcg tgctgacggt ggcctcgtga tcgccgaaac tccagcaggg ggtggcgaac 38040
 tacgcccacg ccttggacga gttgcatata cccgagctgg aaacggctct ggccgaagac 38100
 accacctgga ccgtcacgat gcccgacag gggatgctcg gcccctcgc cggacgcgcg 38160
 gccgcggcgg tgctcgactt catcttcac ccccggtca gctcggtag cgggtgccca 38220
 gaccggcccg ggacctcagc agttgcccag ccgaccgat gagcgcgggc gccgagttgc 38280
 ccgcgagcag ccgcggcgc atcttgacgg gcaggcccag tcgcgctgcc gcgtcggatt 38340
 cacgcccgtt tcctcgggtc gctgtcggcc aagtcagcgg tcattgtgcc acccgtccca 38400
 cttcggaaga 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 acgtcgggtgc 38640
 ggttcatgtc gatcacgagg acatcgctgg cggaatagtg ctcgtgcacc cagtcgtcgt 38700
 acccggccca aagcgtccgg tagtactcga cgagactttg gtccctgctc aagtcacgcc 38760
 cccgcagtcc gatgcggcgc agcaccgtct cgaagtcgc tctgagatac accatgagat 38820
 cgggtgcctt gcgatagggc aggcctcga tctcacgcat catctccgcg agcaaccct 38880
 cgtacacctg catctccagg gaactgatcc tgccgaggtc gtgattgact ttggcgaagt 38940
 accagtctc gtagatcgac ccgtcagga cgttgcgtc ctgttgtac gcctccttga 39000
 tcgcggcgaa tcgcgtctgc aagaagtaga gctggagaag gaaggatag cgcttcgccg 39060
 ctatctctc aggaccggcg gtgtagaaga gcggcaggat cgggttgtcc tccacgctct 39120
 cgtagaagac catgctcccc agctctttgg cgatcagctc ggccacgctt gtcttccga 39180
 tcccgatcat gccgcgacg cagatcactg ccatacctcg cttctttccc gggacaccgt 39240
 ccgcgggcgc gattccccgc caccggctct tccacggcac acgcaccgcc gcggagcgc 39300
 gtcgtggaag cgcaccaggc gcaggtagc agcctggcct ccgtcggacg accgaagcgg 39360
 catcatatcg gcacggaggg gtgttcgaat ctacgtgctc gtgccctgga tggaaagcgc 39420
 tggtagcaccg ggtagcggga tcatcggagg tgatcatgta gcgggtgggc ggaacgacgc 39480
 ggaacgacg agtggtggga caggggccac tgacgcacgt atccgcagcc gcgctggagt 39540
 cgcggacctc cacaggttca ctctcaccgg tgaccaagga aagatcgccc gcatgccagg 39600
 ctgcgccgct cctccccgga acagcgcgta caccgatcag gagaacgacg ccgcgacccc 39660
 gagcagcag ccgagcctgt gtggacgcgc aacgtgtcgg ttaccactcg acgaccagcc 39720
 ttgacacacc gcgcgtcgcg aggcctccc gccatacag ggcctcgtcc cccggtgcga 39780

ES 2 703 433 T3

gtcgcaggcc ggggaagcgc tgccacaagc gggtcagcgc gatcttcac tggagaagaa 39840
 ccagtggcgc gcccatgcac cgggtggcgc cgtgtccgaa tgtgaggtgt gcaggccggc 39900
 gggcgctgct ctctgcaccc gatgtgcaaa atacttcggc gtcattgattg ccgtgcagca 39960
 acgagacgat gacggcctct ccttggcgca ccgtcgtccc gcccaggaca aggtcctcga 40020
 tggccactcg gggaaaactg ataggtgtgg acggcgtctt gcggagcagc tcctcaacca 40080
 gatcctccac ggattgcccg tcgagcgcgt caccgggtgag cagttcgagt atggcaaggc 40140
 tcaattgatg ggcgggtggc tcgtaaccgg ccatgagaag tgccagtccg aggttgatca 40200
 actcgatgcy ggatatctca cccgactgct caaccgcac cagcgcgctc aggagatcct 40260
 gcccgggcgc atccctcttt ctttcgatca gtgaggacat gtacttgata agagttagga 40320
 tatggcggcc tcttctgcgg gttccctgag gcgtcatgtc gaacagcgc gtcacggcgg 40380
 cgtcgaaaac gggccgctcc gccgcggca cgcgcgagcag tgagctcaac gcgaccatgg 40440
 gaaggggca agcataaccg ctgaccaggc cggcgcctgg ccccgcaacc tgtagccgat 40500
 ccagcagtc gtcggcggcc tcctcgatca ccgctgcctg tcgggtgact 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 gatcgaagt gccggacatg gtcgattact 40860
 cctgttcggg cggaaacgcc gcggggtgtc tgtctcccct gccgccgacg gccgtgggag 40920
 acgacccatc ggggtggcggc cgggtcgggc gagcgggctt tttccaccgc ccggaaggcg 40980
 gcccgctgtt cggctctgcac gctgttcggg ctgccggct tcggcggaca gaccggcttt 41040
 ggcggacaga ccggctgccg gatgttcgtc acgtagcgcg cacggtgtgt tcctgcctc 41100
 tcagcgcac cgcctctgc ggctgacgc gttggacgcc tgtggtctca gccgagcgtg 41160
 ggcaccgaac tgcgtcggcc cgtcgacctg cgtctctgcgg gacaggacga ggtcccggag 41220
 tcgctgtggc agggcgtcgt caaagcggag gtggtccggc accgtgacgc cggcgttgcg 41280
 cagcggcgtc gcgatctcgc ggcagggtgt gctgagccag ttgaggaccg cgggatctcc 41340
 cgagcggccc gcgaccggcg tccagggtgg cacttcggc tgccggaggc cggcgtcgag 41400
 gaacgtccgg gtgaggcggg ggcgaagt cgggacggcg ccggccgcca ggaaggggccc 41460
 gggccacagc gcgtagtact cgtcccactc cggcagcggc ggacgtgacg gcgacgtgtt 41520
 ggtgaagtcc atctcgtgca tgacgacgat cccgtccggg ttcagcaggg acgtcagacg 41580
 gcgcagtgcy gatgcgggat cgggcaggta catcaggatg tacctgccga ccaggacgtc 41640
 gaacttcac tggccagggtga agtcggccag gtccgcggct tcgtaccgca ccgagtcggc 41700

ES 2 703 433 T3

gagccccgcc tcctgtgcca ggatccgcgc cttgtggacg gttccgggggt cgcgctcgat 41760
tcccacgacg tgtccgccgg gcccgaccag ttggggcggcc agcagagaga cgtatcccag 41820
tccggcaccg atgtcgagga cgctcatccc cggacgtact ccggccgacc gcaggggtgcg 41880
ttcgggtgaac ggcgagatcg cctcgttctg aagggtcagc ctttgggtgct cgctatcggga 41940
gtaaccgagc aggtatgcgt cgtgcgccat gcgaggcctc cagggccgggt cgtgcgggga 42000
gttccccacg gcaggtggcc agggggctcc gcggtgtctg gagcactgag tgccctgtag 42060
cggccgtgcg gtgtgggtccg gtgttccggg tatgtcacgc accggagcgg gacatgtacg 42120
tgtccgaagg cggcggggcgg cgcagagcct tgccgctgga ggtgcgtgcg atcccgcgc 42180
gccgcacgaa ctcgatcgtg tcgggtgtga tgcccagctc ggccaccaca cgtgcgcgga 42240
tgtgttgctg cgtggcacga cggctcgcct cgtcgtgccg cgtcgtctcg acgacgagcc 42300
cgaggcggcc tccctcgtcg ctccagatct gctcggccag gacgccgtgg acgaggaggc 42360
cgggtgtgtc ccgcaacgacc gcctcgatgt cgctcgcaca gtggttcgcg ccgaagacga 42420
tgatcacctc tttcgtgctg cccacgatgt acagctcgcc gtcgtgccac agggcccagg 42480
caccggtcgc caaccagccg cccggaagga ggacgcgacg gctctcttcg ggggtggcgg 42540
cgtaccgggt gctcgtgacg gacgcccccc ggacctcgac ggccgccacc gtgccgggca 42600
cggccgggtg gccgctcgcg gtggtgagcc ggacctcgg acgccgcacc ggcgttccca 42660
cactgaccag ttcgcgacac ggcccggcgc cggacggcac cggtagctaa cggccccgg 42720
tcagttcgtc ccggtcggca cgcagcacct tggccggggc gccgagggga gggaaaggcga 42780
ccgccagggt cgctccgcc agtccgtagg ccggcaggaa gacgttctcg gacagtccgg 42840
cgggcgcgaa acgctcggcg aaggcgtcct gaagccgccg gtcgaccggc tcgggcgccg 42900
tcaccgcgat gcgccagcgg gagagatcga ggccggccgg cggcgcccg tgcgcctca 42960
ggacgtagcg gtagccggag tcaggagcca tggtagagg cgtcccccagc cgtcccatgg 43020
cccggatcca gtcaccggga ctgcgcaggt agtcctccgg tgtcagcaga tggatgtcga 43080
cgtcgtgcag cagcgggtgtc aagaaggaac cgatcaggcc catgtcgtgg aagaggggca 43140
gccaggtgca gccgacgtcg gtcctggcga gccgtgtgcc atgggcgatg gccgccaccc 43200
cggccgccac gttgccgtgg ctgagcacga cgtcccgcgg ttcgctgctc gtgcccgacg 43260
tgtactgaac gacggccggg tccgacgccg cccgcgcgac gtgggcccgg gacggctcgg 43320
ccacctccgg caccaggagt acgtcgaccg ggcggggcgc gtcggacagt ccaggaccga 43380
gcagcggggc catggccgga gccgtcagca cgggtccgtac ccgagagcgg cgcagggccg 43440
cggaggtgcg ccggagatag gcgtcggacg acccgaaggg cgcgggaccg ggcagcggca 43500
ccgcgaccgc gcccgccgcc agcacgccga agaaggcgcg cgcgaagtcc accgacgtcg 43560

