



(12) **Oversettelse av  
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2691412 B1**

**NORGE**

(19) NO

(51) Int Cl.

*C07K 5/06 (2006.01)*

*A61P 31/12 (2006.01)*

*A61P 31/14 (2006.01)*

*A61P 31/18 (2006.01)*

*C07D 231/54 (2006.01)*

*C07D 498/04 (2006.01)*

*C07D 498/06 (2006.01)*

*C07K 5/065 (2006.01)*

**Patentstyret**

---

- (21) Oversettelse publisert 2015.05.25
- (80) Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet 2014.12.24
- (86) Europeisk søknadsnr 12716538.9
- (86) Europeisk innleveringsdag 2012.03.29
- (87) Den europeiske søknadens Publiseringsdato 2014.02.05
- (30) Prioritet 2011.03.29, GB, 201105293  
2011.08.08, GB, 201113629  
2012.02.07, GB, 201202060
- (84) Utpekte stater AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB  
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO  
PL PT RO RS SE SI SK SM TR
- (73) Innehaver Neurovive Pharmaceutical AB, Medicon Village Scheelevägen 2, 223 81 Lund, SE-Sverige
- (72) Oppfinner MOSS, Steven James, Biotica Technology Limited3 Riverside, Suite 5Granta ParkGreat Abington, Cambridge, Cambridgeshire CB21 6AD, GB-Storbritannia  
GREGORY, Matthew Alan, Biotica Technology Limited3 Riverside, Suite 5Granta ParkGreat Abington, Cambridge, Cambridgeshire CB21 6AD, GB-Storbritannia  
WILKINSON, Barrie, Biotica Technology Limited3 Riverside, Suite 5Granta ParkGreat Abington, Cambridge, Cambridgeshire CB21 6AD, GB-Storbritannia

- 
- (54) Benevnelse **MAKROSYKLISK FORBINDELSE OG FRAMGANGSMATER FOR Å PRODUSERE DEN**
- (56) Anførte publikasjoner WO-A1-2006/138507  
RICHARD SEDRANI ET AL: "Sanglifehrin-Cyclophilin Interaction: Degradation Work, Synthetic Macrocyclic Analogues, X-ray Crystal Structure, and Binding Data", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC; US, vol. 125, 2 April 2003 (2003-04-02), pages 3849-3859, XP002632408, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/JA021327Y [retrieved on 2003-03-06]

## MAKROSYKLISK FORBINDELSE OG FRAMGANGSMÅTER FOR Å PRODUSERE DEN

### 5 Innledning

Den foreliggende oppfinnelsen dreier seg om en sangliffehrinanalogue som kan brukes både som ciklosporinhemmer, f.eks. for å behandle virusinfeksjoner med slike virus som hepatitt C-virus (HCV), hepatitt B-virus (HBV) og humant immunsviktvirus (HIV) og/eller som immunsuppressivt middel, f.eks. til bruk ved forebygging av transplantatavvisning og som antiinflammatorisk middel, f.eks. til bruk ved inflammasjonslidelser. Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også forbindelsen til bruk i framgangsmåter i medisinen, spesielt for å behandle HCV- eller HIV-infeksjon og til bruk som immunsuppressivt middel eller antiinflammatorisk middel i sykdommer der det er nyttig å hemme mitokondriepermeabilitetsporene (mPTP), for eksempel muskeldystrofi, eller som mellomprodukt ved produksjon av andre medisinsk nyttige forbindelser.

### Bakgrunnen for oppfinnelsen

#### Hepatitt C

20 Hepatitt C-viruset (HCV) er et RNA-virus med positiv streng, og infeksjonen er en hovedårsak til hepatitt etter transfusjoner. HCV er den vanligste blodbårne infeksjonen, og den hyppigste dødsårsaken ved leversykdommer i USA. Verdens helseorganisasjon estimerer at det er mer enn 170 millioner kroniske bærere av HCV-infeksjonen, omtrent 3 % av verdensbefolkningen. Av ubehandlede HCV-  
25 infiserte pasienter utvikler ca. 70–85 % kronisk HCV-infeksjon og har derfor høy risiko for levercirrhose og hepatocellulært karsinom. I industriland skyldes 50–76 % av alle tilfeller av leverkreft og to tredeler av alle levertransplantasjoner kronisk HCV-infeksjon (Manns m.fl., 2007).

I tillegg til leversykdommer kan kronisk infiserte pasienter få andre  
30 kroniske HCV-relaterte sykdommer og kan også smitte andre. HCV-infeksjon gir også komplikasjoner i andre organer enn leveren, for eksempel leddsmerter, hudutslett og skade på indre organer, hovedsakelig nyrene. HCV-infeksjon er et

viktig globalt helseproblem og i dag finnes det ikke noen vaksine mot hepatitt C (Strader m.fl., 2004; Jacobson m.fl., 2007; Manns m.fl., 2007, Pawlotsky, 2005; Zeuzem og Hermann, 2002).

#### 5 Behandling av HCV

Dagens standardbehandling er subkutane injeksjoner av PEGylert interferon- $\alpha$  (pIFN $\alpha$ ) og orale doser av det antivirale midlet ribavirin i 24–48 uker. Vellykket behandling defineres om varig virologisk respons (VVR), som defineres som fravær av HCV-RNA i serum i slutten av behandlingsperioden og 6 måneder  
10 etterpå. Total responshyppighet på standardbehandlingen er hovedsakelig avhengig av genotype og konsentrasjonen av HCV-RNA før behandlingen. Pasienter med genotype 2 og 3 har høyere sannsynlighet for å respondere på standardbehandlingen enn pasienter som er infisert med genotype 1 (Melnikova, 2008; Jacobson m.fl., 2007).

15 Et vesentlig antall HCV-pasienter reagerer ikke tilstrekkelig på standardbehandlingen eller tåler ikke behandlingen på grunn av bivirkninger, noe som ofte gjør det vanskelig å gjennomføre den. Den totale kliniske SCR-hyppigheten ved standardbehandlingen er bare ca. 50 % (Melnikova, 2008). Utvikling av resistens er også en annen underliggende årsak til mislykket  
20 behandling (Jacobson m.fl., 2007). Standardbehandlingen er også kontraindisert for noen pasienter som ikke regnes som kandidater for behandlingen, for eksempel pasienter med tidligere vesentlige episoder med depresjon eller hjertesykdom. Bivirkningene ved standardbehandlingen, som ofte fører til at behandlingen avbrytes, er blant annet influensaliknende sykdom, feber,  
25 utmattelse, hematologiske sykdommer, anemi, leukopeni, trombocytopeni, alopeci og depresjon (Manns m.fl., 2007).

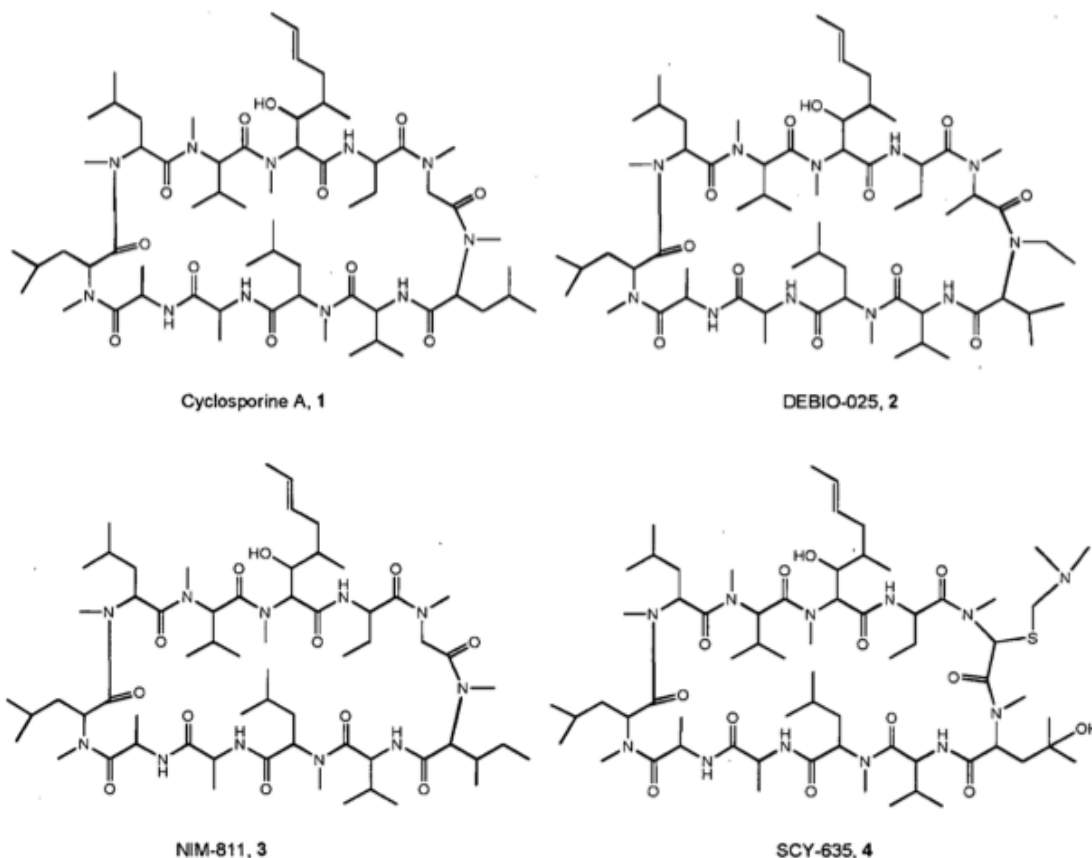
På grunn av bivirkningene ved langvarig behandling med standardbehandling, utvikling av resistens og den ikke optimale suksesshyppigheten, er det stort behov for mer effektiv og sikrere nye behandlinger mot HCV-infeksjon.  
30 Målene med de nye behandlingene er forbedret styrke, forbedret giftighetsprofil, forbedret resistensprofil, forbedret livskvalitet og den resulterende forbedringen av

pasientens etterlevelse. HCV har kort livssyklus og derfor er det vanlig at det utvikler resistens i løpet av legemiddelbehandlingen.

Det utvikles en ny, spesifikt målrettet antiviral behandling mot hepatitt C (STAT-C), også kjent som direktevirkende viruslegemidler (DAA), som angriper virusproteiner som virus-RNA-polymerase NS5B eller virusprotease NS3 (Jacobson m.fl., 2007; Parfieniuk m.fl., 2007). Dessuten utvikles det også nye forbindelser som i stedet for virusmål er rettet mot humane proteiner (f.eks. cyklofiliner), og kan ventes å redusere forekomsten av resistens i løpet av legemiddelbehandlingen (Manns m.fl., 2007; Pockros, 2008; Pawlotsky J-M, 2005).

#### Cyklofilinhemmere

Cyklofiliner (CyP) er en familie av celleproteiner som viser peptidyl-prolyl-*cis-trans*-isomeraseaktivitet som forenkler konformasjonsendringene og foldingen til proteinet. CyP er involvert i celleprosesser som regulering av transkriberingen, immunrespons, proteinutskilling og mitokondriefunksjonen. HCV-virus rekrutterer CyP til livssyklusen sin når den infiserer mennesker. Opprinnelig tenkte man at CyP stimulerer RNA-bindingsaktiviteten til det ikke-strukturelle HCV-proteinet NS5B-RNA-polymerase som fremmer RNA-replikeringen, men det er foreslått flere alternative hypoteser, blant annet et behov for CyP PPIase-aktivitet. Forskjellige isoformer av CyP, blant annet A og B, antas å være involvert i HCV-livssyklusen (Yang m.fl., 2008; Appel m.fl., 2006; Chatterji m.fl., 2009; Gaither m.fl., 2010). Muligheten til å deaktivere gener hos mus (Colgan m.fl., 2000) og humane T-celler (Braaten og Luban, 2001) tyder på at CyPA ikke er obligatorisk for cellevekst og overlevelse. Liknende resultater er observert når man forstyrrer CyPA-homologer i bakterier (Herrler m.fl., 1994), *Neurospora* (Tropschug m.fl., 1989) og *Saccharomyces cerevisiae* (Dolinski m.fl., 1997). Derfor er hemming av CyP et nytt og attraktivt mål i verten for behandling av HCV-infeksjon og et nytt mulig tillegg til dagens standardbehandling eller STAT-C/DAA-legemidler, for å øke SVR, hindre resistens og redusere bivirkningene av behandlingen.



Det er kjent at ciklosporin A (Inoue m.fl., 2003) («CsA») og de nært strukturelt beslektede ikke-immunsuppressive kliniske analogene av det, DEBIO-025 (Paeshuyse m.fl., 2006; Flisiak m.fl., 2008), NIM811 (Mathy m.fl., 2008) og SCY-635 (Hopkins m.fl., 2009) bindes til cyklofiliner, og har vist in vitro-effektivitet og klinisk effektivitet mot HCV-infeksjoner som cyklofilinhemmere (Crabbe m.fl., 2009, Flisiak m.fl., 2008; Mathy m.fl., 2008; Inoue m.fl., 2007; Ishii m.fl., 2006; Paeshuyse m.fl., 2006). Tidligere resistensstudier av CsA viste mutasjoner i NS5B RNA-polymerase hos HCV og tydet på at bare cyklofilin B ville være involvert i HCV-replikeringsprosessen (Robida m.fl., 2007), men nyere studier tyder på at cyklofilin A spiller en avgjørende rolle i HCV-replikeringen (Chatterji m.fl., 2009; Yang m.fl., 2008). Siden mutasjoner i virusproteinet NS5A også er forbundet med CsA-resistens og NS5A interagerer både med CyPA og CyPB i forbindelse med den spesifikke aktiviteten til peptidyl-prolyl-cis/trans-isomerasen (PPIase) deres, tyder det også på at begge cyklofilinene spiller en rolle i viruslivssyklusen (Hanoulle m.fl., 2009).

Ciklosporinanalogenes virkning mot HCV er uavhengig av den immunundertrykkende egenskapen, som er avhengig av kalsinevrin. Dette tydet på at det avgjørende kravet for HCV-aktivitet er CyP-binding, mens det ikke er behov for kalsineurinbinding. DEBIO-025, den mest klinisk avanserte cyklofilin-  
5 hemmeren for behandling av HCV, har vist virkning in vitro og in vivo mot de fire vanligste HCV-genotypene (genotype 1, 2, 3 og 4). Resistensstudier har vist at mutasjoner gir resistens mot DEBIO-025 var forskjellige fra mutasjonene som er rapportert for polymerase- og proteasehemmere, og at det ikke var noen kryssresistens med STAT-C/DAA-resistente virusreplikoner. Ikke minst hindret  
10 DEBIO-025 at det utviklet seg unnvikelsesmutasjoner som gir motstand både mot protease- og polymerasehemmere (Crabbe m.fl., 2009).

Imidlertid er det mange problemer med de CsA-baserte cyklofilinhemmerne i den kliniske utviklingen, og det antas at de er forbundet med den felles strukturklassen, inkludert: visse bivirkninger som kan føre til at behandlingen  
15 stoppes eller har begrenset de kliniske dosekonsentrasjonene, variabel farmakokinetikk som har gi variabel effektivitet, og økt risiko for legemiddelinteraksjoner som kan gi doseringsproblemer.

De vanligste bivirkningene hos pasienter som fikk DEBIO-025 var gulsott, magesmerter, oppkast, utmattelse og feber. De viktigste bivirkningene  
20 klinisk var hyperbilirubinemi og lavt blodplattetall (trombocytopeni). Peg-IFN kan gi sterk trombocytopeni og kombinert med DEBIO-025 kan det føre til et vesentlig klinisk problem. Både økt bilirubin og lavt blodplattetall er beskrevet i tidlige kliniske studier med NIM-811 (Ke m.fl., 2009). Hyperbilirubinemien som ble observert under kliniske studier av DEBIO-025 gikk tilbake etter behandlingsslutt, men var  
25 årsaken til at behandlingen ble avbrutt hos 4 av 16 pasienter, og til reduserte doser i framtidige forsøk. Siden den antivirale virkningen av cyklofilinhemmere er doserelatert ved HCV, gir lavere dose lavere antiviral virkning, og flere senere studier med CsA-baserte cyklofilinhemmere har vist ingen eller dårlig reduksjon av HCV-virusbelastning når de ble gitt som eneste behandling (Lawitz m.fl., 2009;  
30 Hopkins m.fl., 2009; Nelson m.fl., 2009). DEBIO-025 og ciklosporin A er kjent som hemmere av galletransportører som for eksempel gallesalteksportpumper og andre levertransportører (spesielt OAT1B1/OAT1B3/MRP2/MRP3/cMOAT/-

ABCC2) (Crabbe m.fl., 2009). Det er foreslått at interaksjonen med galletransportørene, spesielt MRP2, kan være årsaken til hyperbilirubinemia man ser ved høye doser av DEBIO-025 (Nelson m.fl., 2009, Wring m.fl., 2010). CsA-klasserelaterte legemiddelinteraksjoner ved hemming av andre legemiddel-  
5 transportører som P-glykoprotein (Pgp/MDR1), BSEP, OAT1B1 og OAT1B3 (Konig m.fl., 2010) kan også være et problem, som kan begrense visse kombinasjoner og anvendelser hos noen pasienter som behandles for andre samtidige infeksjoner som HIV (Seden m.fl., 2010).

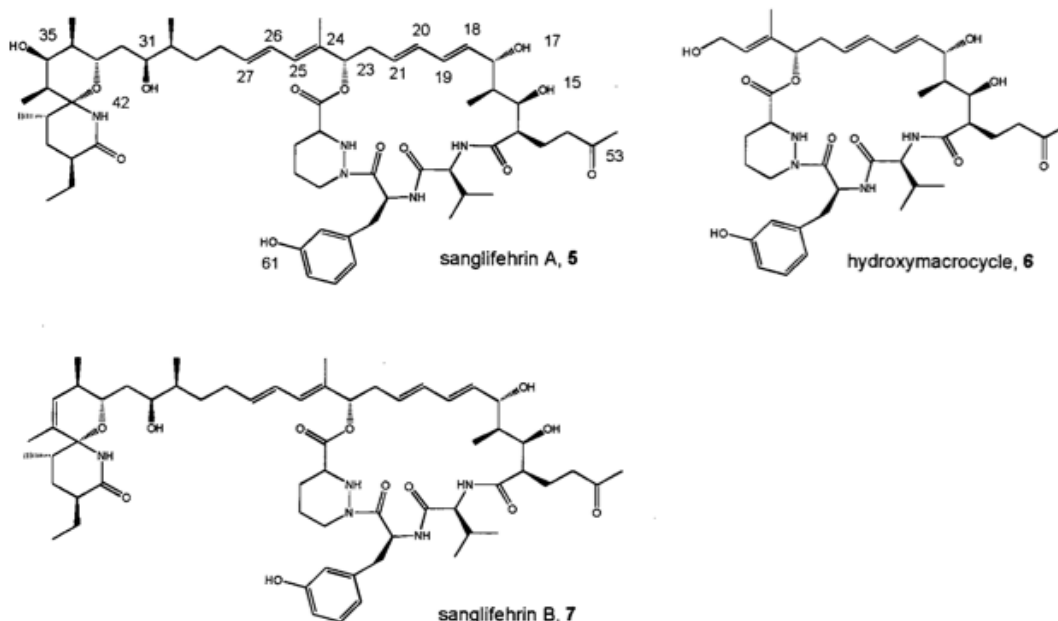
Dessuten er DEBIO-025 og ciklosporin A substrat for metabolisme  
10 med cytokrom P450 (spesielt CYP3A4) og er kjent for å være substrater for og hemmere av humant P-glykoprotein (MDR1) (Crabbe m.fl., 2009). Ciklosporin er også påvist å være en hemmer av CYP3A4 in vitro (Niwa m.fl., 2007). Dette tyder på at det kan være økt risiko for interaksjoner med andre legemidler som er substrater eller induktorer for eller hemmere av CYP3A4, for eksempel  
15 ketokonazol, cimetidin og rifampicin. Det ventes også interaksjoner med legemidler som transporteres av P-glykoprotein (f.eks. digoksin), noe som kan gi alvorlige legemiddelinteraksjoner hos HCV-pasienter som får legemiddelbehandling for andre samtidige sykdommer (Crabbe m.fl., 2009). Det er også kjent at CsA har svært variabel farmakokinetikk, og tidlige formuleringer viste  
20 oral biologisk tilgjengelighet på 1–89 % (Kapurtzak m.fl., 2004). Uten dyr overvåking av pasientens blodkonsentrasjon kan dette gi økt forekomst av bivirkninger på grunn av høyere plasmakonsentrasjon, eller lavere klinisk respons på grunn av lavere plasmakonsentrasjon.

Fordi hemming av cyklofiliner er en lovende ny tilnærming for  
25 behandling av HCV, er det behov for å oppdage og utvikle sterkere og sikrere CyP-hemmere til bruk i kombinasjonsterapi mot HCV-infeksjon.

### Sanglifehriner

Sanglifehrin A (SfA) og beslektede naturlige stoffer hører til en klasse  
30 av blandede ikke-ribosomale peptider/polyketider, som produseres av *Streptomyces* sp. A92-308110 (også kalt DSM 9954) (se WO 97/02285), som opprinnelig ble oppdaget på grunn av den høye affiniteten til cyklofilin A (CyPA).

SfA er den vanligste bestanddelen i gjæringsbuljonger og viser omtrent 20 ganger så høy affinitet for CyPA som CsA. Derfor er det foreslått at sangliffehriner kan være nyttige ved behandling mot HCV (WO2006/138507). Det er også påvist at sangliffehriner viser lavere immunundertrykkende aktivitet enn CsA ved tester in vitro (Sanglier m.fl., 1999, Fehr m.fl., 1999). SfA bindes med høy affinitet til CsA-bindingssitet på CyPA (Kallen m.fl., 2005).



### Biosyntese av sangliffehriner

10 Sangliffehriner framstilles biologisk av en blandet polyketidsyntetase (PKS)/ikke-ribosomal peptidsyntetase (NRPS) (se WO2010/034243). Den 22-atomige makrolidryggraden består av en polyketidkarbonkjede og en tripeptidkjede. Peptidkjeden består av én naturlig aminosyre, valin, og to unaturlige aminosyrer: (*S*)-*meta*-tyrosin og (*S*)-piperazinsyre, bundet sammen med en  
15 amidbinding. Hydroksyleringen av fenylalanin (enten in situ på NRPS eller før biosyntesen) for å lage (*S*)-*meta*-tyrosin antas å foregå gjennom genproduktet av sfaA.

### Immunundertrykkende virkning av sangliffehriner

20 Den immunundertrykkende virkningsmekanismen til SfA skiller seg fra andre kjente immunofilinbindende immunsuppressiva som CsA, FK506 og



rapamycin. SfA hemmer ikke fosfataseaktiviteten til kalsinevrin, som CsA er rettet mot (Zenke m.fl., 2001), men den immunundertrykkende aktiviteten er i stedet antatt å skyldes hemming av interleukin-6 (Hartel m.fl., 2005), interleukin-12 (Steinschulte m.fl., 2003) og hemming av interleukin-2-avhengig T-  
5 celleprolifisering (Zhang og Liu, 2001). Men det molekylære målet og mekanismen som SfA utøver den immunundertrykkende virkningen sin gjennom er hittil ukjent.