ES 2 703 433 T3

gcaggacgag ggcgacccgc tcgccgggtc gcaccccgcg cgacagcagc cccgcggcca 43620
 cccgcccggc ctcggcgaag aggtcgtctg aggacagcgc gtcgccgtcc tggccccggc 43680
 gcagcacgtg catgccccgt ccggagcctt gtgcggcgac gcggccgagc gcggcgaaca 43740
 gggtcacgac agcggttccg tgccggcctc cgcgatcacc ttggtgatcg cggcccgaa 43800
 ctcccgcacg gtgctcgtct cgaagacgat gcggtcctcc acctcgtatg cgtagtgctg 43860
 ctcgatctcc agcacgatct ggagcgcgtg gatcagatcg aagcgcggca aggagcgcag 43920
 atcgggtgtcc 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
 catgcccggc ggggtgctta cgccttgct acggtccgcg agccagatgt aggccatgcg 44340
 cagcgcggcg gcctgatggg ccggatcgtc gtcgcacagt tcccgcataga agacggagaa 44400
 cgcacggcag tgccgggcct cgtcgcgggc caggagccgc cagattctgc ggatcaccgg 44460
 ctccgacaca tgggcggcga gcgccttgta gagggcggac gcgcgtgact ccgagatcac 44520
 gttcatcatg aggggtggcg agcgcacgtc gccctgcgga tacggctctc gtttgtagag 44580
 cgcgtgcttc gaacggagtg agaccccgat ccggtccagg tagcgggcct ggaccagtga 44640
 gtgccgggat tcctccgcac cccattgcag tgcccaggag gagaagctga cctcgtcctg 44700
 ccattcccgc aggaagtgtg gagcgcgggg tagggtgccg aactcgtatga cggccgcctc 44760
 ggtgaggaag tccacggtcc gttcgtcagag catgccgtgc tcgatgcggt ccagggtccac 44820
 ctcgggtccag tcccagcgcg tcgtctcgaa ccagtcgaag atcttgttga aggtcatgtc 44880
 gaggtagtag tcggtgtaga ggtcgtccgt catcagcgcg cgggtgcgcc gcagggccag 44940
 ttcgaccgag gtggtgaacc cttcgggcgc caccgcggcg ggccggacga tgtcctcagc 45000
 gtccagtgtc tccgcccagc cgggaaccgg gcccgccgta tcggggcccga cgacgtacac 45060
 ccgggtccgg ttgaacttcg agtgcgaccg cagcgcggcg acggcgggca gcggctcggc 45120
 gtcggccccg atccacaccg ccgcgagctc ggatgacggt tcgaactcgt gcaggtagcg 45180
 gtgccagtcg gcgtgtgccg gccgggtccac ggtgacgtcg ccgaaggcgg ggacgggtgag 45240
 cctttcggcg ggggagactg cggtggtggg tgccagcagg gcgatggtgt gcggggggcac 45300
 ggagggcgtc ctctctgtcg gtctgcgcag gccgtcggcg agcaccttgc cgcgcgttgt 45360
 gtggggctcg gctccgtaac acgtgcgtgc cgcgacgtca gagccgcccg tactccggcg 45420
 cagggccgag gagtacgggc agcgcctoga tgctgttgct gacgaacgag ggcacgggcc 45480

ES 2 703 433 T3

gcacggtcca cgtgtcggac ggggccagcc gcacgtcggg gaaccgggtg aagaatccgg 45540
ccagtgccgt ctccagctgg agacggggcca ggtgtgtccc gatacagaag tgcggggccgt 45600
gcccgaagcc gaggtggccg gcctgccgcc ggcggacgtc gaagaggtcc gcgtccggcc 45660
cgtggtgcgc cgggtcccgg cccgccgagc cgaaggacgc gaggatggct tctccccggt 45720
ggatcgtctg gccggcgatg acgacgtcct cggtcgggta gcgcatcggg aactggttca 45780
ccgcgccgtt ccagcgcacg gtctcctcga ccaccgcact ccacgggacc tccccggcgc 45840
gggdcggaggc cagttgctcg ggggtgggtga gcagcgcgtg gcaggcgttg acgagtacgt 45900
tgatgacgct ctggtggccg gcgaagaaca tcagcaggat catgccgtgc agttcgctgt 45960
cggtagaccg gtcgtctccg tcctggcgtg ccgtgagcag gacgctgatg aggtcgtccc 46020
gggggacgtc gcgacgttcg gcgacgatct cccggagcag cgcttcgatc cgtccgtcga 46080
tctcctggac ctgttcgggg gagttgttcg tacgggtctg catgccgggtg agcacgtgca 46140
gcagacgccg cttgcgctgc gggatcccca gcaggtccga gatgacgggtg gtggggatgg 46200
ggtaggcgaa agccttgccg agatccaccg gccggctctc cggccgtgtg gcgagctggt 46260
cgaggagccc gtcgacgagg cgttccacc cccgggcgat ggcctccacc cgttccgggg 46320
tcagtgcctg gtcgaccagt ccgcgcagcc gccggtgatc cgcgccgtgc gaattgatga 46380
cgctgtcggc cgcgacgaag cccatcaacg gccaccctgc cggcacttcg cccggggccg 46440
ctgcctccca gtgcgtgatt cccttggcga ccctgggatc cgtcagcact cggcgcaggt 46500
cctcgtggtg cggaatcgcc cacgcccga caccgccggg gagttggacc ggaacggctc 46560
tccccgccgc ccgcaggcgg gcgttctccg cgtgct 46596

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

<220>
<223> cebador

10 <400> 4
cagagaattc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtc 37

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

20 <220>
<223> cebador

<400> 5
gcgcatgcat gtgccgggtc cggtcgccga gccgcttg 39

25 <210> 6
<211> 40
<212> ADN

ES 2 703 433 T3

| | | |
|----|--|-----|
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| | <223> cebador | |
| 5 | <400> 6 | |
| | cctcatgcat ctggaggacg tcgcaggta attctgggcg | 40 |
| | <210> 7 | |
| 10 | <211> 33 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> cebador | |
| | <400> 7 | |
| | gggcaagctt ctctggctg agctgaaca tcg | 33 |
| 20 | <210> 8 | |
| | <211> 3994 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> Artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> Fragmento de ADN | |
| | <400> 8 | |
| | cagaggatcc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtcgtt gccgcgccgg cactcggact | 60 |
| | ctcgcagcct cacaacgctg ctggcccgcg cgggtgtacct cacgtcgcgg gcggtggacg | 120 |
| | acgcgctgga tctgctgaag gtcctgatcg cgacgaagct tgcagaccgg ctgcacatcc | 180 |
| | tggacggcgg tgctggacgc cacattcgaa aagcgcctgc tcaatacccg cccccaacgg | 240 |
| | agacgagggt gaacgacaag ctcagggcgt ctgagtactt cggttgagta gttctgcca | 300 |
| | tgtgaggggc agggccgtcg agacaggctg tgtacacaac gccgcggtgc gcagagcgt | 360 |
| | cggcgaagag accagtagcg gtcattatg aggggatact tcatgtcaa ggccttgtc | 420 |
| | gtctcgtcgc tcgccgtggc cgcagccgtc gttgccggca ccgtggtgtt cgtctcctcg | 480 |
| | gccgacgccg ctgtgccggc caagccggag atctcaaagg ccaccgcca ctacaccagt | 540 |
| | acggcccgtg ggagcgcctc gctcaccttc agcgcaccg tggccgaaa ctccggaatc | 600 |
| | aagagcctgc ggggtgctcg ctggccggcg agttcgggccc ttgcgcccac ggcgggag | 660 |
| | atgcgggatg tcgaggaagc cacgtgcaag gcgacttccg cgacggcctc ggtgtgcacc | 720 |
| | tacaccgtga agagctcggc caaggaagcc gccgcggtgc ccaagggcgt ctggcacgta | 780 |
| | tccgtgctgg ccaccgcaa ggaccacgac acgaccttcg cgcccccaagg cgccacgttc | 840 |
| | accgtcaagc actgacggct ccgccccgcc ggaatgatga tcgcggccccg cgcgcccggc | 900 |