Molekylstrukturen til SfA er kompleks og det antas at interaksjonen med CyPA formidles for en stor del av den makrosykliske delen av molekylet. Faktisk har en makrosyklisk (hydroksymakrosyklisk) forbindelse som stammer fra  
10 oksidativ spaltning av SfA, vist sterk affinitet for CyPA (Sedrani m.fl., 2003). Røntgenkrystallografiske strukturdata har vist at den hydroksymakrosykliske strukturen bindes til det samme aktive setet på CyPA som CsA. Analoger basert på den makrosykliske delen av SfA er også tidligere påvist å mangle immunundertrykkende egenskaper (Sedrani m.fl., 2003), noe som gir en mulighet for å utforme  
15 ikke-immunundertrykkende CyP-hemmere med mulighet for å kunne brukes i HCV-behandling.

I motsetning til dette er det også en mulighet for å utvikle immunundertrykkende midler med lav giftighet til bruk på slike felt som forebygging av transplantatavvisning, autoimmunsykdommer,  
20 inflammasjonssykdommer og åndedrettssykdommer, inkludert, men ikke innskrenket til, Crohns sykdom, Behçets syndrom, uveitt, psoriasis, atopisk dermatitt, leddgikt, nefrittisk syndrom, aplastisk anemi, biliær cirrhose, astma, lungefibrose, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) og cøliaki. Det er påvist at den immunundertrykkende aktiviteten til sanglifehriner har en ny mekanisme  
25 (Zenke m.fl., 2001) som potensielt virker gjennom kjemokiner i dendritiske celler (Immecke m.fl., 2011), og derfor er det en mulighet for å utvikle legemidler med en annen virkningsmekanisme enn dagens kliniske legemidler, som ciklosporin A, rapamycin og FK506. Sanglifehrin A er påvist å være 10 ganger så sterk som ciklosporin A, så det ideelle nye legemidlet vil være sterkere og/eller ha et bedre  
30 terapeutisk vindu.

### Andre terapeutiske anvendelser av cyklofilinhemmere

#### Humant immunsviktvirus (HIV)

Cyklofilinhemmere som CsA og DEBIO-025 har også vist seg potensielt nyttige til å hemme HIV-replikeringen. Cyklofilinhemmerne antas å forstyrre funksjonen til CyPA i løpet av/under avslutningen av den omvendte transkriberingen av HIV (Ptak m.fl., 2008). Men da DEBIO-025 ble testet klinisk, reduserte den HIV-1 RNA-konsentrasjonen med  $\geq 0,5$  og  $>1 \log_{10}$  kopier/ml hos henholdsvis ni og to pasienter, mens 27 av de behandlede pasientene ikke viste noen reduksjon i konsentrasjonen av HIV-1 RNA (Steyn m.fl., 2006). Etter dette ble DEBIO-025 testet på pasienter infisert både med HCV og HIV, og viste bedre effektivitet mot HCV, mens de kliniske HIV-forsøkene ble avbrutt (se Watashi m.fl., 2010).

#### Behandling av HIV

Mer enn 30 millioner mennesker er infisert med HIV-1 over hele verden, og det kommer til 3 millioner nye tilfeller hvert år. Antallet behandlingsalternativer har økt dramatisk etter lanseringen av høyaktiv antiretroviruseterapi (HAART) (Schopman m.fl., 2010). I 2008 hadde nesten 25 antiretrovirale midler fått lisens for behandling av HIV-1: ni nukleosidiske omvendt transkriptase-hemmere (NRTI), fire ikke-nukleosidiske omvendt transkriptase-hemmere (NNRTI), ni protease-hemmere (PI), en fusjonshemmer, en CCR5-hemmer og en integrasehemmer (Shafer og Shapiro, 2008). Men ingen av disse eksisterende regimene gir full virusfrihet, de kan gi alvorlige bivirkninger, og resistens mot midlene er fortsatt et viktig problem. Derfor er det fortsatt et behov for nye antivirale terapier, spesielt i virkningsmekanismeklasser der det ikke er noen godkjente legemidler, slik som cyklofilinhemmere for eksempel.

#### Hepatitt B-virus

Hepatitt B er et DNA-virus fra familien hepadnaviridae som er årsak til sykdommen hepatitt B. I kontrast til HCV og HIV har det vært svært få offentliggjorte beretninger om aktiviteten til cyklofilinhemmere mot hepatitt B-viruset. Ptak m.fl. 2008 har beskrevet svak aktivitet fra Debio-025 mot HBV ( $IC_{50}$

på 4,1  $\mu\text{M}$ ) mens Xie m.fl., 2007, beskriver noe aktivitet fra CsA mot HBV ( $\text{IC}_{50} > 1,3 \mu\text{g/ml}$ ). Dette står i motsetning til HIV og HCV, som det er mange rapporter av nanomolar antivirusaktivitet fra cyklofilinhemmere mot.

#### 5 Behandling av HBV

HBV smitter opptil 400 millioner mennesker over hele verden og er en hovedårsak til kronisk virushepatitt og hepatocellulært karsinom. I 2008 var det seks legemidler lisensiert for behandling av HBV, interferon alfa og PEGylert interferon alfa, tre nukleosidaloger (lamivudin, entekavir og telbivudin) og en  
10 nukleotidalog (adefovir dipivoksil). Men på grunn av høy resistenshyppighet, dårlig tolererbarhet og mulige bivirkninger er det behov for nye behandlingsalternativer (Ferir m.fl., 2008).

#### Hemming av den mitokondriske permeabilitetsovergangporen (mPTP)

15 Når de høyt ledende permeabilitetsovergangporene i mitokondriene åpner seg, starter utløsningen av den mitokondriske permeabilitetsovergangen (MPT). Dette er en utløsende hendelse som fører til nekrose og apoptose i hepatocytter eller oksidativt stress,  $\text{Ca}^{2+}$ -giftighet og iskemi/reperfusjon. Når cyklofilin D (også kalt cyklofilin F) hemmes av cyklofilinhemmere, er det påvist at  
20 det blokkerer åpningen av permeabilitetsovergangporer og beskytter mot celledød etter stresset. Cyklofilin D-hemmere kan derfor være nyttige ved indikasjoner der mPTP-åpningen er implisert, for eksempel muskeldystrofi, spesielt medfødt muskeldystrofi type Ullrich og Bethlem-myopati (Millay m.fl., 2008, WO2008/084368, Palma m.fl., 2009), multippel sklerose (Forte m.fl., 2009),  
25 diabetes (Fujimoto m.fl., 2010), amyotrofisk lateral sklerose (Martin 2009), bipolar sykdom (Kubota m.fl., 2010), Alzheimers sykdom (Du og Yan, 2010), Huntingtons sykdom (Perry m.fl., 2010), heling etter hjerteinfarkt (Gomez m.fl., 2007) og kronisk alkoholinntak (King m.fl., 2010).

#### 30 Annen terapeutisk bruk

Cyklofilinhemmere har potensiell aktivitet og derfor behandlingspotensiale mot andre virus, som varicella-zoster-virus (Ptak m.fl.,

2008), influensa A-virus (Liu m.fl., 2009), alvorlig akutt respirasjonssyndromvirus og andre humane og feline koronavirus (Chen m.fl., 2005, Ptak m.fl., 2008), denguevirus (Kaul m.fl., 2009) gulfebervirus (Qing m.fl., 2009), cytomegalovirus (Kawasaki m.fl., 2007) og Vaccinia-virus (Castro m.fl., 2003).

5 Det er også rapportert at cyklofilinhemmere og cyklofilinhemming kan være nyttige på andre terapifelt, for eksempel mot kreft (Han m.fl., 2009).

### Generelle kommentarer om sangliffehriner

Ett av problemene med å utvikle legemidler av slike forbindelser som  
10 sangliffehriner er den raske metaboliseringen og glukuronideringen som gir lav oral biologisk tilgjengelighet. Dette kan gi økt sjanse for matinteraksjoner, oftere ufullstendig frigjøring fra doseformen og mer variasjon mellom pasientene.

Derfor er det et behov for å identifisere nye cyklofilinhemmere som er nyttige, spesielt til behandling av HCV-infeksjon, men også til behandling av andre  
15 sykdomsfelt der hemming av cyklofiliner kan være til nytte, for eksempel HIV-infeksjon, muskeldystrofi eller for å hjelpe til ved heling av hjerteinfarkt eller hvis immunundertrykking eller antiinflammatorisk virkning er til nytte. Det foretrekkes at slike cyklofilinhemmere har bedre egenskaper enn de cyklofilinhemmerne som er tilgjengelige i dag, inkludert en eller flere av de følgende egenskapene: lengre  
20 halveringstid eller økt oral biologisk tilgjengelighet, kanskje ved lavere P450-stoffskifte og/eller lavere glukuronidering, bedre vannløselighet, økt styrke mot HCV, lavere giftighet (inkludert hepatotoksisitet), bedre farmakologisk profil, for eksempel høy eksponering for målorganet (f.eks. leveren når det gjelder HCV) og/eller lang halveringstid (som gir mindre hyppig dosering), færre legemiddel-  
25 interaksjoner, for eksempel gjennom lavere CYP3A4-stoffskifte og CYP3A4-hemming og lavere (Pgp)-hemming (som gjør det lettere å kombinere flere legemidler) og bedre bivirkningsprofil, for eksempel lav binding til MRP2, som gir mindre sjanse for hyperbilirubinemi, lavere immunundertrykkende virkning, økt aktivitet mot resistente virusarter, spesielt arter som er resistente mot CsA og  
30 CsA-analoger (f.eks. DEBIO-025) og høyere terapeutisk indeks (og/eller selektivitetsindeks). Den foreliggende oppfinnelsen bekjentgjør en ny sangliffehrinanalogue som kan ha en eller flere av de ovennevnte egenskapene. Nærmere bestemt

bekjentgjør oppfinnelsen en ny mutasyntetisk sanglifehrinanalog som ventes å ha mindre stoffskifte gjennom P450 eller glukuronidering, for eksempel som vist ved høyere mikrosomhalveringstid og/eller økt styrke mot HCV, for eksempel som vist ved lav replikon-EC<sub>50</sub>.

5 I tillegg er det også et behov for å utvikle et nytt immunundertrykkende middel som kan være nyttig til å forebygge avvisning av transplantater eller i behandling av autoimmunsykdommer, inflammasjonssykdommer og åndedrettssykdommer. Det foretrekkes at et slikt immunundertrykkende middel har bedre egenskaper enn de kjente naturlige sanglifehrinene, inkludert en eller flere  
10 av de følgende egenskapene: lengre halveringstid eller økt oral biologisk tilgjengelighet, kanskje ved lavere P450-stoffskifte og/eller lavere glukuronidering, bedre vannløselighet, økt styrke i immunundertrykkende aktivitet, som det kan observeres ved T-celleprolifereringsanalyser, lavere giftighet (inkludert hepatotoksisitet), bedre farmakologisk profil, for eksempel høy eksponering for  
15 målorganet og/eller lang halveringstid (som gir mindre hyppig dosering), færre legemiddelinteraksjoner, for eksempel gjennom lavere CYP3A4-stoffskifte og CYP3A4-hemming og lavere (Pgp)-hemming (som gjør det lettere å kombinere flere legemidler) og bedre bivirkningsprofil. Den foreliggende oppfinnelsen bekjentgjør en ny sanglifehrinanalog som kan ha en eller flere av de ovennevnte  
20 egenskapene. Nærmere bestemt bekjentgjør oppfinnelsen et nytt derivat som har mindre stoffskifte gjennom P450 eller glukuronidering, for eksempel som vist ved høyere mikrosomhalveringstid og/eller økt immunundertrykkende styrke, for eksempel som vist ved lav IC<sub>50</sub> for T-celleproliferering.

Altså har forbindelsen ifølge oppfinnelsen, som man kan se av  
25 eksemplene, følgende gunstige terapeutisk relevante egenskaper:

- bedre antiviral styrke mot HCV og HIV enn de kjente  
cyklofilinhemmerne ciklosporin A, DEBIO-025 (alispovir) og sanglifehrin A,
- lavere utskillingshastighet og høyere oral eksponering enn den kjente  
forbindelsen sanglifehrin A,
- 30 -sterkere hemming av CypA PPlase-aktiviteten enn de kjente  
cyklofilinhemmerne ciklosporin A, DEBIO-025 (alispovir) og sanglifehrin A,

-bedre bivirkningsprofil og færre legemiddelinteraksjoner, noe som påvises ved lavere hemming av bilirubintransportører (OATP-1B1, OATP-1B3, MRP2 og MRP3) og lavere hemming av xenobiotiske transportører (Pgp og BSEP).

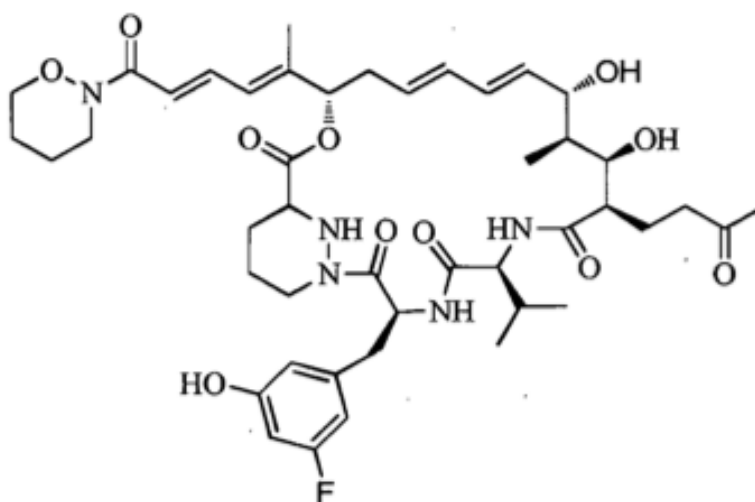
5

### Sammendrag av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en ny makrosyklisk sanglifehrinanalog som er dannet ved halvsyntetisk modifisering av mutasyntetiske sanglifehriner. Denne analogen kan dannes ved å dihydroksylere et mutasyntetisk sanglifehrin, som de som er beskrevet i formel IIA og formel IIB, og så spalting for å lage den aldehydiske makrosykliske forbindelsen før det gjøres ytterligere kjemi, inkludert reaksjoner av Homer-Emmons-typen og andre bindingsreaksjoner som involverer et aldehyd. Dermed tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en makrosyklisk sanglifehrinanalog, framgangsmåter for å framstille denne forbindelsen og framgangsmåter for å bruke denne forbindelsen i medisinen eller som et mellomprodukt for produksjon av andre forbindelser.

15

Altså er et første aspekt av den foreliggende oppfinnelsen å tilveiebringe en makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) nedenfor, eller et farmasøytisk aksepterbart salt av den:



20

Formel (I)

inkludert alle tautomerer av den, og inkludert en metanoladdisjonsforbindelse av den der det dannes et ketal ved å kombinere C-53-keto med C-15-hydroksylgruppen og metanol.

Strukturen ovenfor viser en representativ tautomer og oppfinnelsen  
5 omfatter alle tautomerer av forbindelsen av formel (I), for eksempel en ketoforbindelse der det er illustrert en enolforbindelse eller omvendt.

Spesifikke tautomerer som er inkludert i definisjonen av formel (I) er slike der (i) ketogruppen i C-53 danner et hemiketal med C-15 hydroksyl, eller (ii) C-15 og C-17 hydroksyl kan kombineres med C-53 keto til et ketal. Alle  
10 nummereringene brukes det samme systemet som i strukturen til utgangspunktet, sanglifehrin A.

Forbindelsen av formel (I) eller et farmasøytisk aksepterbart salt av den kan eventuelt foreligge i form av et farmasøytisk aksepterbart solvat, for eksempel et hydrat.

15 Et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelsen er å tilveiebringe en makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) i fast krystallinsk form (form I).

### Definisjoner

Artiklene «en» og «et» slik de brukes her står for én eller flere enn én  
20 (dvs. minst én) av de grammatiske gjenstandene for artikkelen. For eksempel betyr «en analog» én analog eller mer enn én analog.

Slik den brukes her står betegnelsen «analog(er)» for kjemiske forbindelser som likner hverandre strukturmessig men har litt forskjellig sammensetning (for eksempel ved at et atom er byttet med et annet eller at en  
25 bestemt funksjonell gruppe mangler eller er til stede).

Slik den brukes her står betegnelsen «sanglerifehrin(er)» for kjemiske forbindelser som likner sanglifehrin A strukturmessig men har litt forskjellig sammensetning (for eksempel ved at et atom er byttet ut med et annet eller at en bestemt funksjonell gruppe mangler eller er til stede), nærmere bestemt slike som  
30 dannes ved gjæringen til *Streptomyces* sp. A92-308110. Eksempler er de sanglifehrinliknende forbindelsene som er nevnt i WO97/02285 og WO98/07743, for eksempel sanglifehrin B.

Slik de brukes her står uttrykkene «mutasyntetisk(e) sanglifehrin(er)» og «mutasyntetisk(e) sanglifehrinanalog(er)» for kjemiske forbindelser som likner sanglifehrin A, B, C eller D strukturelt, men er litt forskjellige i sammensetning (for eksempel ved at et atom er byttet med et annet eller at en bestemt funksjonell gruppe mangler eller er til stede), spesielt slike som lages ved gjæring i Streptomyces sp. A92-308110 eller en mutant av den, der kulturen mates med en *meta*-tyrosinanalog.

Slik det brukes her står uttrykket «Meta-tyrosinanalog(er)» for kjemiske forbindelser som likner meta-tyrosin strukturemessig, men er litt forskjellige i sammensetning (for eksempel ved at et atom er byttet med et annet eller at en bestemt funksjonell gruppe mangler eller er til stede),, spesielt de som beskrives i formel (III).

Slik de brukes her står uttrykkene «makrosyklisk analog», «makrosyklisk sanglifehrinanalog» eller «makrosyklisk sanglifehrin» for en forbindelse som omtales ovenfor slik at den representerer oppfinnelsen i sitt bredeste aspekt, for eksempel en forbindelse ifølge formel (I) ovenfor, eller et farmasøytisk aksepterbart salt av den. Disse forbindelsene omtales også som «forbindelser ifølge oppfinnelsen», «derivater av sanglifehrin» eller «sanglifehrinanaloger», og disse uttrykkene brukes om hverandre i den foreliggende søknaden.

Slik den brukes her står betegnelsen «HCV» for hepatitt C-virus, et enstrenget, innkapslet RNA-virus i familien Flaviviridae.

Slik den brukes her står betegnelsen «HIV» for human immunsviktivirus, som er årsak til human ervervet immunsviktsyndrom.

Slik det brukes her står uttrykket «biologisk tilgjengelighet» for graden eller hastigheten som et legemiddel eller et annet stoff tas opp eller blir tilgjengelig med på stedet for biologisk aktivitet eller administreringen. Denne egenskapen er avhengig av et antall faktorer, blant annet løseligheten til forbindelsen, opptakshastigheten i tarmen, grad av proteinbinding og stoffskifte osv. Forskjellige tester av den biologiske tilgjengeligheten som vil være kjente for en fagperson, beskrives her (se også Egorin m.fl., 2002).

Betegnelsen «vannløselighet» slik det brukes i denne søknaden står for løselighet i vandig medium, f.eks. fosfatbufret saltløsning (PBS) ved pH 7,4, eller i



5 % glukoseløsning. Tester av vannløselighet omtales nedenfor som «vannløselighetstest».

De farmasøytisk aksepterbare salter av forbindelser ifølge oppfinnelsen, for eksempel forbindelsen av formel (I), inkluderer konvensjonelle salter dannet av farmasøytisk aksepterbare uorganiske eller organiske syrer eller baser samt syreaddisjonssalter av kvartært ammonium. Mer spesifikke eksempler på egnede syresalter er salter av saltsyre, hydrogenbromidsyre, svovelsyre, fosforsyre, salpetersyre, perklorisyre, fumarsyre, eddiksyre, propionsyre, ravsyre, glykolsyre, maursyre, melkesyre, maleinsyre, vinsyre, sitronsyre, palmitinsyre, malonsyre, hydroksymaleinsyre, fenyleddiksyre, glutaminsyre, benzosyre, salisylsyre, toluensulfonsyre, metansulfonsyre, naftalen-2-sulfonsyre, benzensulfonsyre, hydroksynaftalenkarboksylsyre, hydrogenjodidsyre, eplesyre, stearinsyre, garvesyre eller liknende. Saltsyresalter er spesielt interessante. Andre syrer som oksalsyre kan være nyttige selv om de ikke selv er farmasøytisk aksepterbare til å framstille salter som kan brukes som mellomprodukter under produksjon av forbindelser ifølge oppfinnelsen og farmasøytisk aksepterbare salter av dem. Mer spesifikke eksempler på egnede basiske salter er salter av natrium, litium, kalium, magnesium, aluminium, kalsium, sink, *N,N'*-dibenzyletylendiamin, klorprokain, kolin, dietanolamin, etylendiamin, *N*-metylglukamin og prokain. Omtale nedenfor av en forbindelse ifølge oppfinnelsen inkluderer både en forbindelse av formel (I) og de farmasøytisk aksepterbare saltene av den.

Slik den brukes her står betegnelsen «alkyl» for en rett eller forgrenet alkylgruppe som inneholder typisk 1–10 karbonatomer, for eksempel en  $C_{1-6}$ -alkylgruppe. Eksempler på alkylgrupper er  $C_{1-4}$ -alkylgrupper som metyl, etyl, *n*-propyl, isopropyl og *n*-butyl.

Betegnelsen «behandling» omfatter både forebyggende og terapeutisk behandling.

Betegnelsen «formel II» står både for formel IIA og formel IIB kollektivt.

FigurforklaringFigur 1:  $^1\text{H}$  NMR av forbindelse 24Figur 2: Røntgendiffraksjonsmønster for forbindelse 24 i fast krystallinsk form (form 1)

5

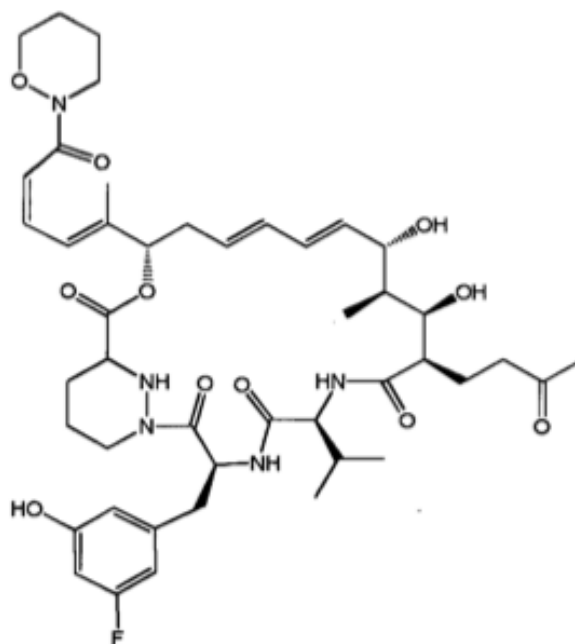
Beskrivelse av oppfinnelsen

Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer en makrosyklisk sanglifehrinanalog som forklart ovenfor, framgangsmåter for å framstille denne forbindelsen og framgangsmåter for å bruke denne forbindelsen i medisinen.

10

I én utførelsesform er forbindelsen en addisjonsforbindelse med metanol der det er dannet et hemiketal ved å kombinere keto i C-53 med hydroksylgruppene i C-15 og metanol. I en annen utførelsesform er den ikke det.

I en utførelsesform av oppfinnelsen er dobbeltbindingen i C26-27-posisjonen i cis-stilling, som den følgende formelen representerer:



15

En slik forbindelse kan produseres ved kjemisk syntese.

En annen utførelsesform tilveiebringer en makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) i fast krystallinsk form. Nærmere bestemt tilveiebringes det en fast krystallinsk form (form I) av en makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) som kan framstilles (eller blir framstilt) ved å krystallisere en amorf makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) fra metylisobutylketon (MIBK). I

20

én utførelsesform slemmes denne amorfe formen opp i MIBK og temperaturen sirkuleres mellom en minimums- og maksimumstemperatur gjennom et totalt tidsintervall på for eksempel 1 time, 2 timer, 5 timer, 24 timer, 1 døgn, 2 døgn, 3 døgn, 4 døgn, 5 døgn, 6 døgn, 7 døgn eller 2 uker. I én utførelsesform sirkuleres 5 temperaturen mellom romtemperatur og 60 °C, for eksempel mellom romtemperatur og 40 °C. I én utførelsesform sirkulerer temperaturen mellom minimumstemperaturen og maksimumstemperaturen (og omvendt) hver 2.–8. time, for eksempel hver 3.–5. time eller hver 4. time. I en foretrukket utførelsesform sirkulerer temperaturen mellom romtemperatur og 40 °C hver 4. 10 time i totalt 5 døgn.

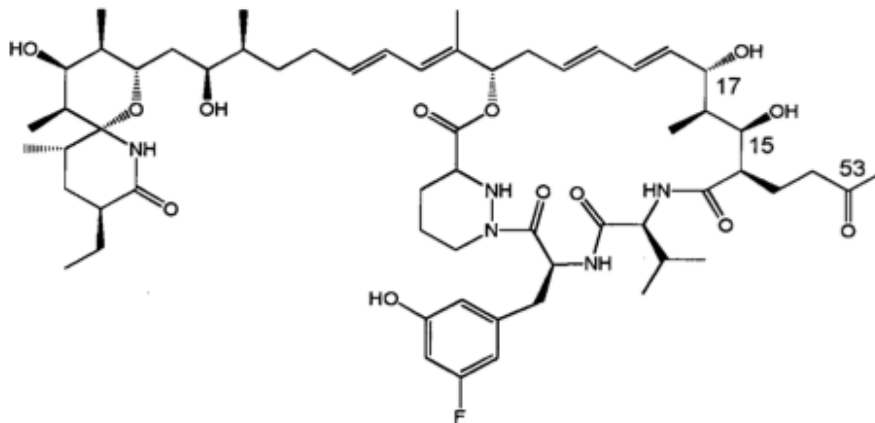
En framgangsmåte for å krystallisere den amorfe formen av makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) beskrives i detalj i eksempel 8.

En makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) i form av en krystallinsk polymorf form I har et røtgendiffraksjonsmønster (XRPD) stort sett 15 som vist på figur 2. Tabell 2 (i eksempel 8) viser en liste over toppene med relative intensiteter. Framgangsmåten for å tilveiebringe XRPD-dataene beskrives under Generelle framgangsmåter.

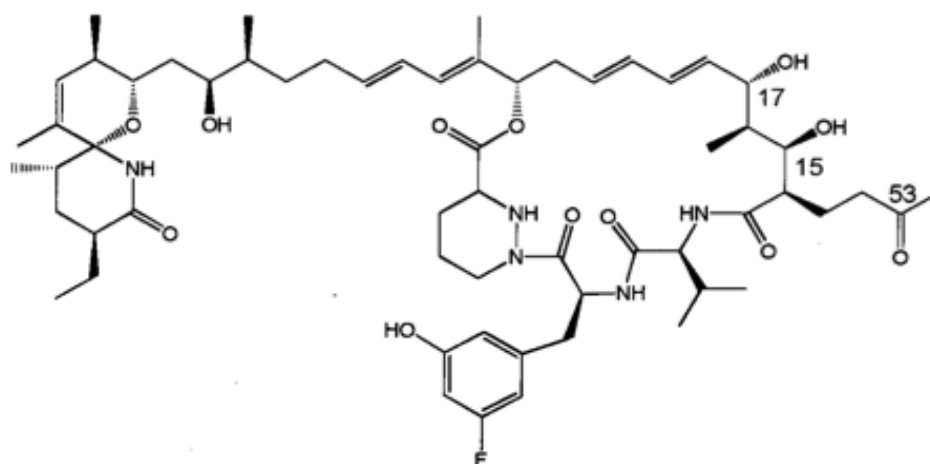
Altså tilveiebringes det en makrosyklisk sanglifehrinanalog ifølge formel (I) i en krystallinsk form (form I) med et XRPD-mønster som har minst ett (for 20 eksempel ett, to, tre, fire, fem, seks, sju, åtte, ni, ti, elleve, tolv, tretten, fjorten, femten, seksten eller alle sytten) av signalene på 8,3, 8,5, 11,1, 12,6, 13,9, 14,3, 15,0, 16,9, 17,7, 18,6, 19,0, 20,1, 20,5, 20,9, 21,2, 21,7 og 23,0 ( $\pm 0,2$  grader, 2-thetaverdier), som utgjør de viktigste signalene i XRPD-mønsteret til form I-polymorfen. Signalene på 8,3, 8,5, 11,1, 13,9, 17,7, 18,6, 19,0, 20,5, 20,9 og 23,0 25 grader 2-theta har forholdsvis høy relativ intensitet (mer enn 26 % – se figur 2) og derfor foretrekkes det å se minst én (for eksempel en, to, tre, fire, fem, seks, sju, åtte, ni eller alle ti) av dem. Signalene på 13,9, 17,7, 19,0, 20,5 og 23,0 grader 2-theta har spesielt høy relativ intensitet (mer enn 50 % – se figur 2) og derfor foretrekkes det å se minst én (for eksempel én, to, tre, fire eller alle fem) av dem.

30 Uttrykket «relativ intensitet» skal forstås slik at det betyr intensiteten angitt som prosentandel av intensiteten av signalet med høyest intensitet i spekteret (som svarer til toppen ved 13,9 grader 2-theta), som illustrert på figur 2.

Generelt framstilles forbindelsen ifølge oppfinnelsen ved mutasyntese for å lage forbindelser av formel (II), og så halvsyntese.



Formel (IIA)



Formel (IIB)

Generelt innbefatter en prosess for å framstille forløpere for en forbindelse av formel (I) eller et farmasøytisk aksepterbart salt av den å:

- Inokulere en gjæringsbuljong med en kultur av en
- 10 sanglifehrinproducent (for eksempel *Streptomyces* sp. A92-308110, også kalt DSM 9954) eller fortrinnsvis en sanglifehrinproducent med *sfaA*-genet eller *sfaA*-genhomologen inaktivert eller slettet,
- mate gjæringsbuljongen med en *meta*-tyrosinanalogue (som vist i formel (III), for eksempel (*S*)-metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat, DL-5-
- 15 fluor-*meta*-tyrosin (9) eller metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat (10),

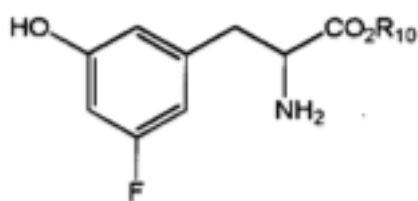
-la gjæringen fortsette til forbindelsene av formel IIA og formel IIB produseres,

-ekstrahere og isolere forbindelser av formel IIA og formel IIB,

-halvsyntetisk derivatisering av forbindelsene av formel IIA og formel IIB

5 for å danne forbindelsen av formel I.

Forbindelser av formel (III) er definert som følger:



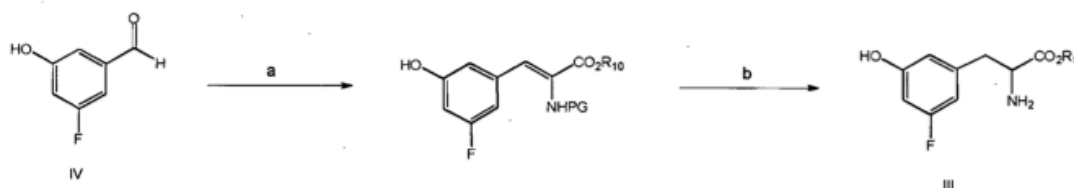
Formel (III)

der  $R_{10}$  står for H eller en esterdannende gruppe som en alkylgruppe,

10 f.eks.  $C_{1-6}$ -alkyl, for eksempel Me.

Maten kan være rasemisk eller L-formen av en forbindelse av formel (III).

Forbindelser av formel (III) kan enten fås i handelen eller framstilles ved standard organisk kjemiske syntesemetoder. Ett generisk forløp som gir 15 forbindelser av formel (II) er framstilt i skjema 1a nedenfor.



Skjema 1a: a) binde aldehyd i formel (IV) til et passende fragment, f.eks.  $(R_{11}O)_2P(O)CH(NHBG)CO_2R_{10}$ , og b) hydrogenere og fjerne beskyttende grupper etter behov. BG = beskyttende gruppe.

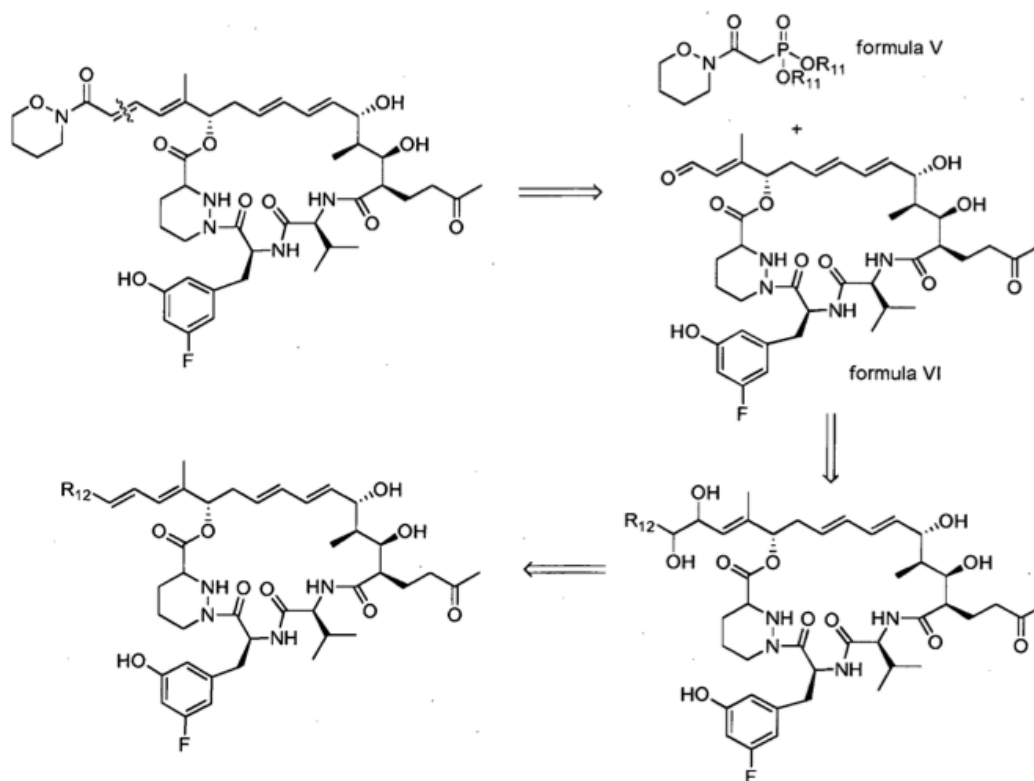
20 Aldehyder av formel (IV) kan fås i handelen eller framstilles enkelt av kvalifiserte fagpersoner. Det kan være behov for å bruke beskyttende grupper og fjerne dem når man lager forbindelser av formel (III) av forbindelser av formel (IV). Disse metodene er kjent for fagpersoner og egnede beskyttende grupper er beskrevet i Greene's Protective Groups in Organic Synthesis (Wuts og Greene, 4. 25 utgave 2007).

Når forbindelsene av formel (IIA) og formel (IIB) er lagd, framstilles forbindelsene ifølge oppfinnelsen ved halvsyntetisk derivatisering. Halvsyntetiske framgangsmåter for å lage det makrosykliske sanglifehrinaldehydet er beskrevet i US6,124,453, Metternich m.fl., 1999, Banteli m.fl., 2001 og Sedrani m.fl., 2003.

5 Generelt vil den halvsyntetiske prosessen for å framstille visse forbindelser av formel (I) eller et farmasøytisk aksepterbart salt av dem av en mutasyntetisk sanglifehrinalanalog innbefatte:

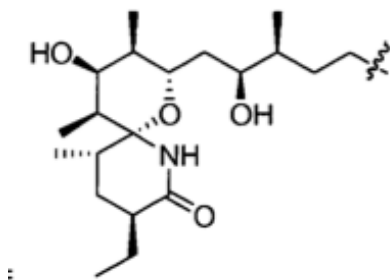
- (a) dihydroksylering av sanglifehrinalanologen,  
 (b) oksidativ spalting av 1,2-diolen til et aldehyd, og  
 10 (c) binding av aldehydet til et stabilisert karbanion (eller en kanonisk form av det), for eksempel et fosfonatkarbanion, ved hjelp av en forbindelse av formel V.

Dette er framstilt retrosyntetisk nedenfor:



15

Der R<sub>12</sub> for mutasyntetiske sanglifehrinalanaloger =



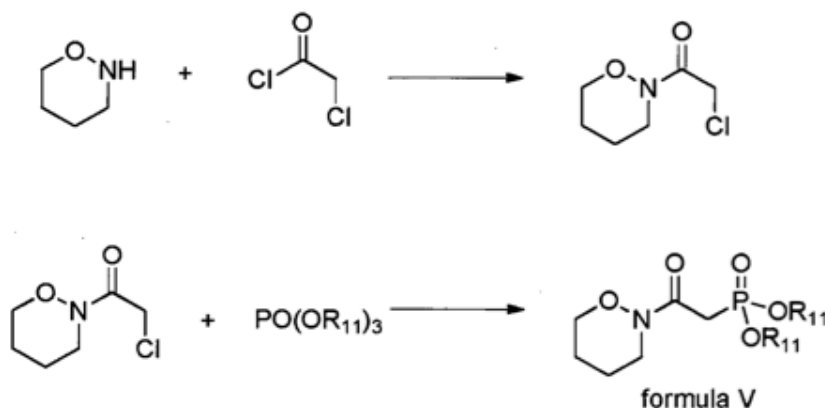
R<sub>11</sub>-grupper, som kan være like eller forskjellige, står hver for seg for alkyl (f.eks. C<sub>1-4</sub>-alkyl) eller benzyl.

Altså innbefatter en prosess for å framstille en forbindelse ifølge  
 5 oppfinnelsen å la en forbindelse av formel (V) reagere med en aldehydisk makrosyklisk forbindelse (forbindelse av formel (VI)).

Forbindelser av formel (VI) kan framstilles med en prosess tilsvarende prosessen som er beskrevet ovenfor for å omdanne sangliferin A til den tilsvarende aldehydiske makrosykliske forbindelsen (Metternich m.fl., 1999). Kort  
 10 fortalt blir forbindelsen av formel (II) dihydroksylert ved modifiserte Sharpless-forhold (katalytisk osmiumtetroksid). Kirale ligander gir bedre selektivitet. Den resulterende diolen kan så spaltes oksidativt, for eksempel med natriumperjodat. Den resulterende forbindelsen av formel VI kan så brukes som substrat for derivatisering til et homologert amid, ester eller keton. Vanligvis blir en forbindelse  
 15 av formel (V) løst i et aprotisk løsningsmiddel, avkjølt og så behandlet med en base, for eksempel natriumhydrid. Så tilsettes en forbindelse av formel (VI) og reaksjon blir varmet i temperatur. Etter en passende tidsperiode stoppes reaksjonen og forbindelsen av formel I renses under standardforhold (f.eks. preparativ HPLC, preparativ TLC osv., flashkromatografi med normale faser).

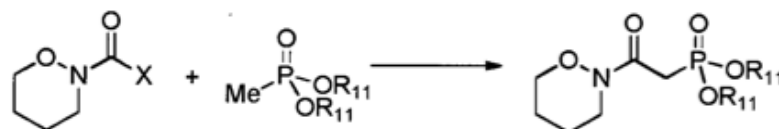
20 Forbindelser av formel (V) kan være kjente eller kan framstilles ved kjente framgangsmåter.

Som vist i skjema 1 (nedenfor) kan et passende amin brukes til å behandle kloracetylklorid eller liknende for å lage et alfa-kloramid. Alfa-kloramidet blir så behandlet i en Arbuzov-reaksjon for å lage en forbindelse av formel V.  
 25 Andre måter å lage forbindelse V på vil være åpenbare for en fagperson.



### Skjema 1

Andre forbindelser av formel (V) kan være kjente eller enkle å framstille av tilgjengelige karboksylsyrederivater (f.eks.  $R_3COX$ ) der  $R_3$  er 1,2-oksazinan-  
 5 ringen som er framstilt i skjema 2. Som vist i skjema 2 (nedenfor) kan karboksyl-  
 syrederivatet bindes på et metylfosfonat etter at fosfonatet er behandlet med en  
 base. Dette gir en forbindelse av formel (V), men andre måter å framstille  
 forbindelse V på vil være åpenbare for fagpersoner.



10 X = Cl eller O-alkyl

### Skjema 2

Hvis det er ønskelig eller nødvendig kan det brukes beskyttende  
 grupper til å beskytte funksjonalitet i den aldehydiske eller ikke-aldehydiske  
 makrosykliske forbindelsen, eller i forbindelser av formel V som beskrevet i T.W.  
 15 Green, P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley-Interscience,  
 New York, 1999.

I tillegg til de spesifikke framgangsmåtene og referansene som  
 tilveiebringes her kan en fagperson også slå opp i standard lærebokverk om  
 syntesemetoder, inkludert, men ikke innskrenket til, Vogels *Textbook of Practical*  
 20 *Organic Chemistry* (Furniss m.fl., 1989) og Marchs *Advanced Organic Chemistry*  
 (Smith og March, 2001).

En sangliffehrinanalogue ifølge oppfinnelsen kan gis alene eller i  
 kombinasjon med andre legemidler. Samtidig administrering av to (eller flere)



midler kan gjøre det mulig å gi lavere doser av hvert middel og dermed redusere bivirkningene, gi sterkere virkning og derfor høyere SVR, samt lavere resistens.

Derfor blir den mutasyntetiske sanglifehrinanalogen i én utførelsesform gitt sammen med ett eller flere legemidler som tas fra standardbehandlingene for å  
5 behandle HCV-infeksjon. Dette kan være et interferon (f.eks. pIFN $\alpha$  eller ribavirin).

I en alternativ utførelsesform gis en makrosyklisk sanglifehrinforbindelse ifølge oppfinnelsen sammen med ett eller flere andre antivirale midler, som STAT-C (spesielt målspesifikt middel for behandling av HCV) eller DAA (direktevirkende virusmidler), som kan være en eller flere av de følgende: ikke-  
10 nukleosidiske polymerasehemmere (f.eks. ABT-333, ABT-072, BMS 791325, IDX375, VCH-222, BI 207127, ANA598, VCH-916, GS 9190, PF-00868554 (filibuvir) eller VX-759), nukleosidiske eller nukleotidiske polymerasehemmere (f.eks. 2'-C-metylcytidin, 2'-C-metyladenosin, R1479, PSI-6130, R7128, R1626, PSI 7977 eller IDX 184), proteasehemmer (f.eks. ABT-450, ACH-1625, BI 201355,  
15 BILN-2061, BMS-650032, CTS 1027, Danoprevir, GS 9256, GS 9451, MK 5172, IDX 320, VX-950 (telaprevir), SCH503034 (boceprevir), TMC435350, MK-7009 (vaneprevir), R7227/ITMN-191, EA-058, EA-063 eller VX 985), NS5A-hemmere (f.eks. A-831, BMS 790052, BMS 824393, CY-102 eller PPI-461), silymarin, NS4b-hemmere, serin C-palmitoyltransferasehemmere, nitazoxanid eller  
20 virusinngangshemmere (f.eks. PRO 206).

I en alternativ utførelsesform gis en makrosyklisk sanglifehrinforbindelse ifølge oppfinnelsen for å behandle HIV sammen med ett eller flere andre antivirale midler (for eksempel høyaktiv antiretrovirus terapi (HAART)), som kan være ett eller flere av følgende: nukleosidiske omvendt  
25 transkriptasehemmere (NRTI) (f.eks. emtricitabin eller tenofovir), ikke nukleosidiske omvendt transkriptasehemmere (NNRTI) (f.eks. rilipivirin eller efavirenz), proteasehemmere (PI) (f.eks. ritonavir eller lopinavir), fusjonshemmere (f.eks. maraviroc eller enfuvirtid), CCR5-hemmere (f.eks. aplaviroc eller vikrivoc), modningshemmere (f.eks. bevirimat), monoklonale CD4-antistoffer (f.eks.  
30 ibalizumab) og integrasehemmere (f.eks. eltiegravir).

I en alternativ utførelsesform gis en makrosyklisk sanglifehrinforbindelse ifølge oppfinnelsen for å behandle HBV sammen med ett

eller flere andre antivirale midler, som kan være ett eller flere av følgende:  
interferoner (f.eks. interferon alfa eller PEGylert interferon alfa), nukleosid- eller  
nukleotidanaloger (f.eks. lamivudin, entekavir, adefovir dipivoksil eller telbivudin),  
andre immunmodulatorer (f.eks. tymosin alfa, CYT107 eller DV-601) eller HMG  
5 CoA-reduktasehemmere (f.eks. simvastatin).