ES 2 703 433 T3

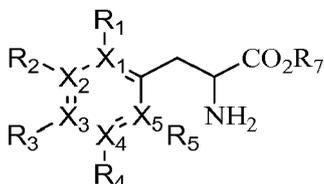
ggaccgtatc gcgacctcca ttggaccctgt tgaaccgcac gacgcggtga actccgcccc 960
 ccctgcccc a gggcggacgg agttcacctg ggggcgcagc cgcgcacatctg acgcgcgctg 1020
 ccacgatgcc gcaccactcc gcgcgcgggc ggatgcaggc gaagtgactc ccagctcgac 1080
 gcgctcgcca aacacggcat ctgcgcgcac tacatcttcg gcgagaagat cagcaccctgg 1140
 gcgcggggca gcccgaaagt cccggaggag gcgctgaggg cggcgcggga ggtcaaggcg 1200
 cacgccccac actgccgtgt catcttcacg gtgtacgagc ggaagcggct cggctcgcaac 1260
 gccgcccgaac tcaccgccct cgcgcaccac ctaccgcccc acggcttggc cctggagata 1320
 ttgcggggc cctgtcgaag gactcccgga gccgtggaac cggcgcacca cccgacgcga 1380
 cagcccgcag cggcagttgg ggcgctcccg cgcggcctgc ccggacaccg aaacgcccgg 1440
 caccacaagc gaaagagcgt ccgtcggcaa gctgacgggt cctcatgaag gatttaggcc 1500
 agtgatttgg gacacaccgc aacgcgcggc ccggatctga ggaatcgctt agggcccgtc 1560
 cctatcggga acttgaagcc gccctgccga gccaacgctt gactcgggtt ccggcgggtgc 1620
 ggatgacgat aatttccggc gagtctgccc aaaagggtac atagcggggc catagaaaac 1680
 tcttgcgagt gctgcgggtg gcttgtaggg tcctaatgaa tcggctggac aagggaaggc 1740
 tgatgcgggc gtccgaacca aaatagcttc ggacagcaac tgctgccttc tgtcgatgga 1800
 agtaggggga agttcgtgga aatcggctcg ggcgcgcccg aattaaccgc gtcgtcgggtg 1860
 tatcagcagc ggcgtgacca aatcgcgcga agcgtgccc cctatgtgcc cggcgcagccc 1920
 attccagagg tcgagtacac ggacgccgag cacgctctgt ggcgcctggt ttccaagcgg 1980
 ctgcgggacc ggcaccggca catgcatctg gaggacgtcg cagggaatt ctgggcgtcc 2040
 tgcgacgata catccattga aaaactaatg gcggttgata tatgaccggc ctgcgcagagc 2100
 aatcatccac tgcgcagcag agcccggaat cagaagtact ggacgtcacc ggaatcggat 2160
 tcggtgccgc gaatctcgcc ctggcgggtg cgcctccatga atccgaagcc gccgggaagg 2220
 cccttttctt ggagaagcag aaggaaatcg gctggcatcg ggggatgctc ctggggggct 2280
 cctcgtcca ggtgtccttt ctcaaggaca tcgccacgat gcgcaatccc accagtgatt 2340
 tcggattcct gtccatctc caggagaagg accggctggt cgacttcac caccagcaca 2400
 ccctgctgcc ctcccggatc gagtaccacg actacctcca gtgggcccgc gaccggctga 2460
 accacctggt cgagtacggc gtggaggcca ccggtgtgcg gccggtgacc gaagccgggtg 2520
 aggtcgtcgc gctcgacgtg ctgcggggg accgggtggt cgcgggacc agaaacctcg 2580
 tcctgcctc cggcctgcgc cccggctgc ccgagggcgc ggagaccggc gaacgcgtct 2640
 ggcacagctc ccagttgctg caccggctgc ccgcgttcga cgaacgccc cccgcgggg 2700
 ccgtcgtggt cggcgcggc cagagcgcgg ccgaggtcgc cgcgcacctc atggaccgct 2760

ES 2 703 433 T3

acccgcaggc cgaggtgtgc gcggtgttcg cccgctacgg ctacagcgtc gccgactcca 2820
 gcccgttcgc caaccgcgtc ttcgaccgcg cgcgctgga cgacttctac ttcgccccgc 2880
 ccgaggtcaa gcaggccatc atgcgctacc acggcggcac caactacgcc gtcgtcgacg 2940
 aggacgtcct ccagggcctc taccgcccgc agtacgagca gaaggtgtcc ggcgccccgc 3000
 ggctgcgggt gatgaacgcc tcccgcctgg tgtccgtcga accgcgccag gaatccgccc 3060
 ccgtacgcgt ggagttcctg cccacgggcg aacacaccga cctggacgcc gacctggtcg 3120
 tgtacgccac cgggtacgac tccaccgacc cggccgaact gctcggcggc gtctccggcg 3180
 ccctccgccc ggacgagggc ggggagttgc tgatcggccc cgactaccgg ctccggcacca 3240
 ccggggattt ccggtgcggc atctacgtcc agggcgccac cgaggcgacc cacggcatcg 3300
 cctccaccct gctgtccatg gtggcgtcc gcgcgggcca gatcgcccgg tcgatcaccg 3360
 gcggcccgtg cgaccgagac cgctccaccg gaagcaaggc agcagcgggg aacaggggct 3420
 gaagtgtacg aacgtccgct gtaccgggag gattgcgacg gcgtcgtcct ggcgtttctg 3480
 cgacacaacc cactggcaat ggtcgtcacc tcgcacgacg acgtcccggg ggccaccac 3540
 gcgccggtgc tgttccggca cggaccgac ggcgccgacg ccgaggccgt cgccgcgggc 3600
 accgtcccgc tcgccggctc caccctgatc ggccacatga acgtcgagaa cccgcagtgg 3660
 cgccggatgc gctccggcga ccgggcgctc atcgtcttcc agggcccga cggctatgtc 3720
 tcgccgacgg tctacggggt cacgcccgcg gccccacct gggacttcat cgccgtccac 3780
 gtgaacggca cagtggagcc caccgcccac cccgccgccc tgctggacat cgtctccgac 3840
 accgcccggc ggctggagt cggcttcggg cgcggctggg accaggagt ctcctcgcac 3900
 tacttccgcc agatcgcgcc cggcgtgggc gccttacc ctcgggtcga ttccgtgcag 3960
 acgatgttca agctcagcca ggagtctaga gccc 3994

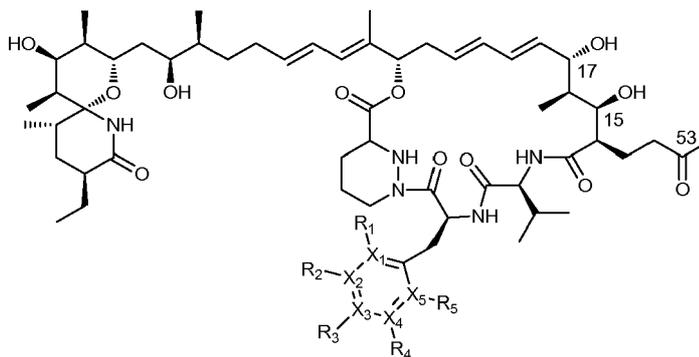
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una sangliferina mutasintética que comprende alimentar una bacteria que produce sangliferina, que es una *Streptomyces* sp en la que el gen *sfaA* o el homólogo del gen *sfaA* se inactiva o deleciona, un compuesto de fórmula (III)

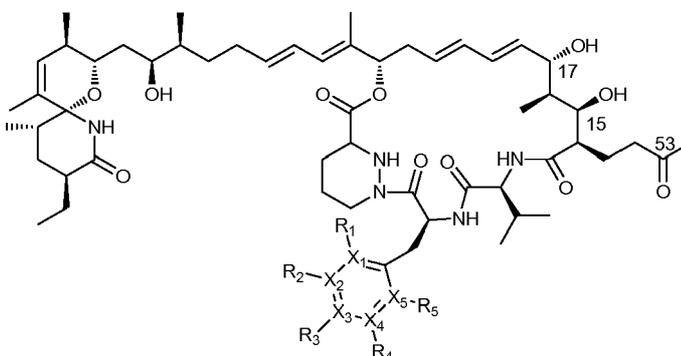


Fórmula (III)

en la que X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ se definen como R₁, R₂, R₃, R₄ y R₅ representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C₂₋₆ o alquilo C₁₋₁₀ en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en donde p representa 0, 1 ó 2 y en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por carbonilo y cuyo grupo alquilo puede sustituirse opcionalmente por uno o más átomos de halógeno; X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan independientemente C o N, y en el caso de que cualquiera de estos grupos represente N, el sustituyente unido está ausente; con la condición de que cuando R₁, R₃, R₄ y R₅ representan todos H y X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan todos C, entonces R₂ no puede representar OH; y R₇ representa H o un grupo formador de éster, o una sal del mismo, y cultivar la bacteria para producir un compuesto de sangliferina según la fórmula (I) o la fórmula (II) a continuación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



(I)



(II)

en la que:

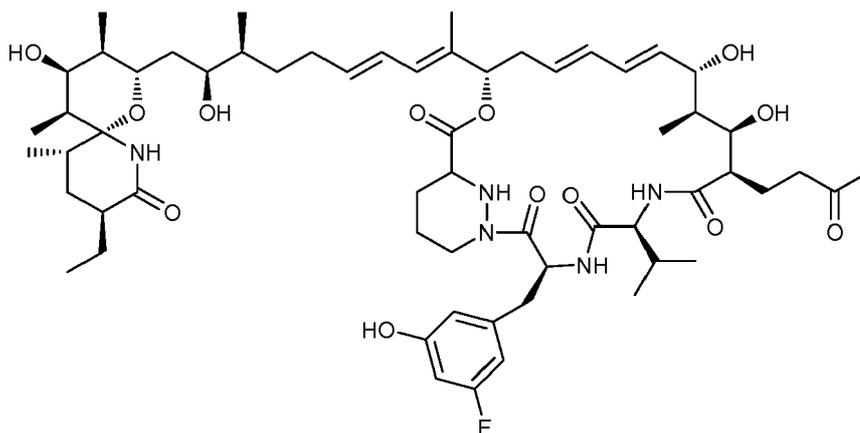
R₁, R₃, R₄ y R₅ representan independientemente H, F, Cl, Br, alqueno C₂₋₆ o alquilo C₁₋₁₀ en la que uno o más átomos de carbono de dicho grupo alquilo se reemplazan opcionalmente por un heteroátomo seleccionado de O, N y S(O)_p en donde p representa 0, 1 ó 2 y en la que el grupo alquilo puede sustituirse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

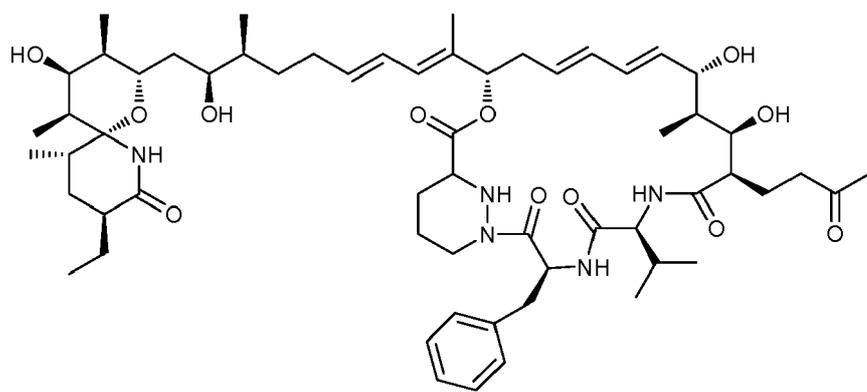
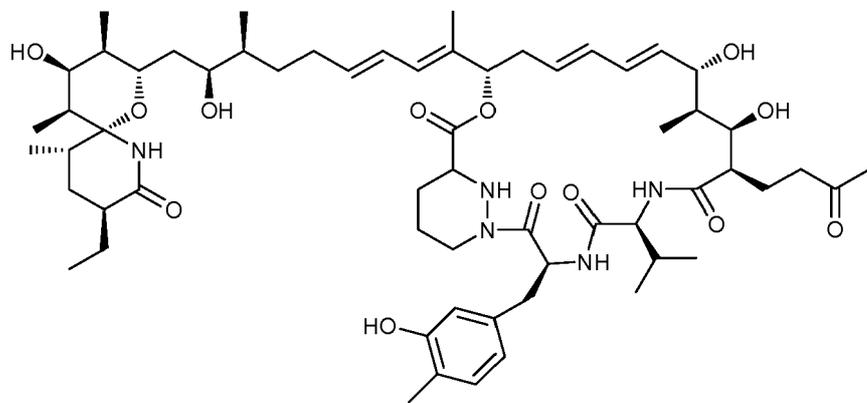
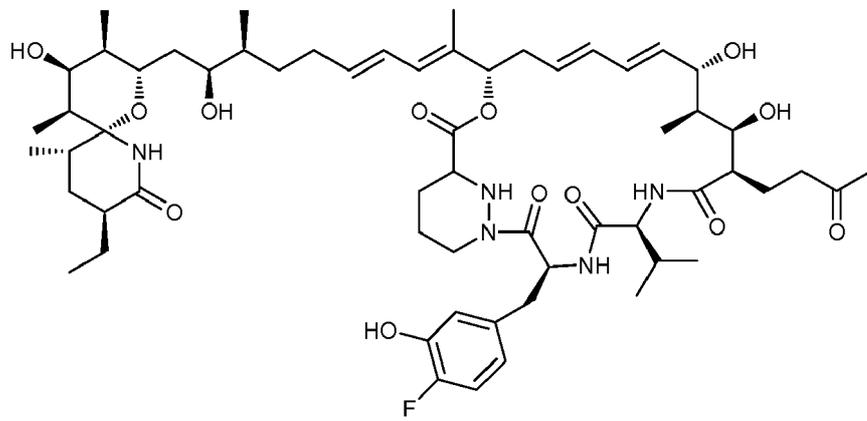
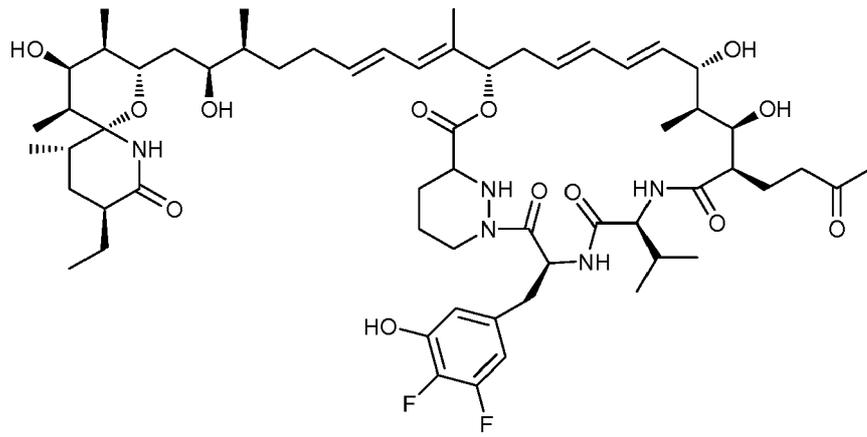
y en la que R₂ se selecciona de H, F, Cl, CF₃, OH, NH₂ y alquilo C₁₋₆;

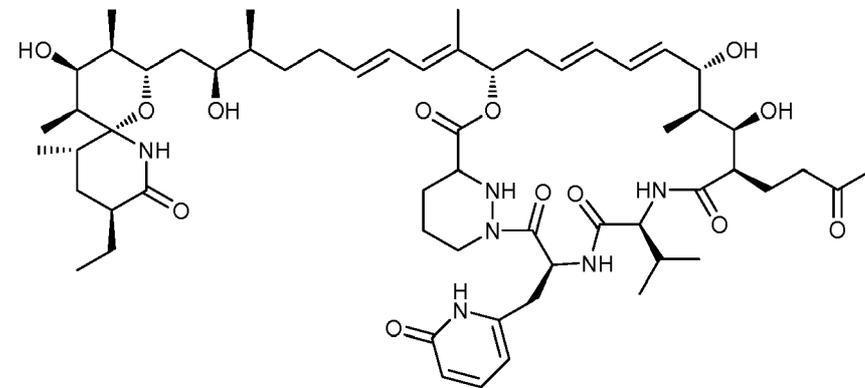
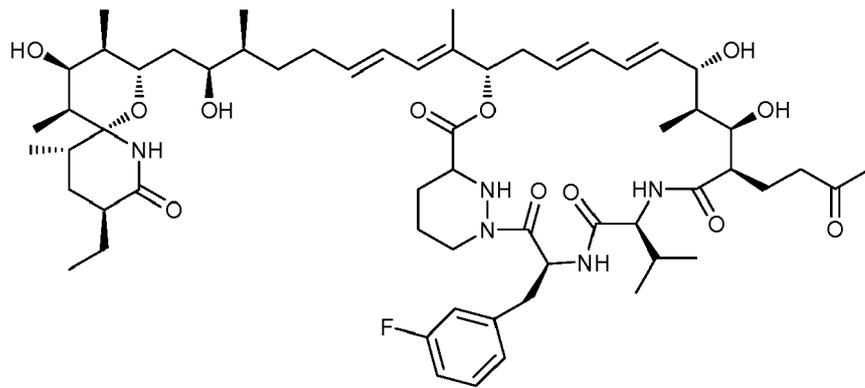
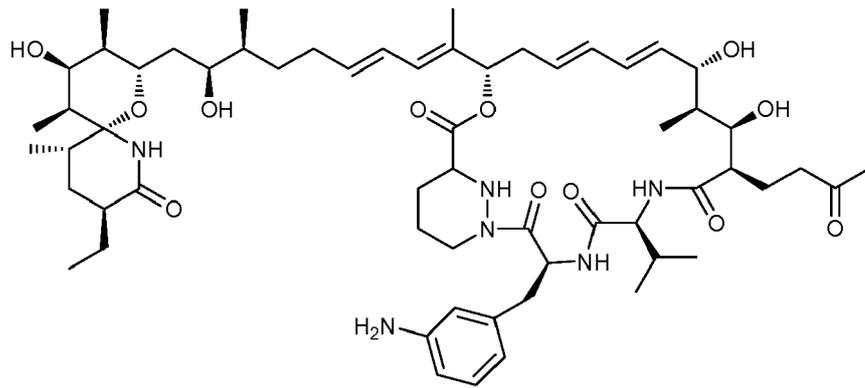
X₁, X₂, X₃, X₄ y X₅ representan independientemente C o N, y en el caso de que cualquiera de estos grupos represente N, el sustituyente unido está ausente;