Det er praktisk om formuleringene presenteres i enhetsdoseform og de  
kan tilberedes ved enhver av de velkjente framgangsmåtene i farmasien. Slike  
framgangsmåter er blant annet trinnet å forbinde virkestoffet (forbindelsen ifølge  
oppfinnelsen) med bæreren som utgjør en eller flere tilleggsbestanddeler.  
10 Generelt tillages formuleringene ved å bringe virkestoffet ensartet og intimt  
sammen med flytende bærere eller finfordelte faste bærere eller liknende, og så,  
hvis nødvendig, formgi produktet.

Forbindelsene ifølge oppfinnelsen vil normalt bli gitt oralt i form av en  
farmasøytisk formulering som innbefatter virkestoffet, eventuelt i form av et ikke-  
15 giftig organisk eller uorganisk surt eller basis addisjonssalt, i en farmasøytisk  
akseptert doseform. Sammensetningene kan gis med doser som varierer med  
sykdommen og pasienten som skal behandles samt administreringsmåten.

For eksempel kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen gis oralt, buktalt  
eller sublingvalt i form av tablett, kapsler, små egg, eliksirer, løsninger eller  
20 suspensjoner, som kan inneholde smaks- eller fargestoffer, for umiddelbar  
frigjøring, forsinket frigjøring eller kontrollert frigjøring.

Slike tablett kan inneholde hjelpestoffer som mikrokrySTALLinsk  
cellulose, laktose, natriumsitrat, kalsiumkarbonat, tobasisk kalsiumfosfat og glycin,  
desintegreringsmidler som stivelse (fortrinnsvis, mais-, potet- eller tapiokastivelse),  
25 natriumstivelsesglykolat, kroskarmellose-natrium og visse komplekse silikater, og  
granuleringsbindemidler som polyvinylpyrrolidon, hydroksypropylmetylcellulose  
(HPMC), hydroksypropylcellulose (HPC), sukrose, gelatin og gummi arabicum.  
Dessuten kan det tas med smøremidler som magnesiumstearat, stearinsyre,  
glyserylbehenat og talk.

30 Faste sammensetninger av en liknende type kan også brukes som  
fyllstoff i gelatinkapsler. Foretrukne hjelpestoffer til dette er laktose, stivelse, en  
cellulose, melkesukker eller polyetylen glykol med høy molekylvekt. For

vannsuspensjoner eller eliksirer kan forbindelsene ifølge oppfinnelsen kombineres med forskjellige søtstoffer, smaksstoffer eller fargestoffer, med emulgeringsmidler og/eller suspenderingsmidler og med fortynningsmidler som vann, etanol, propylenglykol og glyserin, samt kombinasjoner av disse.

5 En tablett kan lages ved pressing eller støping, eventuelt med en eller flere tilsetninger. Pressede tabletter kan lages i en passende maskin ved å presse virkestoffet i frittflytende form, som pulver eller granulat, eventuelt blandet med et bindemiddel (f.eks. povidon, gelatin, hydroksypropylmetylcellulose), smøremiddel, inert fortynningsmiddel, konserveringsmiddel, desintegreringsmiddel (f.eks.  
10 natriumstivelsesglykolat, fornett povidon, fornett natriumkarboksymetylcellulose), overflateaktive midler eller dispergeringsmidler. Støpte tabletter kan lages i en passende maskin ved å støpe en blanding av den pulveriserte forbindelsen fuktet med et inert flytende fortynningsmiddel. Tabletten kan eventuelt belegges eller forsynes med delelinje og kan formuleres slik at de gir  
15 langsom eller kontrollert frigjøring av virkestoffet i dem, for eksempel ved hjelp av hydroksypropylmetylcellulose i forskjellige forholdstall for å oppnå den ønskede frigjøringsprofilen.

Formuleringer ifølge den foreliggende oppfinnelsen som egner seg for å gis oralt kan presenteres som diskrete enheter som kapsler eller tabletter, som  
20 hver inneholder en forhåndsbestemt mengde av virkestoffet, som pulver eller granulat, som en løsning eller suspensjon i en vandig væske eller ikke-vandig væske, eller som en flytende emulsjon av olje i vann-typen eller vann i olje-typen. Virkestoffet kan også presenteres som en bolus, latverge eller pasta.

Det må være klart at i tillegg til bestanddelene som er omtalt nærmere  
25 ovenfor kan formuleringene ifølge denne oppfinnelsen også inkludere andre midler som er konvensjonelle i faget i forbindelse med den aktuelle formuleringstypen, for eksempel kan slike som egner seg for å gis oralt inneholde smaksstoffer.

Slike midler som konserveringsmidler og bufringsmidler kan med fordel være løst i bæreren. For bedre stabilitet kan sammensetningen fryses etter at den  
30 er fylt på glasset og vannet fjernes under vakuum. Så lukkes det frysetørkede pulveret tett inn i glasset og det kan følge med et glass fylt med vann for injeksjon slik at væsken kan rekonstitueres før bruk.

Dosen som skal gis av en forbindelse ifølge oppfinnelsen vil variere med den aktuelle forbindelsen, den aktuelle sykdommen, pasienten, hva slags sykdom det er og hvor alvorlig den er, den fysiske tilstanden til pasienten og den valgte administreringsmåten. Den passende dosen kan enkelt bestemmes av en fagperson.

Sammensetningene kan inneholde en mengde på 0,1 vektprosent, fortrinnsvis 5–60 vektprosent, mer foretrukket 10–30 vektprosent av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, som kommer an på administreringsmåten.

En fagperson vil forstå at den optimale mengden av og tidsintervallet mellom de individuelle dosene av en forbindelse ifølge oppfinnelsen bestemmes av typen og graden av sykdommen som skal behandles, administreringsformen, administreringsmåten og administreringsstedet og alderen og tilstanden til den aktuelle pasienten som skal behandles, og at en lege til sjuende og sist vil bestemme hvilken dose som egner seg. Denne dosen kan gjentas så ofte som det egner seg. Hvis det oppstår bivirkninger, kan mengden og/eller hyppigheten forandres eller senkes i samsvar med normal klinisk praksis.

Andre aspekter av oppfinnelsen er:

- en forbindelse ifølge oppfinnelsen til bruk som legemiddel,
- en forbindelse ifølge oppfinnelsen til bruk som legemiddel mot virusinfeksjoner (spesielt RNA-virusinfeksjoner) som HCV- eller HIV-infeksjoner, som antiinflammatorisk legemiddel eller til å forebygge avvisning ved organtransplantasjoner,
- en farmasøytisk sammensetning som innbefatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen sammen med et farmasøytisk aksepterbart fortynningsmiddel eller bærerstoff,
- en farmasøytisk sammensetning som innbefatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen sammen med et farmasøytisk aksepterbart fortynningsmiddel eller bærerstoff som også innbefatter en annen eller senere aktiv bestanddel, spesielt et virkestoff som er indisert for behandling av virusinfeksjoner som HCV- eller HIV-infeksjon, til bruk som antiinflammatorisk legemiddel eller til å forebygge avvisning ved organtransplantasjoner.

Det beskrives også:

- en framgangsmåte for å behandle virusinfeksjoner (spesielt RNA-virusinfeksjoner) som HCV- eller HIV-infeksjon, for å behandle inflammasjoner eller for å forebygge avvisning ved organtransplantasjoner, som innbefatter å gi en pasient en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen,
- bruk av en forbindelse ifølge oppfinnelsen til å produsere et legemiddel for å behandle virusinfeksjoner som HCV- eller HIV-infeksjon, til bruk som antiinflammatorisk legemiddel eller for å forebygge avvisning ved organtransplantasjoner.

10

### Generelle framgangsmåter

#### Materialer og framgangsmåter

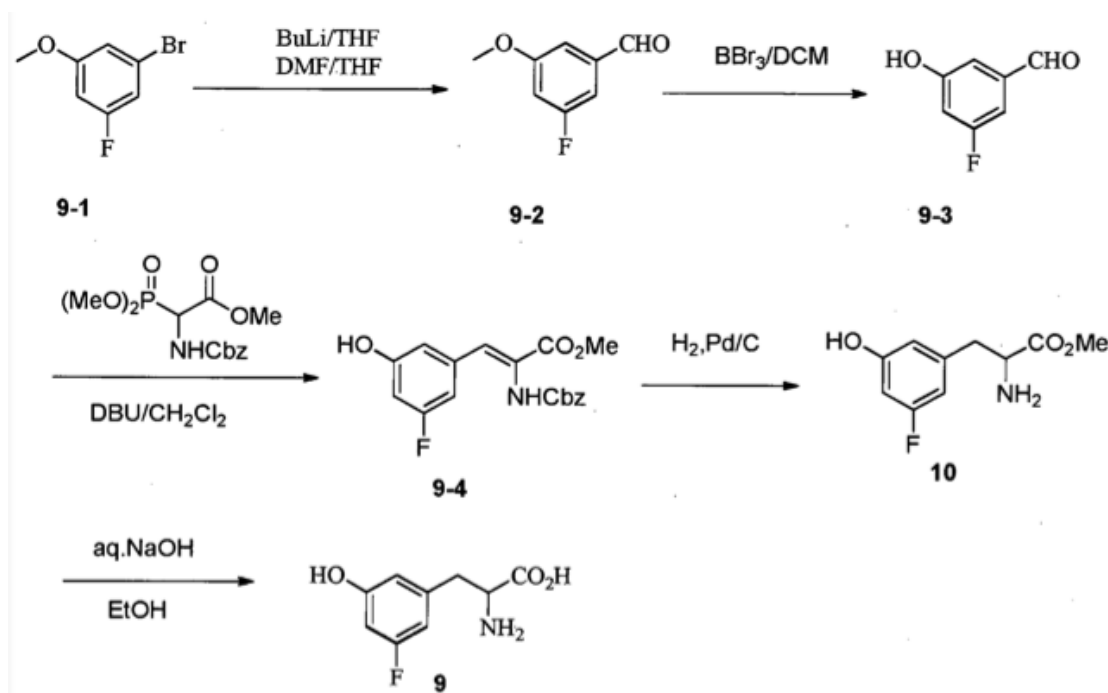
#### Bakteriestammer og vekstforhold

- Sanglifehrinprodusenten Streptomyces sp. A92-308110 (DSM-nr. 9954, kjøpt fra DSMZ, Braunschweig, Tyskland), også kalt BIOT-4253 og BIOT-4370 eller avledninger av den, som BIOT-4585, holdes ved like på middels havremelagar, MAM, ISP4 eller ISP2 (se nedenfor) ved 28 °C,

- BIOT-4585 (se eksempel 1 for konstruksjonsmetodikken) ble dyrket på havremelagar ved 28 °C i 7–10 dager. Sporer fra overflaten av agarplaten ble samlet i 200 g/l steril glyserol i destillert vann og oppbevart i 0,5 ml porsjoner ved –80 °C. Et nedfrost sporeforråd ble brukt til å inokulere startmedium SGS eller SM25-3. Det inokulerte startmediet ble inkubert med risting mellom 200 og 300 rpm ved 5,0 eller 2,5 cm kast ved 27 °C i 24 timer. Gjæringsmediet SGP-2 eller BT6 ble inokulert med 2,5 %-10 % av startkulturen og inkubert med risting mellom 200 og 300 rpm med et 5 eller 2,5 cm kast ved 24 °C i 4–5 dager. Kulturen ble så høstet for utvinning.

#### Meta-tyrosinanalogs

- (S)-metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat ble kjøpt fra NetChem (USA). (3-brom-5-fluoranisol (9-1) ble kjøpt fra Acela ChemBio Co., Ltd., (Shanghai, Kina) og kan også kjøpes fra Amfinecom Inc. (USA) eller Apollo Scientific Ltd. (UK)). DL-5-fluor-meta-tyrosin (9) og metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat (10) ble framstilt som følger.

DL-5-fluor-meta-tyrosin (**9**) og metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat (**10**)

En løsnig av **9-1** (20 g, 97,55 mmol) i tetrahydrofuran (100 ml) ble dråpevis tilsatt *n*-butyllitium (43 ml, 107,3 mmol) ved  $-78^{\circ}\text{C}$ . Den ble omrørt ved 5 30 minutter og *N,N*-dimetylformamid (15,1 ml, 195,1 mmol) ble tilsatt ved denne temperaturen. Den ble omrørt i 30 minutter til og kuldebadet ble fjernet. Etter 1 time ble reaksjonen stoppet med mettet vandig ammoniumklorid. Det organiske sjiktet ble vasket med vann og mettet vandig natriumklorid, tørket (natriumsulfat), filtrert og konsentrert. Konsentratet ble rensed ved kromatografi på silikagel for å 10 isolere **9-2**.

En løsnig av **9-2** (6 g, 38,9 mmol) i tørr DCM (200 ml) ble dråpevis tilsatt BBr<sub>3</sub> (4 M i DCM, 30 ml, 116,8 mmol) ved  $-70^{\circ}\text{C}$ . Etter tilsetningen ble reaksjonsblandingen omrørt ved  $-20^{\circ}\text{C}$  i 3 timer, forsiktig tilsatt isvann og ekstrahert med DCM. De organiske sjiktene ble vasket med vann og saltløsning, 15 tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og konsentrert. Konsentratet ble rensed ved flash-kromatografi på silika for å isolere den ønskede forbindelsen **9-3**.

En løsnig av metyl-2-(benzyloksykarbonylamino)-2-(dimetyloksyfosforyl)-acetat (4,64 g, 28 mmol) i DCM (150 ml) tilsettes DBU (4,26 g, 28 mmol) ved romtemperatur. Etter 10 minutter ble det tilsatt **9-3** (1,95 g, 14 20 mmol) og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten. Løsningen ble fortynnet med EtOAc (150 ml), separert og det organiske sjiktet ble

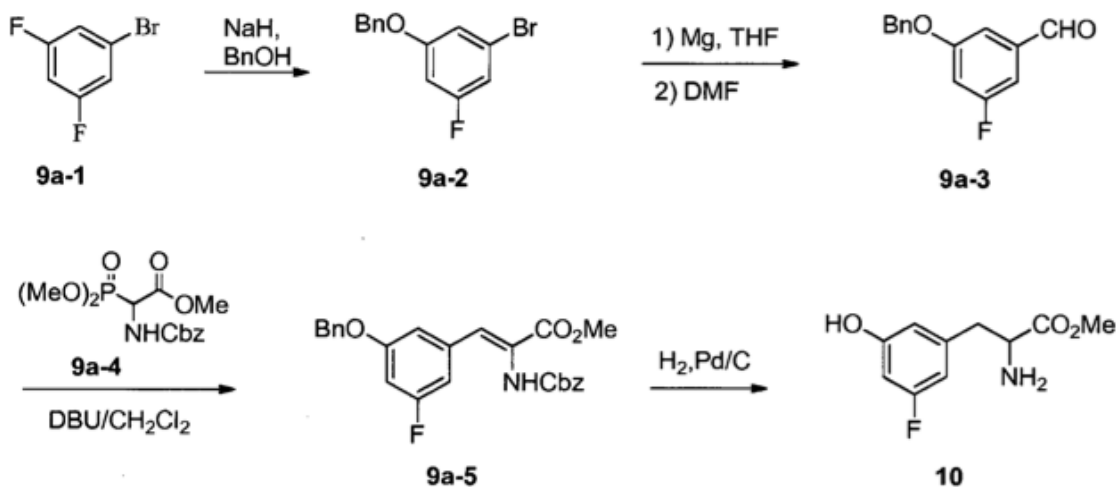
vasket med 1 N HCl, tørket over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrert og konsentrert. Konsentratet ble rensert ved flash-kromatografi på silika for å isolere 9-4.

En løsning av 9-4 (1 g) i MeOH (20 ml) ble hydrogenert over 200 mg 10 % Pd/C ved normalt trykk over natten. Etter at katalysatoren var filtrert fra, ble  
5 løsningen inndampet for å isolere 10.

En løsning av 10 (300 mg, 1,4 mmol) i EtOH (30 ml) ble tilsatt aq. NaOH (2 N, 4 ml), og reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 30 minutter. Løsningsmidlet ble fjernet, konsentratet ble nøytralisert til pH = 6 med 2 N HCl, og de hvite krystallene som dannet seg ble filtrert fra for å isolere  
10 målforbindelsen 9.

Alternativ framgangsmåte for metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat (10)

(3,5-difluorbrombenzen (9a-1) ble innkjøpt fra Darui Fine Chemicals Co., Ltd., (Shanghai, China) og kan også kjøpes fra Alfa Aesar eller Sigma  
15 Aldrich.)



Framstilling av 9a-2

En løsning av BnOH (1,61 ml, 15,54 mmol) i DMF (30 ml) ble tilsatt NaH (622 mg, 60 % dispersjon i mineralolje, 15,54 mmol) ved 0 °C. Omrøringen  
20 fortsatte ved romtemperatur i 0,5 time inntil løsningen var klar. Det ble tilsatt 9a-1 (1,79 ml, 15,54 mmol) med en slik hastighet at temperaturen holdt seg under 40 °C. Blandingen ble omrørt ved romtemperatur over natten slik at det dannet seg en gul løsning. Reaksjonen ble stoppet med vann og blandingen ble ekstrahert med petroleter (35 ml x 4). De sammenslåtte organiske sjiktene ble konsentrert.

Og konsentratet ble renset ved kromatografi på silikagel med petroleter som elueringsmiddel for å isolere 9a-2 (2,544 g) i form av en fargeløs olje.

#### Framstilling av 9a-3

Mg (170,1 mg, 7,10 mmol), vannfri THF (10 ml) og en liten mengde jod  
5 ble blandet under nitrogen i en trehalset kolbe. Det ble tilsatt 1/3 av 9a-2 (1,664 g, 5,9192 mmol) i THF (2 ml). Blandingen ble oppvarmet til reflux. Imens ble den gule blandingen gradvis lysegul. Så ble de resterende 2/3 av 9a-2 tilsatt dråpevis, og reaksjonsblandingen ble refluxert i 0,5 timer til.

Den ovennevnte blandingen ble tilsatt DMF (0,504 ml, 6,51 mmol)  
10 langsomt ved 0 °C. Omrøringen fortsatte i 0,5 time ved romtemperatur. Det ble tilsatt HCl (2 M, 10 ml) og THF ble inndampet. Konsentratet ble ekstrahert med etylacetat (25 ml x 3). Og de sammenslåtte organiske sjiktene ble vasket med saltløsning og konsentrert i vakuum. Konsentratet ble renset ved kromatografi på silikagel med petroleter til petroleter/etylacetat = 20/1 som elueringsmiddel for å  
15 isolere 9a-3 (694 mg) i form av en fargeløs olje.

#### Framstilling av 9a-5

En løsning av metyl-2-(benzylkarbonylamino)-2-(dimetoksyfosforyl)-  
acetat, 9a-4 (993 mg, 3,00 mmol) i DCM (30 ml) ble tilsatt DBU (832 µl, 5,57  
mmol) ved romtemperatur. Etter 10 minutter ble det tilsatt 9a-3 (694 mg, 3,01  
20 mmol) og den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time. Løsningen ble vasket med HCl (1 M, 10 ml) og de sammenslåtte organiske sjiktene ble tørket og konsentrert i vakuum. Konsentratet ble renset ved flash-kromatografi på silika (med diklormetan/etylacetat = 10/1 som elueringsmiddel) for å  
isolere 9a-5 (11,1 g).

#### Framstilling av 10

En løsning av 9a-5 (100 mg) i MeOH (50 ml) ble hydrogenert over 20  
mg 10 % Pd/C ved normalt trykk i 2 timer. Etter at katalysatoren var fjernet ved  
filtrering, ble løsningen inndampet for å isolere 10 (33 mg)..

#### Mediumoppskrifter

30 Vannet som ble brukt til å lage mediet ble framstilt ved hjelp av Millipores Elix Analytical Grade Water Purification System.



## SGS startmedium

Bestanddel (og leverandør)	Oppskrift	
Glukose (Sigma, G7021)	7,50	g
Glyserol (Fisher Scientific, G/0650/25)	7,50	g
Gjærekstrakt (Becton Dickinson, 212770)	1,35	g
Maltekstrakt (Becton Dickinson, 218630)	3,75	g
Potetstivelse (løselig) (Sigma, S2004)	7,50	g
NZ-amin A (Sigma, C0626)	2,50	g
Ristet soyamel, Nutrisoy (ADM, 063-160)	2,50	g
L-asparagin (Sigma, A0884)	1,00	g
CaCO <sub>3</sub> (Calcitec, V/40S)	0,05	g
NaCl (Fisher Scientific, S/3160/65)	0,05	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Sigma, P3786)	0,25	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Sigma, P5379)	0,50	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, M7774)	0,10	g
Sporelementløsning B	1,00	ml
Agar	1,00	g
SAG471 skumdemper (GE Silicones, SAG471)	* 0,20	ml
RO H <sub>2</sub> O til sluttvolum på	** 1,00	l

Før steriliseringen ble pH justert til 7,0 med 10 M NaOH/10

M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Sterilisert ved oppvarming til 121 °C, 20–30 min

(autoklaving)

Merknader

\*Skumdemper bare brukt til startgjæringen, IKKE til startkolbene

\*\*Sluttvolumet justert av hensyn til startvolumet

## Sporelementløsning B

Bestanddel	Oppskrift	
------------	-----------	--

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, F8633)	5,00	g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (Sigma, Z0251)	4,00	g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O (Sigma, M8530)	2,00	g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O (Aldrich, 20,919-8)	0,20	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> (Fisher Scientific, A/5720/48)	0,20	g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (Sigma, C2644)	0,10	g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Sigma, B6768)	0,10	g
KI (Alfa Aesar, A12704)	0,05	g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (95 %) (Fluka, 84720)	1,00	ml
RO H <sub>2</sub> O til sluttvolum på	1,00	l

## SGP2 produksjonsmedium

Bestanddel	Oppskrift	
Ristet soyamel (Nutrisoy) (ADM, 063-160)	20,00	g
Glyserol (Fisher Scientific, G/0650/25)	40,00	g
MES-buffer (Acros, 172595000)	19,52	g
SAG471 skumdemper (GE Silicones, SAG471)	*0,20	ml
RO H <sub>2</sub> O til sluttvolum på	**1	l

Før steriliseringen ble pH justert til 6,8 med 10 M NaOH

Sterilisert ved oppvarming til 121 °C, 20–30 min (autoklaving)

Merknader

\*Skumdemper bare brukt til startgjæringen, IKKE til startkolbene

\*\*Sluttvolumet justert av hensyn til startvolumet

## SM25-3-medium (også kalt SM25)

Bestanddel

Glyserol (Fisher Scientific, G/0650/25)	40 g
Soyapepton A3 SC (Organotechnie)	10 g
Maltekstrakt (Difco)	21 g
Justert til volum	1 l
pH ikke justert før steriliseringen (dvs. pH var 7,0)	

#### ISP4-medium

##### Bestanddel

Løselig stivelse (Difco)	10 g
$K_2HPO_4$	1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
NaCl	1 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
$CaCO_3$	2 g
ISP sporsaltløsning	1 ml
Agar	20 g
Justert til volum	1 l

Lag en pasta med stivelsen i et lite volum kaldt vann og juster volumet til 500 ml.

Tilsett de andre bestanddelene til løsning II i 500 ml vann. pH må være mellom 7,0 og 7,4 (pH 7,3). Bland de to løsningene sammen og tilsett agar.

#### ISP sporsalter

##### Bestanddel

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1 g
Justert til volum	1 l

Oppbevares ved 4 grader C

#### Havremelagar (ISP3)

Bestanddel	Oppskrift	
Havremel	20,00	g
ISP sporelementløsning	1,00	ml
Bacto Agar (Becton Dickinson)	18,00	g
RO H <sub>2</sub> O for justering til volum	1,00	l
20 g havremel kokes i 1 l vann på varmeplate (eller mikrobølgeovn) i 20 minutter. Den kokte blandingen filtreres gjennom musselin/bomullsgaze, justeres til pH 7,2 og volum 1 l. Det tilsettes 1 ml ISP sporelementløsning. Så tilsettes 18 g agar per liter før steriliseringen.		

## MAM-agar

Bestanddel	Oppskrift	
Hvetestivelse (Sigma)	10,00	g
Maisstøpepulver (Roquette)	2,50	g
Gjærekstrakt (Becton Dickinson)	3,00	g
CaCO <sub>3</sub> (Calcitec)	3,00	g
FeSO <sub>4</sub> (Sigma)	0,300	g
Bacto Agar (Becton Dickinson)	20,00	g
RO H <sub>2</sub> O for justering til volum	1,00	l
pH 5,8 før autoklaveringen		

## BT6 produksjonsmedium

Bestanddel	Oppskrift	
Glukose (Sigma)	50,00	g
Nutrisoy (ADM)	30,00	g
NaCl (Fisher)	5,00	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Sigma)	3,00	g
CaCO <sub>3</sub> (Calcitec)	6,00	g
RO H <sub>2</sub> O for justering til volum	1,00	l
Juster pH til 7,0 og tilsett så CaCO <sub>3</sub>		

## ISP2-agar

Bestandsdel	Oppskrift	
Gjærekstrakt (Becton Dickinson)	4,00	g
Maltekstrakt (Becton Dickinson)	10,0	g
Dekstrose (Sigma)	4,00	g
Bacto Agar (Becton Dickinson)	20,0	g
RO H <sub>2</sub> O for justering til volum	1,00	l

Juster pH til 7,3 før tilsetning av agar og sterilisering

Generell framgangsmåte for gjæring

Kuldekonserverte forråd av sporer fra BIOT-4585

(konstruksjonsmetodikken finnes i eksempel 1) ble tint ved romtemperatur. Det ble  
 5 tillagd vegetative kulturer (startkulturer) ved å overføre 4,0 ml sporeforråd til 400  
 ml medium SM25 i 2 l erlenmeyerkolber med skumplugg. Dyrkingen foregikk i 48  
 timer ved 27 °C og 250 rpm (5,0 cm kast). Fra startkulturen ble det overført 25 ml  
 til 250 ml produksjonsmedium SGP2 + 5 % HP20 i 2 l erlenmeyerkolber med  
 skumplugg. Etter 24 timers dyrking ved 24 °C og 250 rpm (2,5 cm kast) ble 2 ml av  
 10 en 250 mM rasemisk eller 125 mM enantiomerisk ren løsning av den ønskede  
 forløperen (f.eks. (S)-metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat, DL-5-  
 fluor-*meta*-tyrosin (9) eller metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat  
 (10)) i 1 M saltsyre og 2 ml av en 250 mM metanolløsning av DL-piperazinsyre  
 tilsatt til hver produksjonskolbe for å lage en endelig 1 mM konsentrasjon av de  
 15 individuelle enantiomerene av forløperne. Eventuelt kan DMSO brukes i stedet for  
 1 M saltsyre. DL-piperazinsyre kan eventuelt utelates. Dyrkingen fortsatte i fire  
 dager til ved 24 °C og 250 rpm (2,5 cm kast).

Analyse av dyrkingsbuljonger ved LC-UV og LC-UV-MS

20 Dyrkingsbuljong (1 ml) blandes med etylacetat (1 ml) og omrøres først i  
 15–30 minutter og så sentrifugeres blandingen i 10 minutter. 0,4 ml av det  
 organiske sjiktet skilles fra, inndampes til tørrhet og løses igjen i 0,20 ml  
 acetonitril.

HPLC-forhold:

- C18-kolonne: C18 Hyperclone BDS, 3u, 4,6 mm x 150 mm  
Utstyrt med en C18 Security Guard-kassett (KJ0-4282) fra  
Phenomenex Analytical
- 5 Kolonnetemperatur 50 °C  
Væskehastighet 1 ml/min  
Overvåk UV ved 240 nm.  
Injiser 20 µl porsjon.  
Løsningsmiddelgradient:  
0 min: 55 % B
- 10 1,0 min: 55 % B  
6,5 min: 100 % B  
10,0 min: 100 % B  
10,05 min: 55 % B  
13,0 min: 55 % B
- 15 Løsningsmiddel A er vann + 0,1 % maursyre.  
Løsningsmiddel B er acetonitril + 0,1 % maursyre.  
Under disse forholdene elueres SfA etter 5,5 minutter.  
Under disse forholdene elueres SfB etter 6,5 minutter.
- 20 LCMS utføres på et integrert Agilent HP1100 HPLC-system kombinert  
med et Bruker Daltonics Esquire 3000+ elektropraymassespektrometer som  
arbeider i positiv ionemodus med kromatografi og løsninger som beskrevet  
ovenfor.
- 25 QC LC-MS-metode  
HPLC-forhold:  
C18-kolonne: C18 Hyperclone BDS, 3u, 4,6 mm x 150 mm  
Utstyrt med en C18 Security Guard-kassett (KJ0-4282) fra  
Phenomenex Analytical
- 30 Kolonnetemperatur 50 °C  
Væskestrøm 1 ml/min  
Overvåk UV ved 210, 240 og 254 nm

Løsningsmiddelgradient:

0 min: 10 % B

2,0 min: 10 % B

15 min: 100 % B

5 17 min: 100 % B

17,05 min: 10 % B

20 min: 10 % B

Løsningsmiddel A er vann + 0,1 % maursyre

Løsningsmiddel B er acetonitril + 0,1 % maursyre

10 MS-forhold:

MS arbeider i vekslende modus (veksler mellom positiv og negativ), skanner fra 150 til 1500 amu.

Røntgendiffraksjonsmetode (XRPD)

15 Omtrent 2 mg prøve ble trykt forsiktig sammen på den enkle skråkuttete XRPD-prøveholderen i kvarts med null bakgrunn. Så ble prøven lagt i et Philips X-Pert MPD diffraktometer og analysert med følgende forsøksforhold:

Røranode: Cu

Generatorspenning: 40 kV

20 Rørstrømstyrke: 40 mA

Bølgelengde alfa1: 1,5406 Å

Bølgelengde alfa2: 1,5444 Å

Startvinkel [2 theta]: 5

Sluttvinkel [2 theta]: 50

25 Kontinuerlig skanning

#### Replikonanalyse in vitro for å evaluere aktivitet mot HCV-virus

Effektiviteten mot HCV-virus av genotype 1 kan testes som følger: Ett døgn før testobjektet tilsettes, ble Huh5.2-celler som inneholdt HCV-genotype 1b-replikonet l389luc-ubi-neo/NS3-3'/5.1 (Vrolijk m.fl., 2003) og var subkulturdyrket i 30 cellevekstmedium [DMEM (kat.-nr. 41965039) tilsatt 10 % FCS, 1 % ikke-essensielle aminosyrer (11140035), 1 % penicillin/streptomycin (15140148) og 2

% Geneticin (10131027); Invitrogen] med forholdstall 1,3–1,4 og dyrket i 3–4 dager i 75 cm<sup>2</sup> vevskulturkolber (Techno Plastic Products), høstet og sådd i analysemedium (DMEM, 10 % FCS, 1 % ikke-essensielle aminosyrer, 1 % penicillin/streptomycin) med tetthet 6500 celler/brønn (100 µl/brønn) i 96-brønners mikrotiterplater for vevskulturer (Falcon, Becton Dickinson for evaluering av den antimetabolittiske virkningen og CulturPlate, Perkin Elmer for evaluering av den antivirale virkningen). Mikrotiterplatene inkuberes over natten (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95–99 % relativ luftfuktighet), noe som ga et ikke-konfluent cellemonolag.

Det lages til fortyningsserier, og hver fortyningsserie utføres minst i duplikat. Etter analyseoppsettet inkuberes mikrotiterplatene i 72 timer (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95–99 % relativ luftfuktighet).

For å evaluere de antimetabolittiske virkningene aspireres analysemediet, erstattes med 75 µl av en 5 % løsning av MTS (Promega) i fenolrødfritt medium og inkuberes i 1,5 time (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95–99 % relativ luftfuktighet). Absorbansen måles ved bølgelengden 498 nm (Safire<sup>2</sup>, Tecan) og den optiske tettheten (OD-verdier) regnes om til prosentandel av ubehandlede kontroller.

For å evaluere virkningen mot virus aspireres analysemediet og cellemonolagene vaskes med PBS. Vaskebufferen aspireres og 25 µl Glo Lysis Buffer (kat.-nr. E2661, Promega) tilsettes før man lar lyseringen skride fram i 5 minutter ved romtemperatur. Deretter tilsettes 50 µl Luciferase Assay System (kat.-nr. E1501, Promega) og luminescenssignalet fra luciferasen måles umiddelbart (1000 ms integreringstid/brønn, Safire<sup>2</sup>, Tecan). De relative luminescensenhetene omregnes til prosentandel ubehandlede kontroller.

EC<sub>50</sub> og EC<sub>90</sub> (verdier bestemt ut fra doseresponskurvene) står for konsentrasjonene der det observeres henholdsvis 50 og 90 % hemming av virusreplikasjonen. CC<sub>50</sub> (verdi avledet av doseresponskurven) står for konsentrasjonen der stoffskifteaktiviteten til cellene ville være redusert til 50 % av aktiviteten til ubehandlede celler. Selektivitetsindeksen (SI), som angir det terapeutiske vinduet for forbindelsen, beregnes som CC<sub>50</sub>/EC<sub>50</sub>.

En konsentrasjon av forbindelsen regnes for å gi reell antiviral virkning i replikonsystemet til HCV hvis antireplikonvirkningen ved akkurat den



konsentrasjonen er over 70 %-terskelen og det ikke observeres mer enn 30 % reduksjon i stoffskifteaktiviteten.

#### Replikonanalyse in vitro for å evaluere aktiviteten mot HCV i genotype

##### 5 1a og 2a

Replikoncellene (subgenomiske replikon av genotype 1a (H77) og 2a (JFH-1)) dyrkes i Dulbeccos modifiserte essensielle medium (DMEM), 10 % kalvefosterserum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin (pen-strep), 1 % glutamin, 1 % ikke-essensielle aminosyrer, 250 µg/ml G418 i en 5 % CO<sub>2</sub>-inkubator ved 37 °C. 10 Alle celledyrkingsreagensene kan kjøpes inn fra Mediatech (Herndon, VA, USA).

Replikoncellene trypsiniseres og sås med  $5 \times 10^3$  celler per brønn i 96-brønners plater med det ovennevnte mediet unntatt G418. Neste dag erstattes dyrkingsmediet med DMEM som inneholdt forbindelser seriefortynnet i nærvær av 5 % FBS. I antiviralanalysen mot HCV-replikoner undersøkes virkningen av 15 forbindelser i en serie av fortyninger. Kort sagt sås celler som inneholder HCV-replikonet i 96-brønners plater. Testobjektet seriefortynnes med DMEM pluss 5 % FBS. Den fortynnede forbindelsen påføres passende brønner i platen. Etter 72 timers inkubering ved 37 °C behandles cellene. Det intracellulære RNA-et fra hver brønn trekkes ut med et RNeast 96-sett (Qiagen). Konsentrasjonen av RNA fra 20 HCV bestemmes ved en sanntids PCR-analyse med omvendt transkriptase ved hjelp av TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), og et ABI Prism 7900 sekvensdetekteringssystem (Applied Biosystems) som beskrevet før (Vroljik m.fl., 2003). Den cytotoksiske virkningen måles med TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents (Applied Biosystems) 25 som indikerer celleantall. Mengden av HCV-RNA og ribosom-RNA brukes så til å utlede gjeldende IC<sub>50</sub>-verdier (konsentrasjoner som hemmer replikonreplikasjonen 50 %).

#### Vurdering av mikrosomstoffskiftet (analyse av mikrosomstabiliteten)

Stoffskiftet i mikrosomer kan testes som følger:

30 Murine eller humane levermikrosomer ble fortynnet med buffer C (0,1 M kaliumfosfatbuffer, 1,0 mM EDTA, pH 7,4) til en konsentrasjon på 2,5 mg/ml. Så ble det lagd til mikrosomstabilitetsprøver ved å tilsette 50 µl av en 5 µM

forbindelsesanrikingsløsning (0,5 µl 10 mM forrådsløsning av DMSO i 9,5 µl ACN, tilsatt til 990 µl buffer C) til 50 µl mikrosomløsning (2,5 mg/ml), 110 µl buffer C og blande godt. Alle prøvene ble preinkubert i omtrent 15 minutter ved 37 °C. Deretter ble reaksjonen startet ved å tilsette 40 µl av NADPH-løsningen (12,5 mM) og røre om forsiktig. Det ble tatt ut porsjoner (40 µl) etter 0, 15, 30, 45 og 60 minutter der reaksjonen ble stoppet med ACN-holdig intern standard (120 µl). Protein ble fjernet ved sentrifugering (4000 rpm, 15 min), og konsentrasjonen av forbindelsen på prøveplaten ble analysert ved LC-MS/MS. Så ble halveringstidene beregnet med standard framgangsmåte, sammenlikne konsentrasjonen av analytten med mengden som var til stede opprinnelig.

#### Vurdering av stabiliteten til hepatocytterne

Kuldekonserverte hepatocytter, som tidligere var oppbevart i flytende nitrogen, legges i et ristende vannbad ved 37 ±1 °C for tining i 2 min ±15 sek. Så legges hepatocytterne i et 10x volum av forhåndsvarmet Krebs-Henseleit bikarbonatbuffer (KHB, 2000 mg/l glukose, ingen kalsiumkarbonat og natriumbikarbonat, Sigma), som blandes forsiktig og sentrifugeres ved 500 rpm i 3 minutter. Deretter fjernes og kastes supernatanten. Cellenes levedyktighet og antall bestemmes ved telling, og disse verdiene brukes til å lage humane hepatocyttsuspensjoner i passende såingstetthet (tetthet av levedyktige celler = 2 x 10<sup>6</sup> celler/ml). En 2x doseringsløsning framstilles i forhåndsvarmet KHB (1 % DMSO) (200 µM sporstoffløsning: 20 µl substratforrådsløsning (10 mM) i 980 µl DMSO, 2x doseringsløsning: 10 µl av 200 µM sporstoffløsning i 990 µl KHB (2 µM etter fortynning).

50 µl forhåndsvarmet 2x doseringsløsning legges i brønnene og 50 µl forhåndsvarmet hepatocytlløsning (2 x 10<sup>6</sup> celler/ml) tilsettes og klokka startes. Så inkuberes platen ved 37 °C. Hver av brønnene tilsettes 100 µl acetonitrilholdig intern standard etter gjennomført inkuberingstid (0, 15, 30, 60 og 120 minutter), det omrøres forsiktig og tilsettes så 50 µl forhåndsvarmet hepatocytlløsning (2 x 10<sup>6</sup> celler/ml). Når inkuberingen er slutt, bestemmes cellelevedyktigheten. Prøvene sentrifugeres ved 4000 rpm i 15 minutter ved 4 °C, supernatantene fortynnes 2

ganger med ultrarent vann og konsentrasjonen av forbindelsene analyseres ved LC-MS/MS.

#### Vurdering av vannløseligheten

5 Vannløseligheten kan testes som følger: Det lages en 10 mM forrådsløsning av sanglifehrinanalogen i 100 % DMSO ved romtemperatur. Triplikatporsjoner på 0,01 ml justeres til 0,5 ml enten med 0,1 M PBS-løsning, pH 7,3 eller 100 % DMSO i brune glass. De resulterende 0,2 mM løsningene ristes ved romtemperatur på et IKA® Vibrax VXR risteapparat i 6 timer, og så overføres

10 de resulterende løsningene eller suspensjonene til 2 ml eppendorfrør og sentrifugeres i 30 minutter ved 13200 rpm. Deretter analyseres porsjoner av supernatantvæsken ved LCMS-framgangsmåten som beskrives ovenfor.

Alternativt kan løseligheten i PBS ved pH 7,4 testes som følger: Det lages en kalibreringskurve ved å fortynne testforbindelsene og

15 kontrollforbindelsene til 40 µM, 16 µM, 4 µM, 1,6 µM, 0,4 µM, 0,16 µM, 0,04 µM og 0,002 µM med 50 % MeOH i H<sub>2</sub>O. Så fortynnes standardpunktene videre 1:20 i MeOH:PBS 1:1. De endelige konsentrasjonene etter 1:20 fortynning er 2000 nM, 800 nM, 200 nM, 80 nM, 20 nM, 8 nM, 2 nM og 1 nM. Deretter blandes standarder med samme volum (1:1) av ACN som inneholdt intern standard (hydroksy-

20 makrosyklisk forbindelse, 6). Prøvene sentrifugeres (5 min, 12000 rpm) og så analyseres de ved LC/MS.

	Løsning (µl)	MeOH/H <sub>2</sub> O(1:1) (µl)		Arbeids-løsning (µM)	Løsning (µl)	MeOH/buffer(1:1) (µl)		Endelig løsning
10 mM	10	240	→	400				
400 µM	50	450	→	40	20	380	→	2000
	20	480	→	16	20	380	→	800
40 µM	50	450	→	4	20	380	→	200
16 µM	50	450	→	1,6	20	380	→	80
4 µM	50	450	→	0,4	20	380	→	20
1,6 µM	50	450	→	0,16	20	380	→	8
0,4 µM	50	450	→	0,04	20	380	→	2
0,04_µM	50	950	→	0,002	20	380	→	1

Det lages testforbindelser som forrådsløsninger i DMSO ved 10 mM konsentrasjon. Forrådsløsningene fortynnes i PBS, pH 7,4 i duplikat i 1,5 ml eppendorfrør til en målkonsentrasjon på 100 µM med endelig DMSO-

5 konsentrasjon på 1 % (f.eks. 4 µl 10 mM DMSO forrådsløsning i 396 µl 100 mM fosfatbuffer). Så ristes prøverørene forsiktig i 4 timer ved romtemperatur. Prøvene sentrifugeres (10 min, 15000 rpm) for å felle ut uløste partikler. Supernatantene overføres til nye rør og fortynnes (fortynningsfaktoren for det individuelle

10 testobjektet bekreftes med signalnivået til forbindelsen på det brukte analyseinstrumentet) med PBS. Så blandes de fortynnete prøvene med det samme volumet (1:1) av MeOH. Til slutt blandes prøvene med samme volum (1:1) av ACN som inneholder intern standard (hydroksymakrosyklisk forbindelse, 6) for LC-MS/MS-analyse.

#### 15 Vurdering av cellepermeabiliteten

Cellepermeabiliteten kan testes som følger: Testforbindelsen løses til 10 mM i DMSO før den fortynnes videre i buffer for å lage en endelig 10 µM doseringskonsentrasjon. Fluorescensmarkøres lucifergult inkluderes også for å overvåke membranintegriteten. Så påføres testforbindelsen på toppflaten av

20 Caco-2-cellemonolag og det måles hvordan forbindelsen trenger inn i den basolaterale avdelingen. Dette utføres i motsatt retning (basolateral til topp) for å undersøke den aktive transporten. LC-MS/MS brukes til å måle konsentrasjonen både av testforbindelsen og standardkontrollforbindelsen (som propranolol eller acebutolol).

25

#### Vurdering av farmakokinetikken in vivo

Det kan også brukes in vivo-analyser til å måle den biologiske tilgjengeligheten til en forbindelse. Vanligvis gis en forbindelse til et forsøksdyr (f.eks. mus eller rotte), både intravenøst (i.v.) og oralt (p.o.) og det tas blodprøver

30 med regelmessige mellomrom for å undersøke hvordan plasmakonsentrasjonen av legemidlet varierer over tid. Tidsforløpet til plasmakonsentrasjonen kan brukes til å beregne den absolutte biologiske tilgjengeligheten til forbindelsen som en

prosentandel ved hjelp av standardmodeller. Nedenfor beskrives et eksempel på en typisk protokoll.

Mus doseres med 1, 10 eller 100 mg/kg av forbindelsen ifølge oppfinnelsen eller opphavsforbindelsen i.v. eller p.o. Det tas blodprøver etter 5, 10, 5 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 420 og 2880 minutter, og konsentrasjonen av forbindelsen ifølge oppfinnelsen eller opphavsforbindelsen bestemmes ved HPLC. Så kan tidsforløpet for plasmakonsentrasjonene brukes til å komme fram til nøkkelparametere som arealet under plasmakonsentrasjon/tid-kurven (AUC – som er direkte proporsjonal med den totale mengden uforandret legemiddel som når 10 den systemiske blodsirkulasjonen), høyeste (topp) plasmakonsentrasjon av legemidlet, tidspunktet når høyeste plasmakonsentrasjon nås (topptid), andre faktorer som brukes til å bestemme den biologiske tilgjengeligheten nøyaktig: forbindelsens endelige halveringstid, totalkroppsutskilling, stabilt fordelingsvolum og F%. Så blir disse parameterne analysert med ikke-avdelingsdelte eller 15 avdelingsdelte framgangsmåter for å beregne en prosentvis biologisk tilgjengelighet. Et eksempel på denne typen framgangsmåte finnes i Egorin m.fl., 2002 og referansene i denne.

#### Vurdering av oral og intravenøs farmakokinetikk in vivo (spesifikk framgangsmåte)

For sanglifehrinanaloger analyseres helblod. Forbindelsene formuleres i 5 % etanol/5 % kremofor EL/90 % saltløsning både for p.o. og i.v. administrering. Grupper på 3 CD1 hannmus doseres enten med 1 mg/kg i.v. eller 5 eller 10 mg/kg p.o. Fra vena saphena tas det blodprøver (40 µl) før doseringen og 0,25, 0,5, 2, 8 25 og 24 timer etter som fortynnes med samme mengde dH<sub>2</sub>O og strakes settes på tørris. Prøvene oppbevares ved -70 °C inntil de skal analyseres. Konsentrasjonen av forbindelsen ifølge oppfinnelsen eller opphavsforbindelsen i prøven bestemmes ved LCMS som følger: 20 µl blod:H<sub>2</sub>O (1:1, volumforhold)/farmakokinetikkprøve tilsettes 20 µl intern standard (hydroksylmakrosyklisk forbindelse, 6), 100 ng/ml, 20 30 µl arbeidsløsning/MeOH og 150 µl ACN, vorteksblendes i 1 minutt ved 1500 rpm og sentrifugeres ved 12000 rpm i 5 minutter. Så injiseres supernatanten i LC-MS/MS. Tidsforløpet for blodkonsentrasjonen plottes og brukes til å beregne

arealet under helblodkonsentrasjon/tid-kurven (AUC – som er direkte proporsjonal med den totale mengden uforandret legemiddel som når den systemiske blodsirkulasjonen). Disse verdiene brukes til å beregne farmakokinetiske parametere hvis mulig.