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

- 5
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de aislar la sangliferina mutasintética.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X₁ representa C.
4. Procedimiento según las reivindicaciones 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X₂ representa C.
- 15 5. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X₃ representa C.
6. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X₄ representa C.
- 20 7. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que X₅ representa C.
- 25 8. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo en la que R₁, R₃, R₄ y R₅ se seleccionan independientemente de H, F, Cl, CF₃, OH y alquilo C₁₋₆.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) tal como se define en reivindicación 8 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que R₂ representa OH.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) seleccionado de:

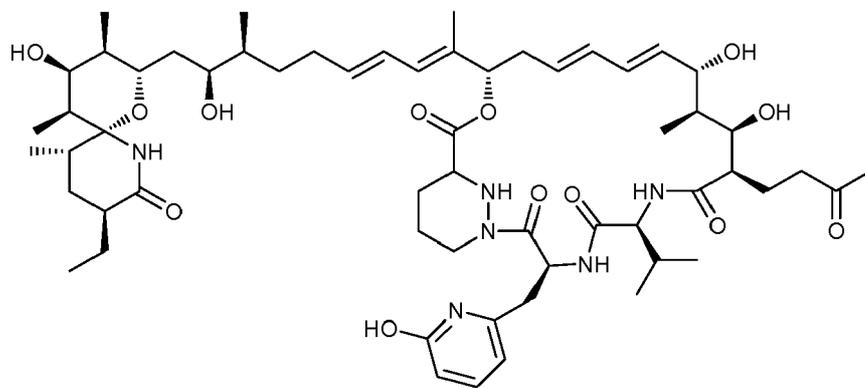




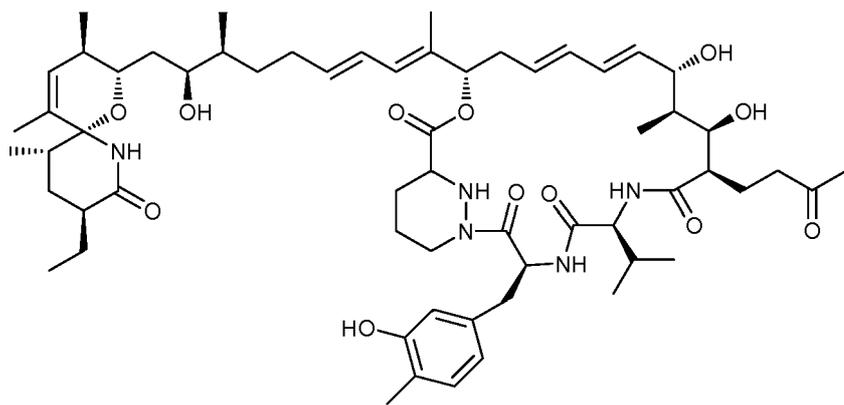
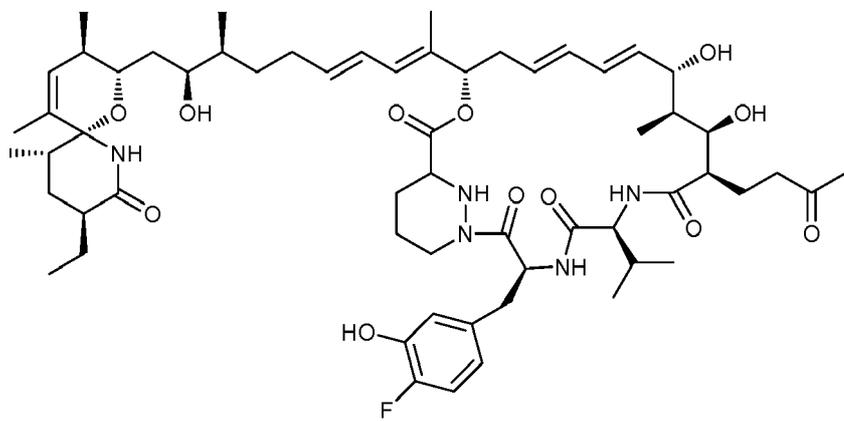
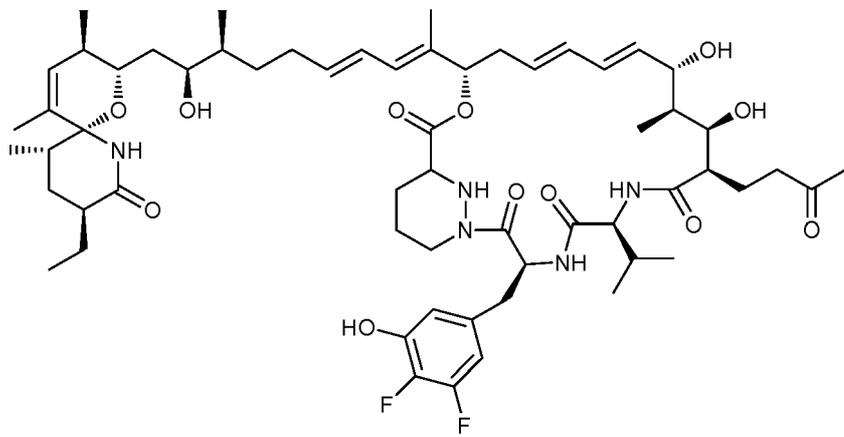
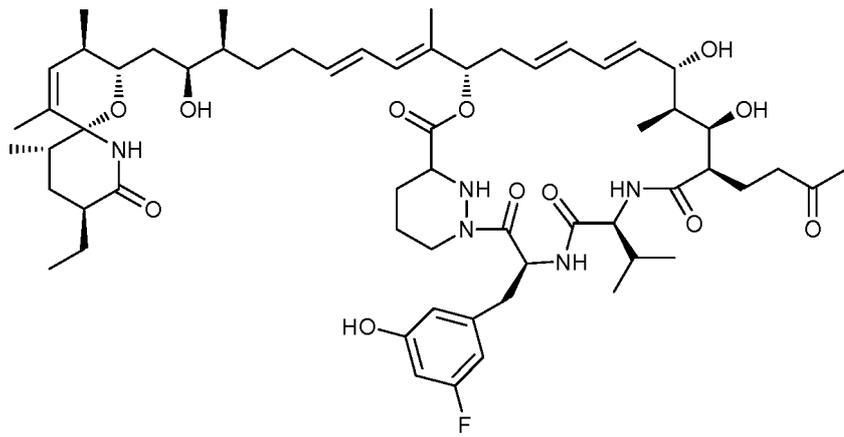


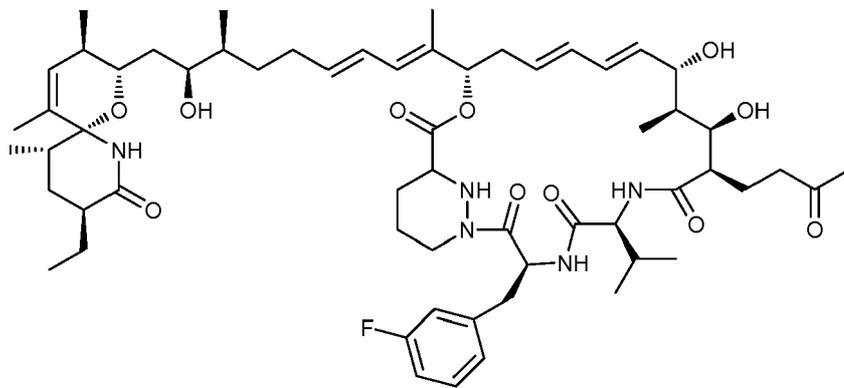
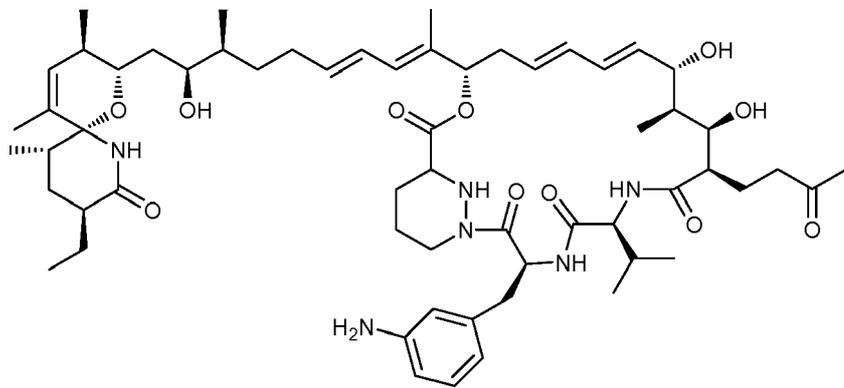
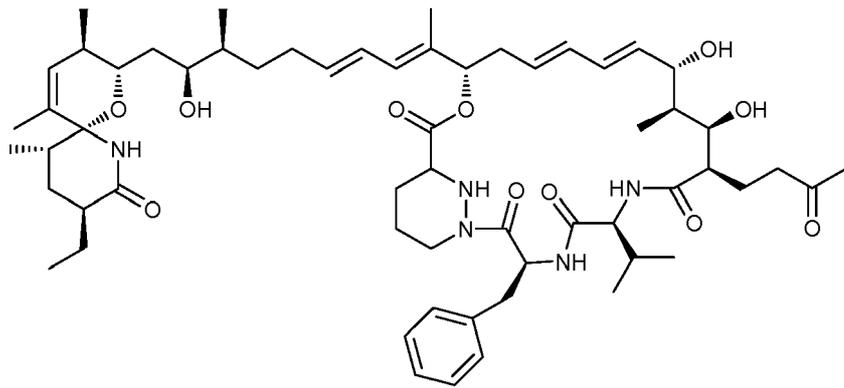
5