5

#### Vurdering av cytotoxisitet in vitro

Huh-7- og HepG2-celler fra ATCC dyrkes i Dulbeccos modifiserte essensielle medium (DMEM) som inneholdt 10 % kalvefosterserum (FBS), 1 % penicillin-streptomycin (pen-strep) og 1 % glutamin, mens CEM-celler (humane T-celleleukemiceller fra ATCC) dyrkes i RPMI 1640-medium med 10 % FBS, 1 % pen-strep og 1 % glutamin. Ferske humane PBMC isoleres fra helblod fra minst to normale relevansutplukkede donorer. Kort fortalt pelleteres perifere blodceller, vaskes 2–3 ganger ved sentrifugering på lav hastighet og resuspenderes i PBS for å fjerne forurensende blodplater. Så fortynnes de vaskede blodcellene 1:1 med 10  
15 Dulbeccos fofatbufret saltløsning (D-PBS) og legges i lag over 14 ml lymfocytseparasjonsmedium (LSM, cellevekstmedium fra Mediatech, Inc., tetthet  $1,078 \pm 0,002$  g/ml, kat.-nr. 85-072-CL) i et 50 ml sentrifugerør og sentrifugeres i 30 minutter ved 600 G. Bånd av PBMC aspireres forsiktig fra fasegrensen og vaskes deretter 2x med PBS ved sentrifugering på lav hastighet. Etter den siste vasken 20  
telles cellene ved trypanblåttekskludering og resuspenderes med  $1 \times 10^7$  celler/ml i RPMI 1640 tilsatt 15 % kalvefosterserum (FBS), 2 mM L-glutamin, 4 µg/ml PHA-P. Cellene får inkubere i 48–72 timer ved 37 °C. Etter inkuberingen sentrifugeres PBMC og resuspenderes i RPMI 1640 med 15 % FBS, 2 mM L-glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 10 µg/ml gentamycin og 20 U/ml rekombinant 25  
humant IL-2.

Den sammensatte cytotoxisiteten evalueres ved å teste halvlogaritmiske konsentrasjoner av hver forbindelse i triplikat mot cellene som beskrives ovenfor. Celler som inneholdt bare medium ble brukt som cellekontroll (CC). Huh-7- og HepG2-celler sås i 96-brønners plater i konsentrasjon  $5 \times 10^3$  celler per 30  
brønn. Neste dag aspireres mediet og 100 µl tilsvarende medium med 5 % FBS tilsettes. Det lages fortyninger av testlegemidlet med 2x konsentrasjon i

mikrotiterrør og 100 µl av hver konsentrasjon legges i tilsvarende brønner i standardformat. Etter 72 timer behandles cellene for å vurdere cytotoxissiteten.

PBMC fortynnes i ferskt medium og legges i de innerste brønnene i en 96-brønners rundbunnet mikroplate med  $5 \times 10^4$  celler/brønn og volum 100 l.

- 5 Tilsvarende legges  $1 \times 10^4$  CEM-celler i hver brønn. Så tilsettes 100 µl av 2x-preparatene av testlegemidlene i tilsvarende brønner i standardformat. Kulturene opprettholdes i seks til sju døgn før de behandles for å bestemme cytotoxissiteten.

Cytotoxissiteten bestemmes ved hjelp av CytoTox-ONE™ analysesett for homogen membranintegritet (Promega). Analysen måler frigjøringen av  
10 laktatdehydrogenase (LDH) fra celler med skadde membraner i et fluorometrisk homogent format. LDH som frigjøres i dyrkingsmediet måles med en sammenkoblet enzymanalyse som fører til at resazurin omdannes til det fluorescerende produktet resorufin. Fluorescensmengden som produseres er proporsjonal med antall lyserte celler. Seks seriefortynnede konsentrasjoner av  
15 hver forbindelse brukes på cellene for å utlede  $TC_{50}$  (giftig konsentrasjon av legemidlet som senker levedyktigheten til cellene med 50 %) og  $TC_{90}$  (giftig konsentrasjon av legemidlet som senker levedyktigheten til cellene med 90 %), hvis aktuelt.

#### 20 Vurdering av hemmingen av transportørene MDR1 og MRP2 in vitro

Til å vurdere hemmingen og aktiveringen av transportørene MDR1 (P-glykoprotein 1) og MRP2 kan det brukes en in vitro ATPaseanalyse fra Solvo Biotechnology Inc. (Glavinas m.fl., 2003). Forbindelsene (0,1, 1, 10 og 100 µM) inkuberes med MDR1- eller MDR2-membranvesikler både i fravær og nærvær av  
25 vanadat for å studere den potensielle ATPase-aktiveringen. I tillegg utføres det liknende inkubering i nærvær av verapamil/sulfasalazin for å registrere mulig hemming av ATPaseaktiviteten i transportøren. ATPaseaktiviteten måles ved å kvantifisere uorganisk fosfat spektrofotometrisk. Aktiveringen beregnes ut fra den vanadatfølsomme økningen i ATPaseaktivitet. Hemmingen bestemmes som  
30 reduksjonen av verapamil-/sulfasalazinformidlet ATPaseaktivitet.

### Vurdering av hemmingen av Pgp-transportører ved hjelp av MDCK-celler.

For å vurdere hemmingen av P-glykoproteintransportøren (Pgp/MDR1) ble det brukt en ATPaseanalyse in vitro fra Cyprotex. Etter dyrking ble

5 monolagene framstilt ved å skylle både de basolaterale flatene og toppflatene to ganger med buffer ved pH 7,4 og 37 °C. Så ble cellene inkubert med pH 7,4-buffer både i basolateral avdeling og toppavdeling i 40 minutter ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> med relativ luftfuktighet 95 % for å stabilisere de fysiologiske parameterne. For

10 topp til basolateral-studien (A-B) ble bufferen ved pH 7,4 fjernet fra toppavdelingen og erstattet med loperamiddoseløsninger i DMSO med buffer for en endelig loperamidkonsentrasjon på 5 µM (endelig DMSO-konsentrasjon justert til 1 %). Doseringsløsningen inneholdt også den fluorescerende integritetsmarkøren lucifergult. Forsøket ble utført i nærvær og fravær av testforbindelsen (påført både

15 toppavdelingen og den basolaterale avdelingen). For basolateral til topp-studien (B-A) ble P-glykoproteinsubstratet, loperamid (sluttkonsentrasjon 5 µM) lagt i den basolaterale avdelingen. Forsøket ble utført i nærvær og fravær av testforbindelsen (påført både toppavdelingen og den basolaterale). Inkuberingen ble utført i en atmosfære med 5 % CO<sub>2</sub> med relativ luftfuktighet 95 % ved 37 °C i 60 minutter. Etter inkuberingsperioden ble følgeplaten fjernet og topprøvene og de

20 basolaterale prøvene fortynnet for analyse ved LC-MS/MS. Det ble utført en enkelt bestemmelse av konsentrasjonen av hver testforbindelse. På hver plate ble det også undersøkt en positiv kontrollhemmer. Testforbindelsen ble vurdert ved 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 og 50 µM. Integriteten til monolagene gjennom hele forsøket ble sjekket ved å følge gjennomtrengingen av lucifergult med fluorometrisk analyse.

25 Etter analysen ble det beregnet en IC<sub>50</sub>-verdi (dvs. hemmerkonsentrasjon (testlegemiddel) som ga halvparten av maksimal hemmevirkning).

### Vurdering av hemmingen av opptakstransportører in vitro

For å vurdere hemmingen av opptakstransportørene OAT1B1 og

30 OAT1B3 ble det brukt en in vitro-analyse av opptakstransportører fra Solvo Biotechnology Inc. Det ble utført opptaksforsøk med testobjekt (TO) ved 0,068, 0,2, 0,62, 1,8, 5,5, 16,7 og 50 µM på CHO-celler som stabilt uttrykte de humane



SLC-transportørene OATP1B1 og OATP1B3. Den parentale cellelinjen CHO-K ble brukt som negativ kontroll. Cellene ( $1 \times 10^5$  i 200  $\mu$ l 1:1-blanding av Dulbeccos modifiserte Eagles-medium og Hams F-12 DMEM (F-12, Lonza, New Jersey, USA) tilsatt 5 mM natriumbutytrat) ble lagt på standard 96-brønners

5 vevskulturplater og inkubert i 24 timer før forsøket ved 37 °C i en atmosfære på 5 % CO<sub>2</sub> og 95 % luft. Før forsøkene ble mediet aspirert med vakuumsug, cellene ble vasket med 2 x 100  $\mu$ l Krebs-Henseleit-buffer på pH 7,3 (lagd av Sigma-kjemikalier, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Opptaksforsøkene ble utført ved 37 °C i 50  $\mu$ l Krebs-Henseleit-buffer (pH 7,3) som inneholdt probesubstratet og TO

10 eller løsningsmiddel. Konsentrasjonen av organisk løsningsmiddel var den samme i alle brønnene, og var ikke over 1 volum-%. Probesubstratet for OATP1B1-analysen var E3S (0,1  $\mu$ M) og for OATP1B3-analysen Fluo-3 (10  $\mu$ M). Den translokaliserte mengden av probesubstrat ble bestemt for hver brønn i cpm. De relative aktivitetene ble beregnet ut fra formelen:

15

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

Der A = translokalisert substratmengde i nærvær av TO på transfekterte celler, B = translokalisert substratmengde i nærvær av TO på parentale celler, C =

20 translokalisert substratmengde i nærvær av løsningsmiddel på transfekterte veller og D = translokalisert substratmengde i nærvær av løsningsmiddel på parentale celler. IC<sub>50</sub> ble definert som TO-konsentrasjonen som trengtes for å hemme transport av probesubstratet med 50 %. IC<sub>50</sub> ble beregnet ved hjelp av en logistisk likning med tre parametere – en kurve tilpasset den relative aktiviteten plottet mot

25 TO-konsentrasjonen ved ikke-lineær regresjon.

#### Vurdering av hemmingen av efflukstransportører in vitro

For å vurdere hemmingen av efflukstransportørene MRP2, MRP3 og BSEP, ble det brukt en in vitro-analyse av vesikkeltransportører fra Solvo

30 Biotechnology Inc. Testobjektene (TO) (ved 0,068, 0,2, 0,62, 1,8, 5,5, 16,7 og 50  $\mu$ M) ble inkubert med efflukstransporterende membranvesikler (Solvo Biotechnology Inc.) både i fravær og nærvær av 4 mM ATP for å skille mellom

transportørformidlet opptak og passiv diffusjon av TO inn i vesiklene. For MRP2- og MRP3-transportørene ble reaksjonene utført i nærvær av 2 mM glutation. Reaksjonsblandingene ble preinkubert i ti minutter ved 37 °C. Reaksjonene ble startet ved å tilsette 25 µl 12 mM MgATP (4 mM sluttkonsentrasjon i analysen) eller analysebuffer for bakgrunnskontroller. Reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 200 µl iskald vaskebuffer og så filtrere på glassfiberfilter i 96-brønnersformat (filterplate). Den vaskede og tørkede filterplaten ble tilført scintillasjonsbuffer og deretter ble scintillasjonen telt. Probesubstrater var taurokolat (2 µM) for BSEP-vesikler og E<sub>2</sub>17βG (1 µM) for MRP2- og MRP3-vesikler. For alle brønnene ble den translokaliserte mengden av probesubstratet bestemt i cpm-enheter. Relativ aktivitet ble beregnet med følgende likning:

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

Der A = translokalisert substratmengde i nærvær av TO og ATP, B = translokalisert substratmengde i nærvær av TO, C = translokalisert substratmengde i nærvær av løsningsmiddel og ATP, og D = translokalisert substratmengde i nærvær av løsningsmiddel. IC<sub>50</sub> ble definert som TO-konsentrasjonen som trengtes for å hemme transport av probesubstratet med 50 %. IC<sub>50</sub> ble beregnet ved hjelp av en logistisk likning med tre parametere – en kurve tilpasset den relative aktiviteten plottet mot TO-konsentrasjonen ved ikke-lineær regresjon.

#### In vitro-analyse for å vurdere aktiviteten mot HIV

Effektiviteten mot HIV kan testes som følger: CD4+ T-lymfocytter og makrofager fra blod isoleres som beskrevet tidligere (Bobardt m.fl., 2008). Kort fortalt ble humane PBMC isolert fra ferskt blod ved båndutskilling på Ficoll-Hypaque (30 min, 800 g, 25 °C). Primære humane CD4+ T-celler ble isolert fra PBMC ved positivt utvalg med anti-CD4 Dynabeads og deretter frigjort med Detachabead. Cellene bel dyrket i RPMI-medium 1640 (Invitrogen) tilsatt 10 % FCS, MEM-aminosyrer, L-glutamin, MEM-vitaminer, natriumpyruvat og penicillin pluss streptomycin, og ble deretter aktivert med det bakterielle superantigenet stafylokokkenterotoksin B (SEB, 100 ng/ml) og mitomycin C-drepte PBMC fra en

annen donor (PMBC:CD4-celleforhold 10:1). Tre dager etter stimuleringen ble cellene fordelt 1:2 i medium som inneholdt IL-2 (200 enheter/ml sluttkonsentrasjon).. Så ble kulturene fordelt 1:2 annenhver dag i IL-2-medium og infisert med HIV 7 dager etter stimuleringen. For å produsere primære humane makrofager ble det isolert monocytter fra humane PBMC ved negativt utvalg, og de ble aktivert og dyrket med cellekonsentrasjon  $10^6$ /ml i DMEM, tilsatt 10 % FCS, MEM-aminosyrer, L-glutamin, MEM-vitaminer, natriumpyruvat og penicillin (100 enheter/ml), streptomycin (100 mg/ml) og 50 ng/ml rekombinant human granulocyt/makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) som ble oppbevart ved 37 °C i fuktet atmosfære tilsatt 5 % CO<sub>2</sub>. For å få makrofager fra monocytter lot man cellene feste seg til plast og dyrket dem i 6 dager for å la dem differensiere seg.

CD4+ HeLa-celler, Jurkat-celler, aktiverte CD4+ T-lymfocytter fra perifert blod og makrofager (500 000 celler/100 µl) ble inkubert med pNL4.3-GFP (X4-virus) eller pNL4.3-BaL-GFP (R5-virus) (100 ng p24) i nærvær av økende konsentrasjoner av testobjekt. Førtiåtte timer senere ble infeksjonsgraden målt ved å analysere prosentandelen av GFP-positive celler ved FACS og EC<sub>50</sub> ble beregnet.

#### In vitro-analyse for å vurdere aktiviteten mot HBV

Effektiviteten mot HBV kan testes som følger: HepG2 2.2.15-celler legges på 96-brønners mikrotiterplater. Etter 16–24 timer vaskes det konfluente monolaget av HepG2 2.2.15-celler og mediet byttes ut med fullt medium som inneholder forskjellig konsentrasjon av en testforbindelse i triplikat (f.eks. seks halv-log-konsentrasjoner). Tre dager senere byttes dyrkingsmediet ut med ferskt medium som inneholder de forskjellig fortynnede testforbindelsene. Seks dager etter den første administreringen av testforbindelsen tas cellekultursupernatanten ut, behandles med pronase og brukes så i sanntids kvantitativ TaqMan qPCR-analyse. Det PCR-amplifiserte HBV-DNA-et detekteres i sanntid ved å følge økningen av fluorescenssignalene som skyldes den eksonukleolytiske nedbrytingen av et probemolekyl med dempet fluorescens som hybridiseres til det amplifiserte HBV-DNA-et. For hver PCR-amplifisering lages det samtidig en

standardkurve ved hjelp av fortyninger av rensset HBV-DNA. Den antivirale aktiviteten beregnes ut fra reduksjonen i konsentrasjonen av HBV-DNA ( $IC_{50}$ ). Den terapeutiske indeksen (TI) beregnes som  $TC_{50}/IC_{50}$ .

5                    In vitro-analyse av blandet lymfocytreaksjon (BLR) for å vurdere immunundertrykkende aktivitet

Den immunundertrykkende aktiviteten ble målt som følger: Det ble isolert populasjoner av mononukleære celler ved sentrifugering over Histopaque fra perifert blod (PBMC) hos to normale ubeslektede frivillige donorer (A og B).

10 Cellene ble telt og lagt med  $1 \times 10^5$  celler per brønn i 96 brønners plater i RPMI-media med supplementer og 2 % humant AB-serum.

Dyrkingsforholdene var: cellepopulasjonene A og B alene og en blandet populasjon av cellene A&B i fravær og nærvær av testforbindelsene, hver i 6 forskjellige konsentrasjoner. Forbindelsene ble testet i doser som varierte fra 10  
15  $\mu\text{M}$  til  $0,0001 \mu\text{M}$  i inkremerer på 1 log. Kontrollbrønnene inneholdt en konsentrasjon av bærer (0,5 % DMSO) som var sammenliknbar med konsentrasjonen i brønnene med testforbindelsene. Kulturene ble etablert i triplikat på en 96 brønners plate og inkubert ved  $37^\circ\text{C}$  i 5 %  $\text{CO}_2$  i fuktet atmosfære.  $3\text{H}$ -  
20 tymidin ble tilsatt dag 6 etter at analysen var satt opp og høstet 24 timer senere.

Så ble prolifereringen sammenliknet mellom de forskjellige dyrkingsforholdene.

Evnen til hver fortyning av testforbindelse til å hemme proliferering i BLR ble beregnet som prosent hemming. Dette gjorde det mulig å estimere  $IC_{50}$  (den konsentrasjonen av testforbindelsen som ga 50 % reduksjon av tellinger per minutt). For å beregne  $IC_{50}$  ble X-aksen gjort om til en log-skala. Ikke-lineær  
25 regresjon ble brukt til å tilpasse en kurve til de gjennomsnittlige datapunktene. Det ble valgt en s-formet variabel stigningsverdi.

ELISA-analyse av Cyp-NS5A-interaksjonen

Denne analysen ble brukt til å måle oppbrytingen av Cyp-NS5A-  
30 komplekser, som kan brukes til å vise styrken av interaksjonen med cyklofilin D. Kort fortalt ble rekombinante GST-, GST-CypD- og Con1 NS5A-His-proteiner produsert og rensset som beskrevet før (Chatterji m.fl., 2010). Nunc MaxiSorb 8

brønners strip-plater ble belagt med GST eller GST-CypD i 16 timer ved 4 °C og så blokkert. Rekombinant NS5A-His (1 ng/ml) ble tilsatt til brønnene i 50 µl bindingsbuffer (20 mM Tris pH 7,9, 0,5 M NaCl, 10 % glyserol, 10 mM DTT og 1 % NP-40) i 16 timer ved 4 °C. Så ble innfanget NS5A-His detektert med murine antistoffer mot His (1 µg/ml) (anti-6x His, Clontech) og leporine antimurine antistoffer mot pepperrotperoksidasefosfatase (HRP) (fortynning 1:1000). Alle forsøkene ble utført to ganger med to forskjellige porsjoner av rekombinante CypD- og NS5A-proteiner.

#### 10 Anti-PPIAaseanalyse av cyklofilinhemmingen

En alternativ metodikk for å analysere interaksjonen med cyklofiliner beskrives som følger: PPIaseaktiviteten til rekombinant CypA eller CypD, produsert ved trombinspalting av GST-CypA eller GST-CypD, ble bestemt ved å følge graden av kymotrypsinhydrolyse av *N*-suksinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid. Kymotrypsin hydrolyserer bare transformen av peptidet, konsentrasjonen av cisformen maksimeres fra et forråd løst i trifluoretanol med 470 mM LiCl, og hydrolysen av den begrenses av hastigheten til cis/trans-isomeriseringen. CypA eller CypD ble hensatt for å oppnå likevekt i 1 time ved 5 °C med utvalgt testobjekt der legemiddelkonsentrasjonen lå mellom 0,1 og 20 nM. Reaksjonen ble startet ved å tilsette peptidet og absorbansendringen ble overvåket spektrofotometrisk med 10 datapunkter i sekundet. Hydrolysehastigheten fra blindprøvene (i fravær av CypA eller CypD) ble trukket fra hastighetene i nærvær av CypA eller CypD. Hastigheten i begynnelsen av enzymreaksjonen ble analysert ved første ordens regresjonsanalyse av tidsforløpet for absorbansendringen.

## EKSEMPLER

### Eksempel 1 – Bygge en *sfaA*-delesjonsmutant av *Streptomyces* sp. A92-308110 (DSM9954)

#### 1.1 Bygging av *sfaA*-delesjonskonstruksjonen

5 Det ~7 kb store *EcoRV*-*Stul*-fragmentet av kosmidet TL3006 (SEKV.-IDNR. 3) som omfatter *sfaA* (nukleotidposisjon 14396–21362, sekvensstilknummer FJ809786 i NCBI) ble fjernet ved digererering med *EcoRV* og *Stul* og det resulterende isolerte fragmentet bundet direkte i pKC1139 som fra før var spaltet med *EcoRV* og behandlet med alkalisk fosfatase fra reker (Roche). Dette  
10 plasmidet ble betegnet pSGK268.

Ved hjelp av Red/ET rekombineringssett fra Gene Bridges (katalognummer K006) ble det utført en delesjon i ramme av *sfaA*-genet som befant seg i denne klonen.

(SEKV.-IDNR. 1) SfaA17161f 5'-

15 CGCTCTGTGGCGCCTGGTTTCCAAGCGGCTCGCGGACCGGCACCGGCACATGCATAATTAAC  
CCTCACTAAAGGGCG-3'

(SEKV.-IDNR. 2) SfaA17825r 5'-

TGGATGTATCGTCGCAGGACGCCAGAAATTCACCTGCGACGTCCTCCAGATGCATTAATACGA  
CTCACTATAGGGCTC-3'

20 To oligonukleotider, SfaA17161f og SfaA17825r, ble brukt til å amplifisere neomycinmarkøren fra FRT-PGK-gb2-neo-FRT-mal-DNA-et som følger med settet ved hjelp av KOD-DNA-polymerase. Det resulterende ~1,7 kb store amplifiserte produktet ble isolert ved gelelektroforese og isolert fra gelen med QiaEX-polymer.

25 Plasmidet pSGK268 ble transformert inn i DH10B i *E. coli* med standardmetoder og selektert på plater som inneholdt apramycin (50 µg/ml). Delesjonskonstruksjonen ble innført stort sett etter settprotokollen fra Gene Bridges. En enkelt koloni ble dyrket over natten i 2TY apramycin (50 µg/ml), transformert med plasmidet pRedET (tet) og selektert på apramycin (50 µg/ml) og  
30 tetrasyklin (3 µg/ml) ved 30 °C. Det ble brukt en enkelt koloni til å lage en kultur over natten av denne stammen i 3 ml 2TY apramycin (50 µg/ml) og tetrasyklin (3 µg/ml) ved 30 °C. 0,5 ml av denne kulturen ble brukt til å inokulere 10 ml 2TY apramycin (50 µg/ml) tetrasyklin (3 µg/ml) ved 30 °C og dyrket til en OD<sub>600nm</sub> på

~0,5. 1,4 ml av denne kulturen ble overført til hver av 2 eppendorfrør og 50 µl 10 % arabinose ble tilsatt til det ene røret for å utløse uttrykking av rekombinasjonsproteinene Red/ET. Rørene ble ristet i ~1 time ved 37 °C. Utløste og ikke-utløste celler ble pelletert i en bordsentrifuge og vasket to ganger med avkjølt sterilt vann, med resuspending og sentrifugering for å pelletere cellene hver gang. De resulterende pelletene ble suspendert i omtrent 30–40 µl vann og satt på is. Det 1,7 kb store fragmentet som var isolert tidligere, ble tilsatt både til det utløste og det ikke-utløste røret og overført til 1 mm Biorad elektrokyvetter på is. Prøvene ble elektroporert (Biorad Micropulser på 1,8 kV, resulterende tidskonstant ~4 ms) og tilsatt 1 ml 2TY (uten antibiotika) og blandet for å fjerne cellene fra kyvetten. Cellene ble inkubert i ~3 timer ved 37 °C under risting (50 µg/ml og kanamycin 25 µg/ml og inkubert ved 37 °C over natten. Kolonier fra de utløste prøveplatene ble streket opp på 2TY-plater som inneholdt 50 µg/ml kanamycin for å rense og bekrefte innføringen av kanamycinresistenskassetten. Plasmider ble framstilt fra disse kulturene og spaltet for å bekrefte det ventede plasmidet pSGK270. Så ble plasmidene spaltet med *Nsi*I for å fjerne markørfragmentet og resten bundet igjen for å lage *sfaA*-delesjonskonstruksjonen i ramme pSGK271.

## 1.2 Konjugering av *Streptomyces* sp. A92-308110 (DSM9954) og innføring av en *sfaA*-delesjon

Plasmidet pSGK271 ble transformert i *E. coli* ET 12567 pUZ8002 med standardmetoder og selektert på 2TY-plater som inneholdt apramycin (50 µg/ml), kanamycin (25 µg/ml) og kloramfenikol (10 µg/ml). Den resulterende stammen ble inokulert i 3 ml flytende 2TY som inneholdt apramycin (50 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml) og kloramfenikol (10 µg/ml) og inkubert over natten ved 37 °C, 250 rpm. 0,8 ml av denne kulturen ble brukt til å inokulere 10 ml flytende 2TY som inneholdt apramycin (50 µg/ml), kanamycin (25 µg/ml) og kloramfenikol (10 µg/ml) i et 50 ml Falcon-rør og inkubert ved 37 °C, 250 rpm inntil OD<sub>600nm</sub> ~0,5 var nådd. Den resulterende kulturen ble sentrifugert ved 3500 rpm i 10 minutter ved 4 °C, vasket to ganger med 10 ml 2TY-medium med sentrifugering for å pelletere cellene etter hver vasking. Den resulterende pelleten ble resuspendert i 0,5 ml 2TY og satt på is inntil den skulle brukes. Denne prosessen ble tidsregulert slik at den falt

sammen med den fullstendige framstillingen av *Streptomyces*-sporene som beskrives nedenfor.

Sporer av *Streptomyces* sp. A92-308110 (DSM9954) (Biot-4370) ble høstet fra en 1-2 uker gammel konfluensplate ved å resuspendere dem i ~3 ml 20 % glyserol. Sporene ble sentrifugert (5000 rpm, 10 minutter, romtemperatur) og vasket to ganger med 50 mM TES-buffer før de ble resuspendert i 1 ml 50 mM TES-buffer og fordelt mellom 2 eppendorfrør. Disse rørene ble varmesjokk-behandlet ved 50 °C 10 minutter på vannbad og så tilsatt 0,5 ml 2TY og inkubert i en kompakt Eppendorf Thermomixer ved 37 °C i 4-5 timer.

De framstilte *E. coli* ET12567 pUZ8002 pSGK271 og Biot-4370 ble blandet i blandingsforhold 1:1 (250 µl for hver stamme) og 1:3 (100 µl *E. coli*) og straks spredd på R6-plater og overført til en inkubator ved 37 °C. Etter omtrent 2 timers inkubering ble det lagt et 2 ml lag med sterilt vann som inneholdt nalidiksinsyre over disse platene for å oppnå en endelig konsentrasjon i platene på 25 µg/l. Platene ble returnert til inkubatoren, som holdt 37 °C, og lå der over natten før det ble lagt over 2 ml sterilt vann med apramycin til en endelig konsentrasjon i platene på 20–25 µg/l. Eks-konjugantkolonier som dukket opp etter ~4–7 dager ble lagt flekkvis i ISP4-medium som inneholdt apramycin (25 µg/l) og nalidiksinsyre (25 µg/l) og inkubert ved 37 °C. Så snart det ble observert tilstrekkelig mycelvekst, ble stammene lagt flekkvis igjen i ISP4-medium som inneholdt apramycin (25 µg/l) ved 37 °C der de fikk danne sporer. Så ble stammene subkultivert tre ganger (for å fremme fjerning av det temperaturfølsomme plasmidet) ved å legges flekkvis i ISP4 (uten antibiotika) og inkubere ved 37 °C i 3–4 dager. Til slutt ble stammene lagt flekkvis i ISP og inkubert ved 28 °C for full sporedanning (5–7 dager). Sporene ble høstet og seriefortynnet på ISP-plater ved 28 °C for å kunne velge enkeltkolonier. De sporedannende enkeltkoloniene ble lagt flekkvis dobbelt på ISP4-plater med eller uten apramycin (25 µg/l) for å bekrefte tap av plasmid og man lot dem vokste i ~7 dager før de ble testet på sanglifehrinproduksjon.



### 1.3 Valg av stammer for produksjon av sanglifehrin i Falcon-rør

En enkelt ~7 mm agarplugg av en vel sporulert stamme ble brukt til å inokulere 7 ml sterilt SM25-3 medium og inkubert ved 27 °C og 200 rpm i et risteapparat med 2 tommers kast. Etter 48 timers vekst ble 0,7 ml av denne

5 kulturen overført til et sterilisert Falcon-rør som inneholdt 7 ml SGP2-medium med 5 % HP20-polymer. Kulturene ble dyrket ved 24 °C og 300 rpm på risteinkubator med 1 tommes kast 5 dager før høstingen. 0,8 ml bakteriekultur ble tatt ut og porsjonert i et 2 ml eppendorfrør for å sikre tilstrekkelig dispergering av polymeren gjennom kulturen før porsjoneringen. 0,8 ml acetonitril og 15 µl maursyre ble tilsatt

10 og røret ble omrørt i omtrent 30 minutter. Blandingen ble klarnet ved sentrifugering og 170 µl av ekstraktet ble tatt ut i et HPLC-glass og analysert ved HPLC.

### 1.4 Analyse av stammer for tilbakeføring til naturlig type eller *sfaA*-fenotype

15 Ekstraktene av stammene ble analysert ved HPLC. Stammer som produserte sanglifehrin A og B ble ikke analysert videre siden disse hadde vendt tilbake til den naturlige typen. Stammer som ikke hadde noen produksjon av sanglifehrin A eller B, viste lav konsentrasjon (~1–2 mg/l) av en retensjonstidtopp på 6,5 minutter som viste en sanglifehrinliknende kromofor. Analyse ved LCMS

20 tydet på at denne toppen hadde m/z på 1073, –16 enheter fra det ventede m/z for sanglifehrin. Det ble postulert at denne toppen stammet fra inkorporering av fenylalanin i fravær av metahydroksytyrosin.

Åtte stammer som viste tap av sanglifehrinproduksjon ble så dyrket igjen for å vurdere om den potensielle *sfaA*-mutasjonen kunne komplementeres

25 kjemisk og gjøre det mulig å lage nye sanglifehrin med en mutasyntetisk prosess. Stammene ble dyrket i SM25-3 startmedium i 48 timer før de ble overført til SGP2 produksjonsmedium med 5 % polymer. Etter ytterligere 24 timers vekst ble stammene matet i triplikat med 2 mM DL-*meta*-hydroksytyrosin (100 µl tilsatt av en 0,16 M løsning i 1 M HCl) eller 2 mM L-fenylalanin med en umatet stamme

30 brukt som kontroll. Stammene ble også gitt pipekolsyre (2 mM i metanol) for å øke produktutbyttet. Stammene ble høstet etter ytterligere 4 dagers vekst og utvunnet og analysert ved HPLC. Det ble påvist at metahydroksytyrosin fullstendig

komplementerte *sfaA*-mutasjonen, og når det ble tilsatt L-fenylalanin, økte konsentrasjonen av –16 amu-forbindelsen. Stammen Blot-4585 ble brukt til videre undersøkelser som *sfaA*-delesjonsmutant.

5                    Eksempel 2 – Andre framgangsmåter for å bygge *sfaA*-delesjonskonstruksjonen

Det kan også brukes andre framgangsmåter til å lage *sfaA*-delesjonsmutanter. Eksempler er mutanter som inaktiverer *sfaA*-insersjonen (som eksempel 12 fra WO2010/034243). Denne stammen var generelt som beskrevet i  
10 WO2010/034234, og fikk stammebetegnelsen BIOT-4452.

I en alternativ framgangsmåte for å utføre deleteringen av *sfaA* brukes det to oligonukleotider, 15209F 5'-  
CAGAGAATTTCGCGGTACGGGGCGGACGACAAGGTGTC-3' (SEKV.-IDNR. 4)  
og 17218R 5'-GCGCATGCATGTGCCGGTGCCGGTCCGCGAGCCGCTTGG-3'  
15 (SEKV.-IDNR. 5), til å amplifisere en oppstrøms homologiregion ved hjelp av kosmidet TL3006 (SEKV.-IDNR. 3) som mal og KOD-DNA-polymerase. Det amplifiserte produktet behandles med T4-polynukleotidkinase (NEB) og klones inn i pUC18 som har blitt defosforylert ved behandling med alkalisk fosfatase fra reker (Roche). Den resulterende konstruksjonen sjekkes ved restriksjonsspaltning og  
20 sekvenseres grundig for å sikre at man lager den ønskede sekvensen og at det ikke er innført feil under polymeraseamplifiseringen. Denne konstruksjonen spaltes med *EcoRI* og *NsiI* og produktene analyseres ved gelelektroforese. Det ønskede sekvensholdige båndet (dvs. oppstrøms homologi, ~2 kb) skjæres ut fra gelen og renses ved standardprosedyrer (QiaEX-polymer). En andre serie av  
25 oligonukleotider:

17766F        5'-

CCTCATGCATCTGGAGGACGTCGCAGGTGAATTCTGGGCG-3' (SEKV.-IDNR. 6)

OG 19763R 5'-GGGCAAGCTTCTCCTGGCTGAGCTTGAACATCG-3'  
30 (SEKV.-IDNR. 7) brukes til å amplifisere en nedstrøms homologiregion med kosmidet TL3006 (SEKV.-IDNR. 3) som mal og KOD-DNA-polymerase. Det amplifiserte produktet behandles med T4-polynukleotidkinase (NEB) og klones til

pUC18 som var defosforlyert ved behandling med alkalisk fosfatase fra reker (Roche). Den resulterende konstruksjonen analyseres ved restriksjonsspaltning og sekvenseres grundig for å sikre at man lager den ønskede sekvensen og at det ikke er innført feil under polymeraseamplifisering. Denne konstruksjonen spaltes med *HindIII* og *NsiI*, og produktene analyseres ved gelelektroforese. Det ønskede sekvensholdige båndet (dvs. nedstrøms homologi, ~2 kb) skjæres ut fra gelen og renses ved standardprosedyrer (QiaEX-polymer). Vektoren pKC1139 spaltes med *EcoRI* og *HindIII* og det store vektorfragmentet isoleres ved gelelektroforese og renses ved standardframgangsmåter (QiaEX-polymer). Så klones de isolerte oppstrøms og nedstrøms homologifragmentene inn i dette fragmentet av pKC1139 ved treveis binding for å lage den ønskede *sfaA*-deleteringskonstruksjonen.

I en annen alternativ framgangsmåte for å lage en *sfaA*-deleteringskonstruksjon brukes det kommersiell gensyntese (Genscript eller en annen forhandler) til å lage en konstruksjon som inneholder den ønskede sekvensen (SEKV.-IDNR. 8). Denne kjøpte konstruksjonen spaltes med *BamHI* og *XbaI* for å kutte ut den aktuelle sekvensen, og produktene analyseres ved gelelektroforese. Båndet som inneholder den ønskede sekvensen (~4 kb) skjæres ut fra gelen og renses ved standardprosedyrer. Vektoren pKC1139 spaltes med *BamHI* og *XbaI*, og det store fragmentet isoleres ved gelelektroforese og renses ved standard framgangsmåter. Så bindes de to isolerte fragmentene sammen for å lage den ønskede *sfaA*-deleteringskonstruksjonen.

Disse alternative *sfaA*-deleteringskonstruksjonene føres inn i *Streptomyces* sp. A92-308110 (DSM9954) ved å konjugere og velge den sekundære kryssingen med framgangsmåtene som beskrives i eksempel 1.2. Dyrking og analyse av stammene som bygges på denne måten følger også framgangsmåtene som beskrives i eksempel 1.2.

### Eksempel 3 – Matrisemating av *sfaA*-deleteringsmutanten

Det ble lagd sporeforråd av en mutant deaktivert i *sfaA* (BIOT-4452 eller BIOT-4585) etter dyrking på MAM-, ISP4-, ISP3- eller ISP2-medium og konserverte i 200 g/l glyserol i destillert vann og oppbevart ved -80 °C. Det ble framstilt vegetative kulturer (startkulturer) ved å inokulere sporeforråd (1 volum-%) i 7 ml

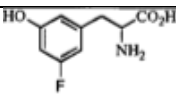
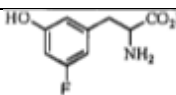
startmedium (SM25-medium) i 50 ml sentrifugerør med skumplugg.

Dyrkingsrørene ble inkubert ved 27 °C, 250 rpm (5 cm kast) i 48 timer. Fra startkulturen ble 10 vol-% overført til 7 ml produksjonsmedium SGP-2 i 50 ml sentrifugerør med skumplugg. Dyrkingen ble utført ved 24 °C og 300 rpm (2,5 cm kast). For produksjon av mutasyntetiske sanglifehrinanaloger ble 0,05 ml av en 0,32 M løsning (i 1 N HCl) av mateforbindelsen (mutasynton) tilsatt til alle rørene 24 timer etter inokuleringen opp til en sluttkonsentrasjon på 2 mM. Dessuten ble 0,05 ml av en 0,32 M løsning av piperazinsyre (i metanol) tilsatt til hvert rør etter 24 timer, opp til en sluttkonsentrasjon på 2 mM. Dyrkingen fortsatte i ytterligere fire dager etter matingen.

Det ble tatt ut prøver ved å overføre 0,8 ml av hele buljongen til et 2 ml eppendorfrør med hette. 0,8 ml acetonitril ble tilsatt sammen med 0,015 ml maursyre før blandingen ble ristet i 30 minutter på en Vibrax. Deretter ble røret sentrifugert ved 13000 rpm i 10 minutter og 0,15 ml av supernatanten ble tatt ut for analyse. Porsjonene ble analysert som beskrevet blant de generelle framgangsmåtene.

Tabell 1 viser mutasyntonene som ble matet på denne måten, sammen med addisjonsproduktene ifølge LCMS H<sup>+</sup> og Na<sup>+</sup>, ventet molekylmasse og retensjonstid for de observerte mutasyntetiske sanglifehrinproduktene. Den viser også de største toppene som gjelder sanglifehrin A-analogene. Det ble også sett LCMS-topper for sanglifehrin B-analoger (masse -18).

Tabell 1

Matet mutasynton	Mutasyntonnavn	[M-H] <sup>-</sup> observert (m/z)	[M+Na] <sup>+</sup> observert (m/z)	molekylmasse (amu)	retensjonstid (minutter)
	2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propansyre	1106,4	1130,4	1107,4	5,7
	metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propionat	1106,4	1130,4	1107,4	5,7

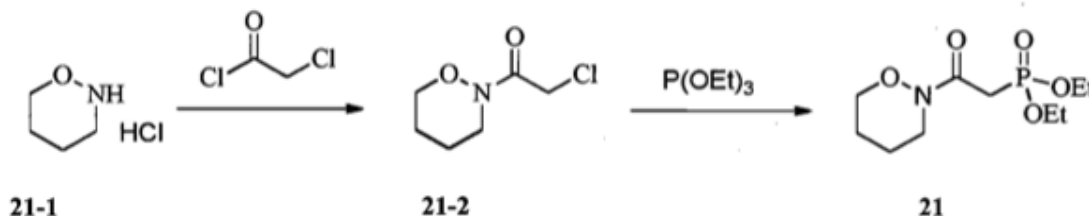
#### Eksempel 4 – Isolere 63-fluorsanglifehrin A, mellomprodukt 14

Gjæringen ble utført som beskrevet i de generelle framgangsmåtene med metyl-2-amino-3-(3-fluor-5-hydroksyfenyl)-propanat og DL-piperazinsyre som  
5 forløpere, begge tilsatt etter 26 timer.

Etter høstingen ble buljongene slått sammen og justert til ca. pH 3 med maursyre og sentrifugert (3300 G) i 25 minutter for å separere cellene og polymer fra den klarede buljongen. Den klarede buljongen ble kastet etter at analysen hadde bekreftet at den inneholdt mindre enn 5 % av målforbindelsen. Cellene og  
10 polymeren ble omrørt med 2 volumer acetonitril i 1 time med magnetrører. Acetonitrilekstraktet ble utvunnet enten ved sentrifugering eller ved tyngdesedimentering. Så ble cellene og polymeren ekstrahert med acetonitril igjen under samme forhold. De sammenslåtte acetonitrilekstraktene ble konsentrert til et vandig restvolum under redusert trykk og så justert til pH 6. Dette ble ekstrahert to  
15 ganger med etylacetat og de sammenslåtte organiske fasene inndampet til tørrhet under redusert trykk for å isolere det endelige urene produktet (1,3 g).

Det urene ekstraktet (1,3 g) ble løst i etylacetat (2 ml) og fylt på en silikagelkolonne (10 x 2 cm) kondisjonert med etylacetat (500 ml). Kolonnen ble eluert med etylacetat og så med trinnvise økninger i aceton (10 %, 20 %, 30 %  
20 osv. i etylacetat). Omtrent 250 ml fraksjoner ble tatt ut og målforbindelsen ble identifisert ved analytisk LC, slått sammen og inndampet til tørrhet. Dette materialet (278 mg) ble løst i metanol (1,8 ml) og rensset ved preparativ HPLC. Det ble brukt en Waters Xterra MSC18-kolonne (10 mikron, 19 cm x 250 mm) og løsningsmidlet ble pumpet med 21 ml/min. Løsningsmiddel A var vann og  
25 løsningsmiddel B var acetonitril. Kolonnen ble kjørt isokratisk med 50 % B i 6 minutter før injeksjonen og en gradient til 100 % B etter den i 30 minutter. Rene fraksjoner ble identifisert ved HPLC-UV og slått sammen. Disse fraksjonene ble inndampet til tørrhet under redusert trykk for å isolere målforbindelsen i form av et hvitaktig fast stoff (20 mg).

Eksempel 5 – Syntese av dietyl-(2-(1,2-oksazinan-2-yl)-2-oksoetyl)-fosfonat

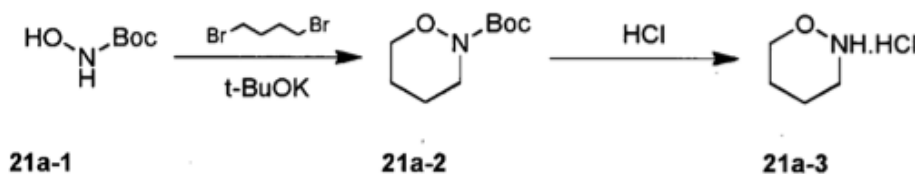


En løsning av 21-1 (ChemCollect, Tyskland) (100 mg, 0,81 mmol), Et<sub>3</sub>N (246 mg, 2,43 mmol) i tørr DCM (5 ml) ble tilsatt kloracetylklorid (138 mg, 1,22 mmol) dråpevis. Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer, helt i isvann og ekstrahert med etylacetat. Det organiske sjiktet ble vasket med saltløsning og tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert, konsentrert i vakuum. Konsentratet (21.2) ble brukt i neste trinn uten videre rensing. (123 mg, 90 % utbytte).

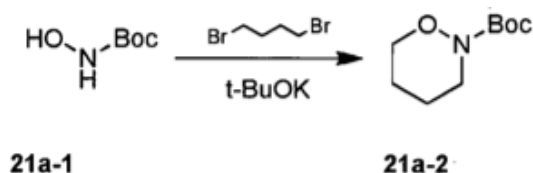
En blanding av 21-2 (123 mg, 0,75 mmol) og trietylfosfitt (250 mg, 1,50 mmol) ble omrørt ved 140 °C i 6 timer. Reaksjonsblandingen ble avkjølt til romtemperatur og renses ved flash-kromatografi for å isolere 21.