que también puede representarse como



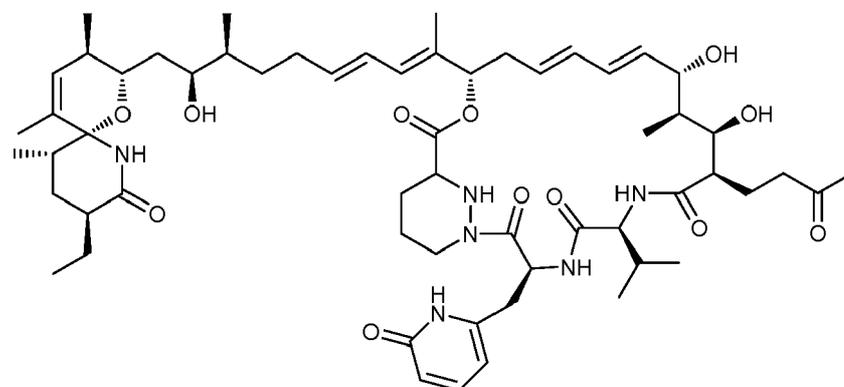
10





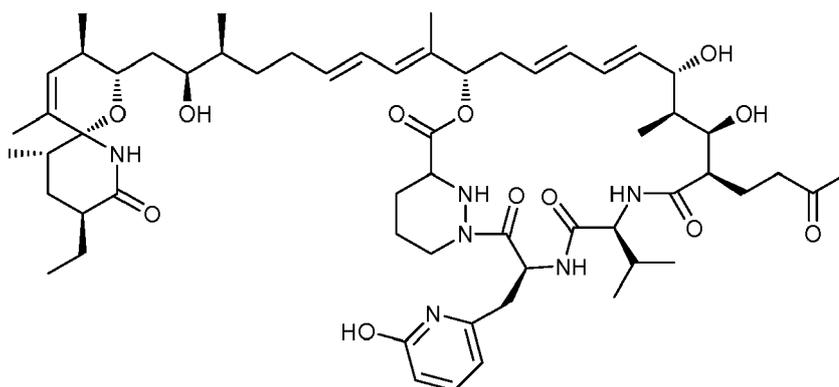
5

y



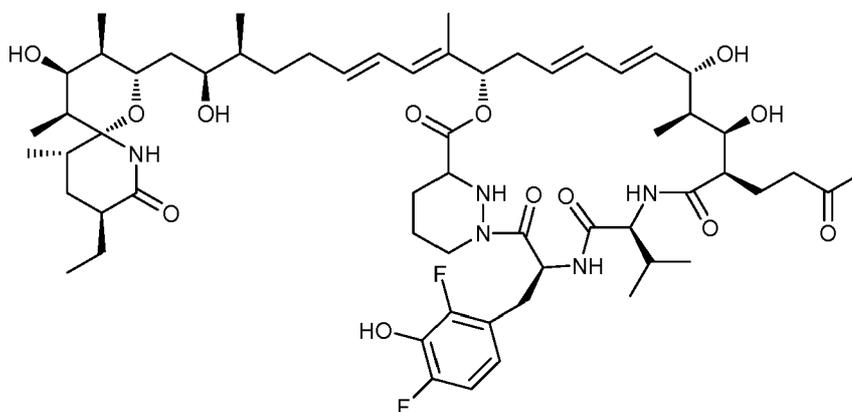
10

que también puede representarse como:



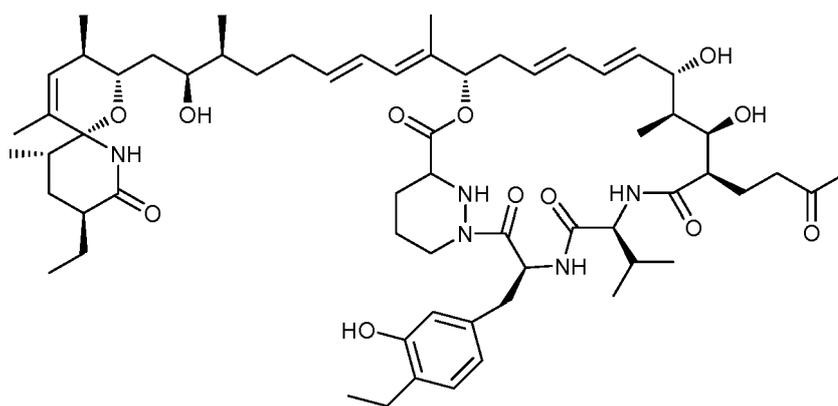
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 11. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de un compuesto según la fórmula (I) o la fórmula (II) seleccionado de:



y

10



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 15 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la preparación de un compuesto para su uso como producto farmacéutico.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la preparación de un compuesto para su uso como producto farmacéutico para el tratamiento de infecciones virales tales como infección por VHC o VIH o distrofia muscular.
- 20 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para la preparación de un compuesto para su uso como producto farmacéutico para el tratamiento de trastornos inflamatorios.

Figura 2

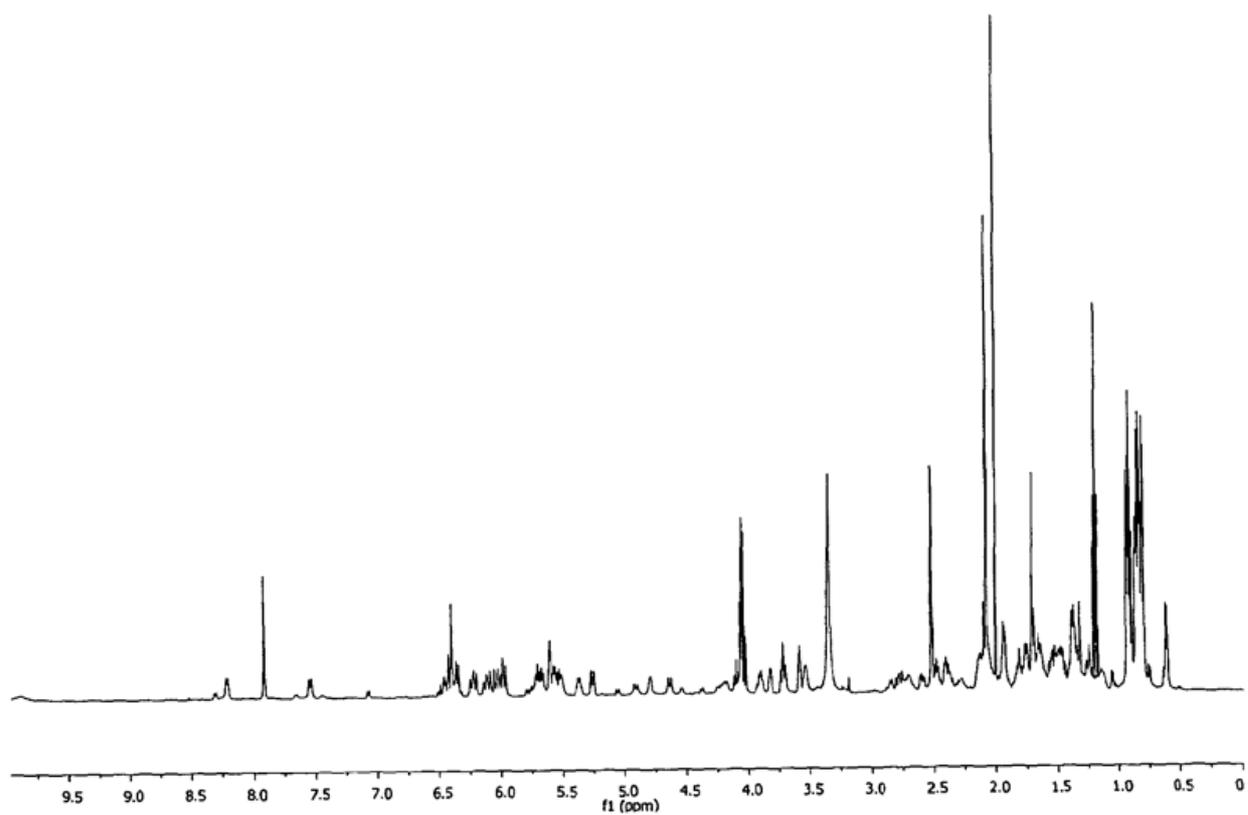


Figura 3

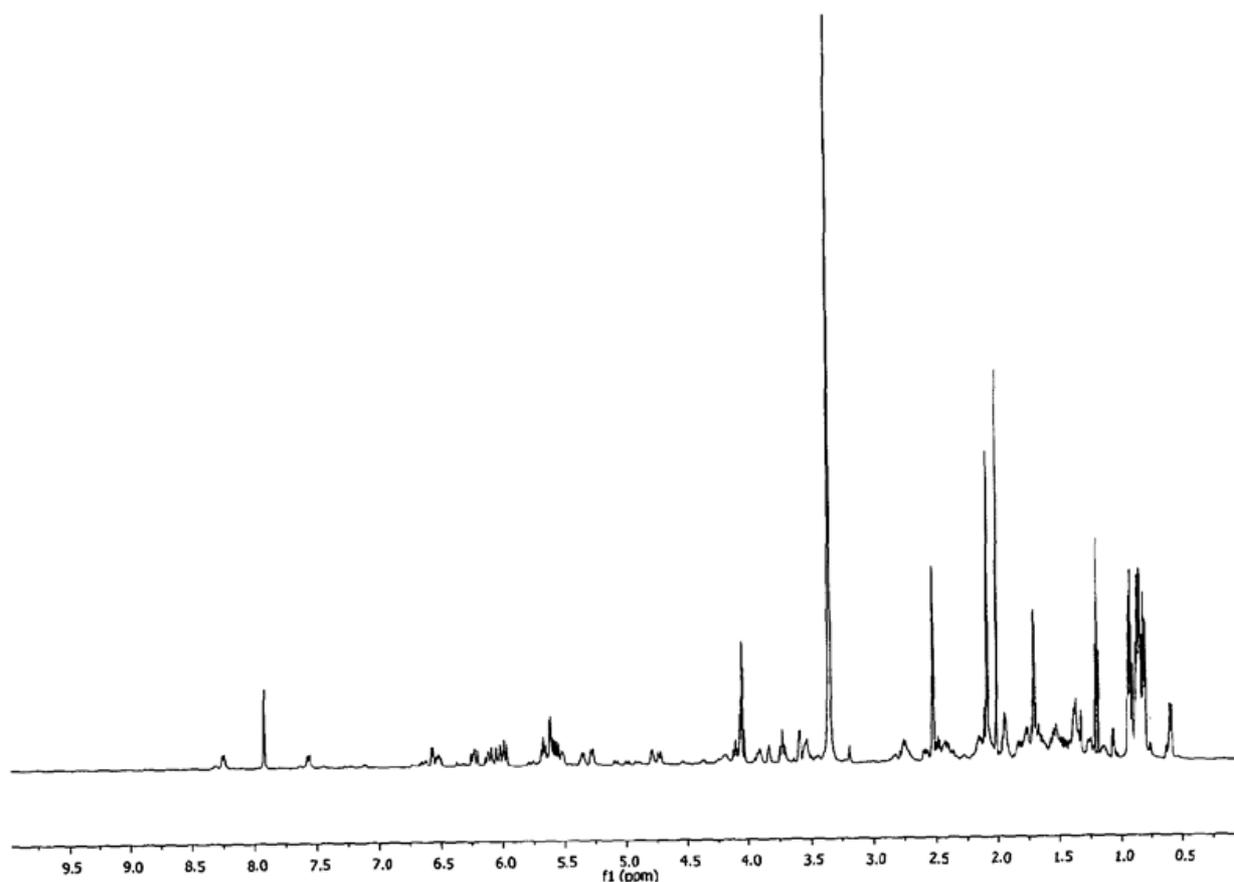


Figura 4

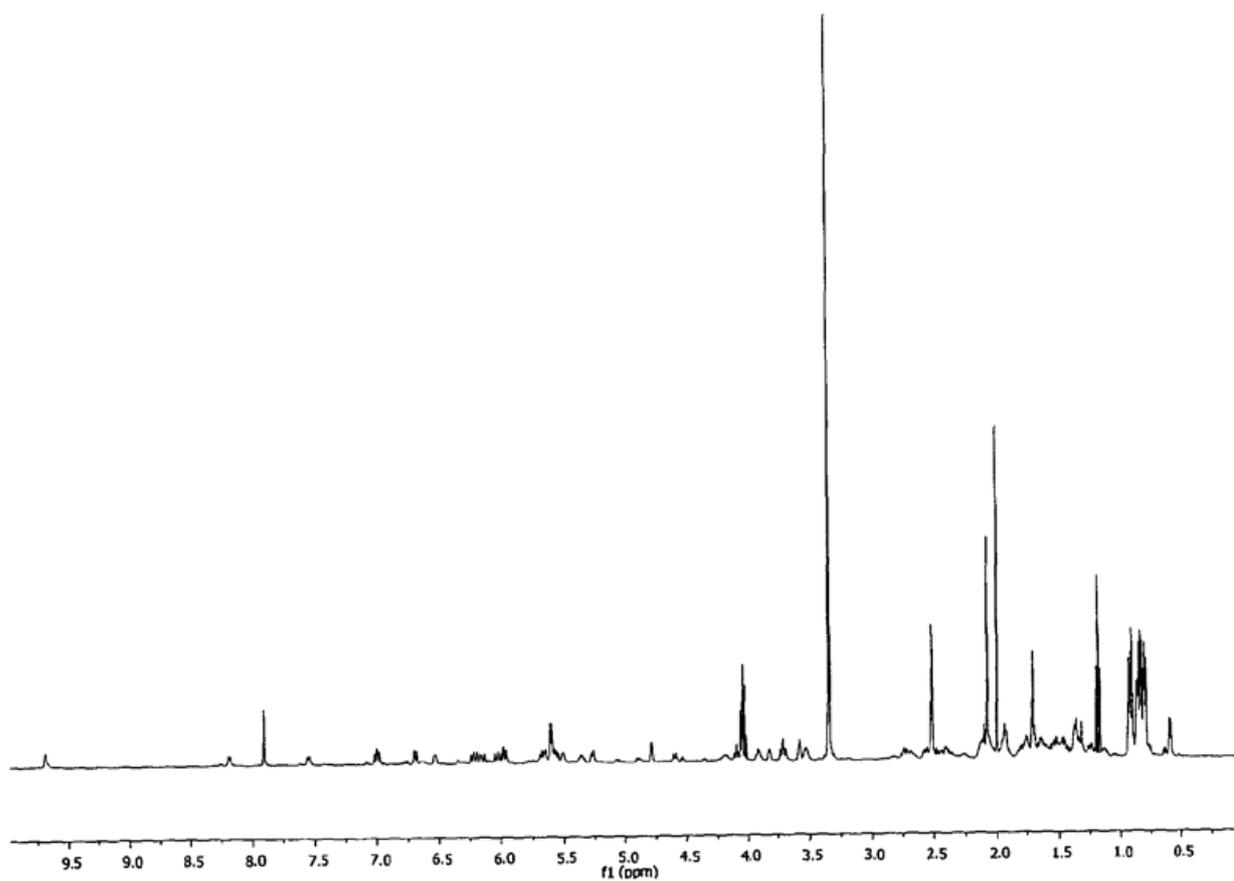


Figura 5

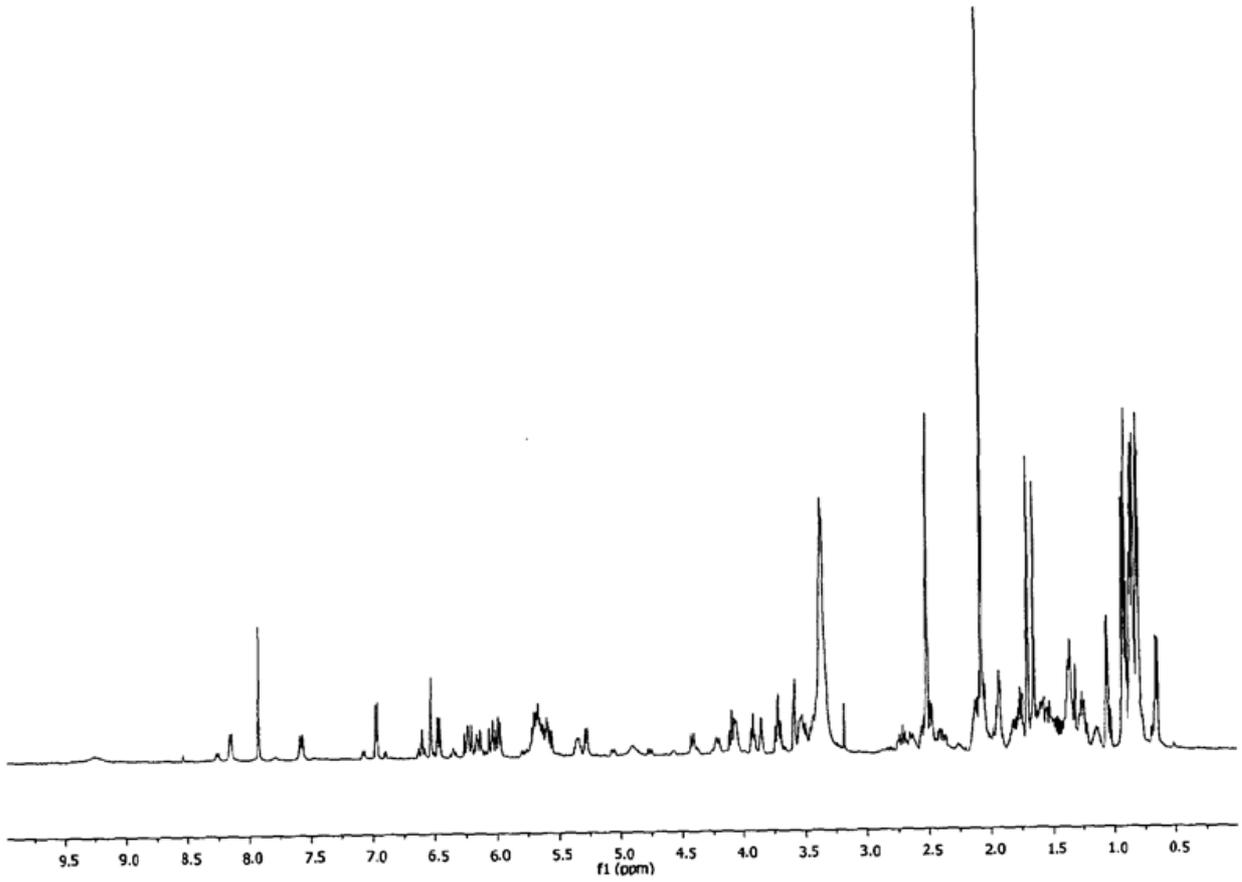


Figura 6

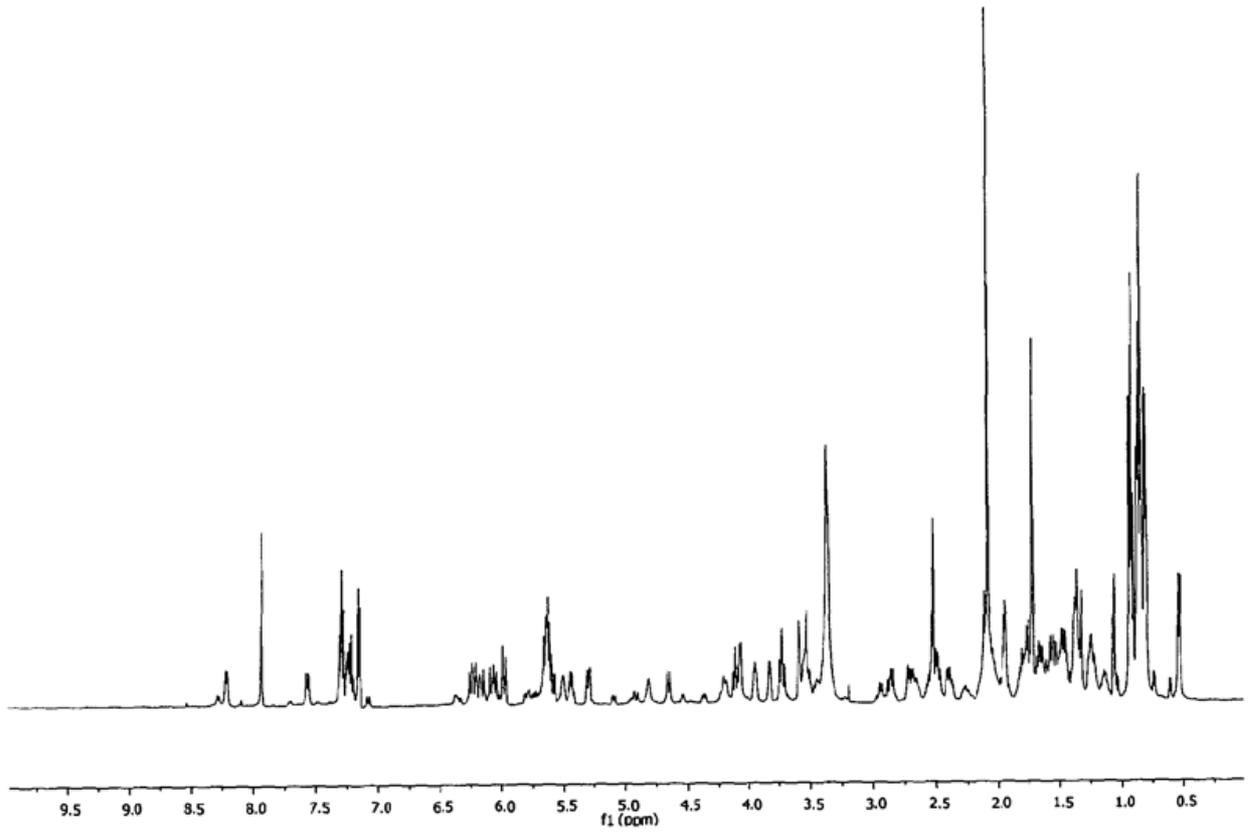


Figura 7

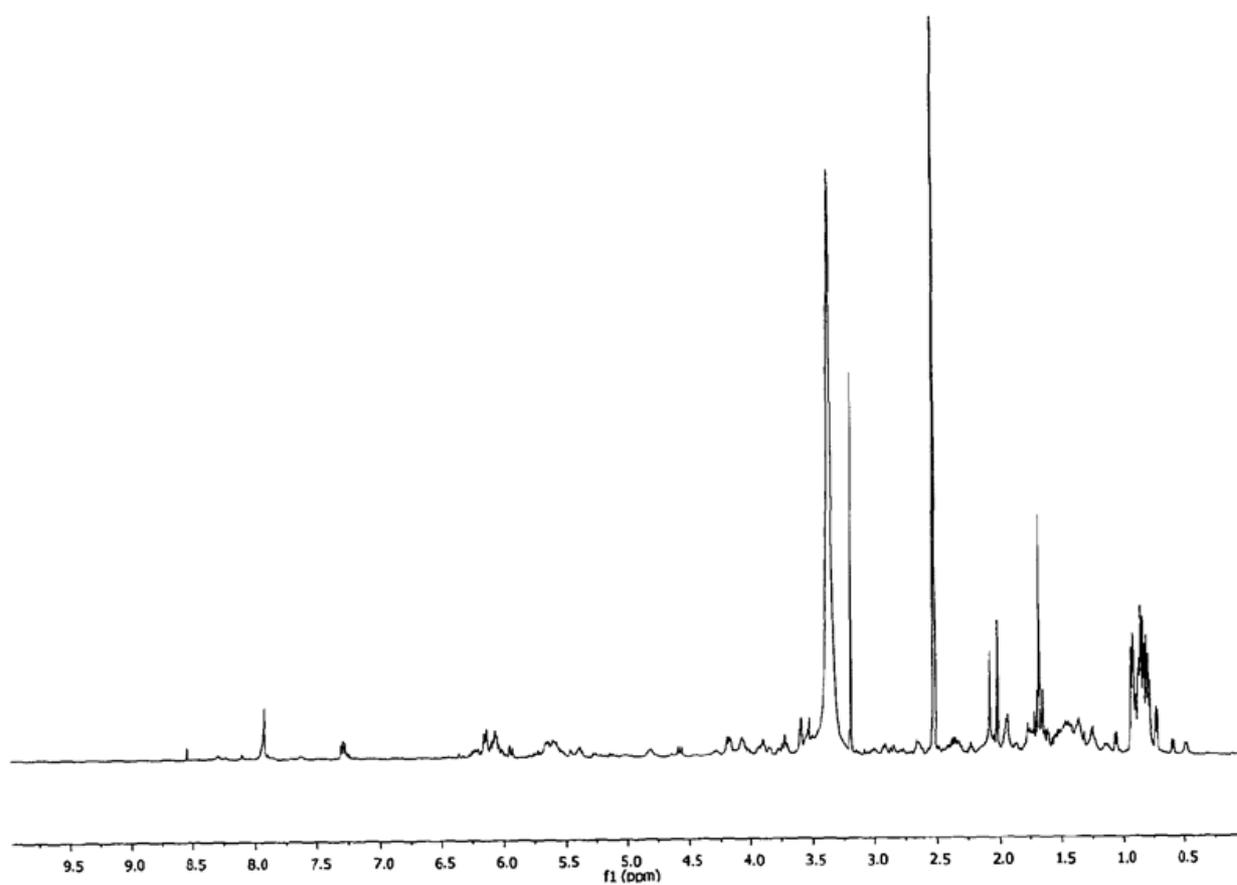


Figura 8