Alternativ syntese av dietyl-(2-(1,2-oksazinan-2-yl)-2-oksoetyl)-fosfonat,

15 21



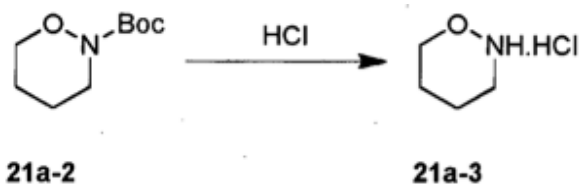
Allmenn prosedyre for å framstille 21a-2



En løsning av *t*-BuOK (84,0 g, 0,75 mol) i tetrahydrofuran (2,0 l) ble tilsatt 21a-1 (50,0 g, 0,38 mol) porsjonsvis ved romtemperatur. Blandingen ble omrørt i 1 time ved romtemperatur. 1,4-dibrombutan (81,2 g, 0,38 mol) ble tilsatt dråpevis ved romtemperatur. Så ble blandingen omrørt ved 80 °C i 16 timer. Etter avkjøling ble det tilsatt vann (2000 ml) og blandingen ble ekstrahert med etylacetat (2 x 1000 ml). De sammenslåtte organiske sjiktene ble tørket over vannfritt

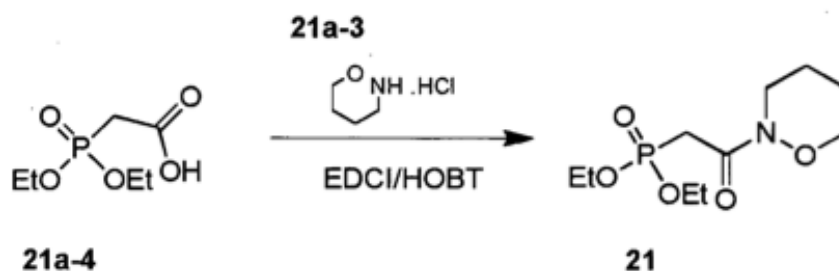
$\text{Na}_2\text{SO}_4$  i 16 timer, og etter at de var filtrert og konsentrert, ble konsentratet rensset ved kolonnekromatografi på silikagel (elueringsmiddel: petroleter:etylacetat = 100:1 til 10:1) for å isolere 21a-2 (57 g) i form av en fargeløs olje.

5 Generell prosedyre for å framstille 21a-3



En løsning av 21a-2 (55 g, 0,29 mol) i *tert*-butylmetyler, TBME (80 ml) ble tilsatt en løsning av 4 N HCl (600 ml, i TBME) ved romtemperatur, og blandingen ble omrørt i 3 timer ved romtemperatur. Det utfelte faste stoffet ble  
10 filtrert fra og vasket med TBME (50 ml) for å isolere 21a-3 (30 g) i form av et hvitt fast stoff.

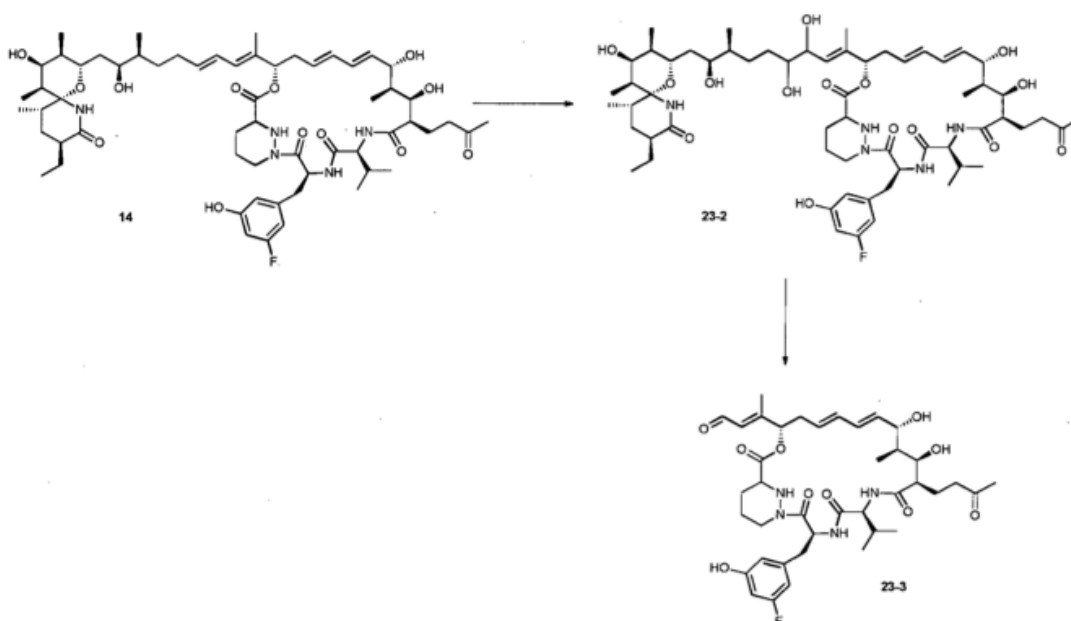
Allmenn prosedyre for å framstille 21



En omrørt løsning av 21a-4 (35 g, 0,18 mol), hydroksybenzotriazol  
15 (HOBT) (29 g, 0,21 mol) og  $\text{Et}_3\text{N}$  (71 ml, 0,51 mol) i vannfritt diklormetan (550 ml) ble tilsatt 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)-karbodiimid (EDCI) (41 g, 0,21 mol) porsjonsvis ved 0 °C, Reaksjonsblandingen ble omrørt ved 0 °C i 0,5 time før den ble tilsatt 21a-3 (24 g, 0,30 mol) ved 0 °C og omrørt i 16 timer. Da viste TLC (petroleter/etylacetat: 3/1) at reaksjonen var fullstendig. På dette tidspunktet ble  
20 reaksjonsblandingen helt langsomt i vann (500 ml) med kraftig omrøring.

Blandingens ble ekstrahert med diklormetan (2 x 200 ml). De sammenslåtte organiske sjiktene ble vasket med saltløsning (2 x 100 ml), tørket over  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrert og konsentrert til et urent produkt. Kromatografi (petroleter/etylacetat, 100:1 til 10:1) ga 21 (38 g) i form av en gul olje.

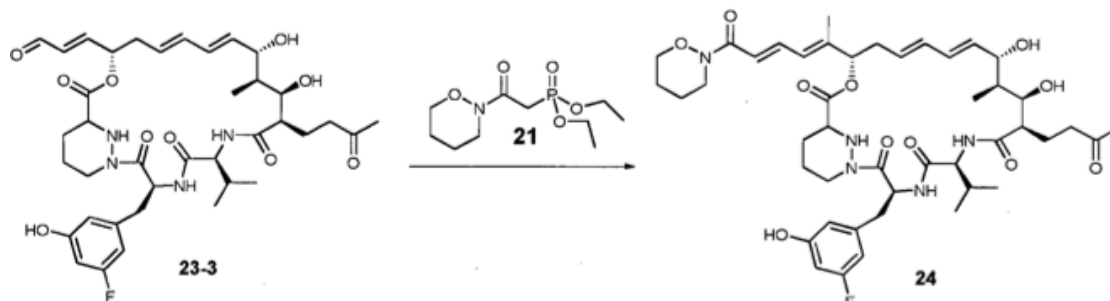
### Eksempel 6 – Framstilling av mellomproduktet 23-3



En omrørt løsning av 14 (430 mg, 0,38 mmol) ble tilsatt (DHQ)<sub>2</sub>PHAL (18,6 mg, 0,024 mmol), osmiumtetroksid (0,156 ml, 0,012 mmol) i *tert*-butanol (2,5 vekt-%, 0,079 mmol/ml) og metansulfonamid (74 mg, 0,77 mmol) i 20 ml *tert*-butanol ved romtemperatur og en løsning av kaliumferricyanid (382 mg, 1,16 mmol) og kaliumkarbonat (160 mg, 1,16 mmol) i 20 ml vann, noe som ga en brun emulsjon. Etter 2 timer ble det tilsatt en løsning av natriumsulfitt og omrøringen fortsatte i 20 minutter. Den resulterende blandingen ble ekstrahert med etylacetat (3 x 50 ml). De sammenslåtte organiske lagene ble vasket med saltløsning, tørket over vannfritt natriumsulfat, filtrert og konsentrert under redusert trykk og renet ved flash-kromatografi med omvendte faser, noe som ga 23-2 i form av et hvitt fast stoff.

En omrørt løsning av 23-2 (240 mg, 0,21 mmol) i 24 ml av en 2:1 blanding av THF og vann ble tilsatt natriumperjodat (91 mg, 0,42 mmol). Blandingene ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer og så tilsatt mettet vandig natriumbikarbonat. Denne blandingen ble ekstrahert med tre porsjoner av etylacetat. De sammenslåtte organiske fasene ble vasket med én porsjon vann og to porsjoner mettet saltløsning og tørket over vannfritt natriumsulfat, filtrert og konsentrert under redusert trykk. Konsentratet ble renet til 23-3 ved flash-kromatografi med omvendte faser.



Eksempel 7 – Framstilling av forbindelse 24

En løsning av 21 (42 mg, 0,168 mmol) i THF (2,0 ml) ble tilsatt NaH (1,2  
 5 mg, 0,05 mmol) i vannfri THF (0,2 ml) ved 0 °C under omrøring. Så ble løsningen  
 omrørt ved 20 °C inntil den klarnet. Deretter ble den klare løsningen tilsatt 23-3 (30  
 mg, 0,042 mmol), og blandingen ble omrørt ved 20 °C i 2 timer. Reaksjonen ble  
 stoppet med vann (10 ml) og blandingen ble ekstrahert med etylacetat (3 x 20 ml).  
 Det organiske sjiktet ble vasket med saltløsning og tørket over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrert og  
 10 konsentrert i vakuum. Konsentratet ble rensert ved preparativ HPLC for å isolere  
 24 i form av et hvitt fast stoff.

Eksempel 8 – Framstilling av forbindelse 24 i fast krystallinsk form (form

I)

15 10 mg av amorf forbindelse 24 ble slemmet opp i metylisobutylketon  
 (MIBK) (500 µl, 50 volumer) og så ble temperaturen sirkulert mellom  
 romtemperatur og 40 °C hver 4. time i totalt 5 dager. Det resulterende faste stoffet  
 ble isolert ved å dekantere av overskudd av løsningsmiddel før det ble tørket  
 under vakuum til forbindelse 24 i krystallinsk form (form I). XRPD-mønsteret går  
 20 fram av tabell 2 nedenfor. Framgangsmåten for å få fram XRPD-dataene er  
 beskrevet i de generelle framgangsmåtene.

Tabell 2

Toppnr.	Posisjon [°2 theta]	Relativ intensitet [%]
1	6,2097	6,86
2	6,5031	7,76
3	8,2581	27,43

4	8,4838	33,64
5	9,5994	23,88
6	10,0981	8,54
7	11,0546	29,76
8	12,5883	14,81
9	13,1703	7,1
10	13,9184	100
11	14,2891	13,04
12	14,9759	10,37
13	15,3159	5,81
14	16,8844	18,15
15	17,1816	9,72
16	17,7384	53,03
17	18,1703	9,02
18	18,5613	32,19
19	19,0241	52,81
20	19,4201	5,08
21	20,0954	13,7
22	20,449	63,25
23	20,8962	43,44
24	21,1871	15,02
25	21,6388	16,08
26	23,0029	50,8
27	23,2869	17,19
28	23,6883	17,16
29	24,1071	13,7
30	24,2587	19,55
31	24,9948	13,34
32	25,209	26,16
33	25,9577	10,06
34	26,4298	9,38

35	27,3687	11,1
36	29,0171	7,95
37	29,5603	5,14
38	30,0609	7,35
39	30,5824	6,5
40	32,1814	4,39
41	32,6521	6,74
42	33,5957	6,6
43	34,7946	9,04

#### Eksempel 9 – Biologiske data – HCV-replikon og analyse

Forbindelsene ble analysert i genotype 1b-replikonanalysen med Huh5.2-celler som beskrevet i de generelle framgangsmåtene. Ciklosporin A, 1, DEBIO-025, 2, sanglifehrin A, 5, og den hydroksymakrosykliske forbindelsen, 6, ble tatt med som sammenlikning.

Forbindelse	EC <sub>50</sub> (µM)	CC <sub>50</sub> (µM)	Selektivitetsindeks
Ciklosporin A, 1	0,62	28	52
DEBIO-025, 2	0,096	11,2	111
Sanglifehrin A, 5	0,318	9,1	28,7
Hydroksymakrosyklisk forbindelse, 6	8,4	83,6	9,9
24	0,033	>100	>3030

Som man kan se er forbindelsen ifølge oppfinnelsen, 24, vesentlig sterkere i Huh5.2-replikonanalysen (som vist ved lav EC<sub>50</sub>), med vesentlig bedre selektivitet mot cellelinjen (som vist ved høy selektivitetsindeks) enn CsA, Debio-025, SfA og den hydroksymakrosykliske forbindelsen.

#### Eksempel 10 – Biologiske data – aktivitet mot HIV

Forbindelsene ble analysert i en HIV-antivirusanalyse med HaLa-celler som beskrevet i de generelle framgangsmåtene. Ciklosporin A, 1, DEBIO-025, 2

og de antivirale midlene mot HIV, emtricitabin og tenofovir ble tatt med som sammenlikning.

Forbindelse	HeLa-celler, EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Ciklosporin A, 1	5,3
DEBIO-025, 2	1,5
Emtricitabin	0,4
Tenofovir	1,05
24	0,13

5 Som man kan se, hemmer forbindelsen ifølge oppfinnelsen, 24, HIV-infeksjon vesentlig sterkere enn CsA, DEBIO-025, emtricitabin eller tenofovir ifølge denne analysen.

#### Eksempel 11 – Biologiske data – murin in vivo-farmakokinetikk oral og

10 iv

For å vurdere farmakokinetikken til forbindelsene i et in vivo-perspektiv, ble forbindelsene dosert med 10 eller 5 mg/kg *po* og 1 mg/kg *iv* på CD1-mus. Det ble utført farmakokinetisk analyse som beskrevet i de generelle metodene. De farmakokinetiske parameterne er framstilt nedenfor.

Forbindelse	Dose (mg/kg)	Utskilling (l/h/kg)	<i>po</i> -AUC <sub> sist</sub> (ng.h/ml)
Sanglifehrin A, 5	10	0,054	2332
24	5	0,017	8223

15

Som man kan se, har forbindelsene 24 lavere utskilling og økt oral eksponering (som den høye *po*-AUC <sub>sist</sub> viser) enn sanglifehrin A.

#### Eksempel 12 – Biologiske data – hemming av CypA PPlase-aktiviteten

20

For å vurdere den direkte hemmingen av aktiviteten til peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase (PPlase) fra CypA ble det brukt en framgangsmåte som

beskrives blant de generelle framgangsmåtene. Ciklosporin A, 1, DEBIO-025, 2 og sanglifehrin A, 5, ble brukt som kontroller.

Forbindelse	CypA PPlase, IC <sub>50</sub> (nM)
Ciklosporin A, 1	9,7
DEBIO-025, 2	0,8
Sanglifehrin A, 5	2,4
24	0,31

Som man kan se, hemmer forbindelsen ifølge oppfinnelsen, 24, CypA PPlase sterkere enn sanglifehrin A, DEBIO-025 eller ciklosporin A.

#### Eksempel 13 – Biologiske data – hemming av bilirubintransportører

For å vurdere den potensielle ikke ønskelige hemmingen av bilirubintransportører, som antas å være årsaken til den dosebegrensende hyperbilirubinemien som opptrer med DEBIO-025, ble transportørhemmingen analysert in vitro som beskrevet i de generelle framgangsmåtene.

Forbindelse	OATP1B1, IC <sub>50</sub> (µM)	OATP1B3, IC <sub>50</sub> (µM)	MRP2, IC <sub>50</sub> (µM)	MRP3 IC <sub>50</sub> (µM)
Ciklosporin A, 1	0,85	0,13	4,1	3,1
DEBIO-025, 2	0,45	0,19	16,0	>50
24	4,3	1,8	>50	>50

Som man kan se, gir forbindelsen ifølge oppfinnelsen, 24, mye mindre hemming av konjugerte og ukonjugerte bilirubintransportører enn DEBIO-025 og ciklosporin A.

#### Eksempel 14 – Biologiske data – hemming av xenobiotiske transportører

For å vurdere potensialet for legemiddelinteraksjoner gjennom hemming av xenobiotiske transportører, ble hemmingen av P-glykoprotein

(Pgp/MDR1) og gallesalteksportpumpen (BSEP) analysert in vitro som beskrevet i de generelle framgangsmåtene.

Forbindelse	Pgp, IC <sub>50</sub> (µM)	BSEP, IC <sub>50</sub> (µM)
Ciklosporin A, 1	0,73	0,46
DEBIO-025, 2	0,72	0,18
24	>50	12,3

Som man kan se, gir forbindelsen ifølge oppfinnelsen, 24, mye mindre hemming av xenobiotiske transportører som potensielt er involvert i legemiddel-interaksjoner, enn DEBIO-025 og ciklosporin A.

#### Referanser

Appel, N., T. Schaller m.fl. (2006) «From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication.» J Biol Chem **281**(15): 9833–6.

Banteli, R., J. Wagner m.fl. (2001) «Synthesis of derivatives of the novel cyclophilin-binding immunosuppressant senglifehrin A with reduced numbers of polar functions.» Bioorg Med Chem Lett **11**(12): 1609–12.

Chatterji, U., M. Bobardt m.fl. (2009). «The isomerase active site of cyclophilin a is critical for HCV replication.» J Biol Chem.

Colgan, J., M. Asmal m.fl. (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 m.fl. (2009). «An evaluation of the cyclophilin inhibitor Debio 025 and its potential as a treatment for chronic hepatitis C.» Expert Opin Investig Drugs **18**(2): 211–20.

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

E. Lawitz, R. R., T. Ngyuen, M. Huang, J. Ke, J. Praestgaard, D. Serra, M. Koziel, T. Evans (2009). «Safety And Antiviral Efficacy Of 14 Days Of The Cyclophilin Inhibitor Nim811 In Combination With Pegylated Interferon .2a In

Relapsed Genotype 1 Hcv Infected Patients.» Journal of Hepatology **50**(S1): S379.

Egorin, M. J., T. F. Lagattuta m.fl. (2002). «Pharmacokinetics, tissue distribution, and metabolism of 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demetoksygeldanamycin (NSC 707545) in CD2F1 mice and Fischer 344 rats.» Cancer Chemother Pharmacol **49**(1): 7–19.

Fehr, T., J. Kallen m.fl. (1999). «Sanglifehrins A, B, C and D, novel cyclophilin-binding compounds isolated from *Streptomyces* sp. A92-308110. II. Structure elucidation, stereochemistry and physico-chemical properties.» J Antibiot (Tokyo) **52**(5): 474–9.

Flisiak, R., A. Horban m.fl. (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., red. (1989). Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Prentice Hall.

Gaither, L. A., Borawski, J., Anderson, L. J., Balabanis, K. A. m.fl., (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.

Gomez, L., H. Thibault m.fl. (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.

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): 1943–50.

Hanoulle, 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.

- Hartel, C., P. Iblher m.fl. (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.
- 5 Herrler, M., H. Bang m.fl. (1994). «Cloning and characterization of ppiB, a *Bacillus subtilis* gene that 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 Sourcher. Nummeret  
10 som kom ut sommeren 2004.
- Immecke, S. N., Baal., N. m.fl. (2011). «The Cyclophilin-Binding Agent Sanglifehrin A Is a Dendritic Cell Chemokine and Migration Inhibitor.» PLoS én **6**(3):e18406.
- Inoue, K., K. Sekiyama, m.fl. (2003). «Combined interferon alpha2b  
15 and cyclosporin A in the treatment of chronic hepatitis C: controlled trial.» J Gastroenterol **38**(6):567–72.
- Inoue, K., T. Umehara, m.fl. (2007). «Evaluation of a cyclophilin inhibitor in hepatitis C virus- infected chimeric mice in vivo.» Hepatology **45**(4): 921–8.
- 20 Ishii, N., K. Watashi, m.fl. (2006). «Diverse effects of cyclosporine on hepatitis C virus strain replication.» J Viral **80**(9): 4510–20.
- Ke, J., E. L., R. Rozier, T. Marbury, N. Nguyen, D. Serra, K. Dole, J. Praestgaard, M. Huang, T. Evans (2009). «Safety, And Tolerability Of Nim811, A Novel Cyclophilin Inhibitor For Hcv, Following Single And Multiple Ascending  
25 Doses In Healthy Volunteers And Hcv-Infected Patients.» Journal of Hepatology **50**(81): 8229.
- Jacobson, I., McHutchison, JG, Sulkowski, M. (2007). Gastroenterol & Hepatol **3**(834): 1–10.
- Kallen, J., R. Sedrani, m.fl. (2005). «Structure of human cyclophilin A  
30 in complex with the novel immunosuppressant sanglifehrin A at 1.6 Å resolution.» J Biol Chem **280**(23): 21965–71.



Kawasaki, H., E. S. Mocarski, m.fl. (2007). «Cyclosporine inhibits mouse cytomegalovirus infection via a cyclophilin-dependent pathway specifically in neural stem/progenitor cells.» J Virol **81**(17): 9013–23.

Konig, J. H., Glaeser, M. Keiser, K. Mandery, U. Klotz og M. F. Fromm (2010); Drug Metab Dispos, 39, 1097–1102.

Manns, M. P., G. R. Foster, m.fl. (2007). «The way forward in HCV treatment--finding the right path.» Nat Rev Drug Discov **6**(12): 991–1000.

Martin Cabrejas, L. M., S. Rohrbach, m.fl. (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.

Mathy, J. E., S. Ma, m.fl. (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.

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.

Millay, D. P., M. A. Sargent, m.fl. (2008). «Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy.» Nat Med **14**(4): 442–7.

Nelson, D. R., Ghalib, R.H., Sulkowski, M., Schiff, E., Rustgi, V., Pockros, P.J., Wang, C., Decosterd Kerhuel, D. og P. Grosgrin, 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**(81): 840.

Niwa, T., Yamamoto, S, Saito, M, Shiraga, T, Takagi, A. (2007). «Effect of Cyclosporine and Tacrolimus on Cytochrome P450 Activities in Human Liver Microsomes.» Yakugaku Zasshi **127**(1): 209–216.

Paeshuysse, J., A. Kaul, m.fl. (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, m.fl. (2007). «Specifically targeted antiviral therapy for hepatitis C virus.» World J Gastroenterol **13**(43): 5673–81.

Pawlotsky, J. M. (2000). «Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy.» Hepatology **32**(5): 889–96.

Pawlotsky, J. M. (2005). «Current and future concepts in hepatitis C therapy.» Semin Liver Dis **25**(1): 72–83.

Pawlotsky, J. M. (2006). «Virology of hepatitis B and C viruses and antiviral targets.» J Hepatol **44**(1 suppl): 810–3.

Pemberton, T. J. og J. E. Kay (2003). «Cyclophilin sensitivity to sanglifehrin A can be correlated to the same specific tryptophan residue as cyclosporin A.» FEBS Lett **555**(2): 335–40.

Pockros, P. (2008). «Emerging Therapies for Chronic Hepatitis C Virus.» Gastroenterol and Hepatology **4**(10): 729–734.

Ptak, R. G., P. A. Gallay, m.fl. (2008). «Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells by Debio-025, a novel cyclophilin binding agent.» Antimicrob Agents Chemother **52**(4): 1302–17.

Qu, X., Jiang, N. m.fl., (2011). «Cloning, sequencing and characterization of the biosynthetic gene cluster of sanglifehrin A, a potent cyclophilin inhibitor.» Mol. Biosyst. **7**:852–861

Robida, J. M., H. B. Nelson, m.fl. (2007). «Characterization of hepatitis C virus subgenomic replicon resistance to cyclosporine in vitro.» J Viral **81**(11): 5829-40.

Hopkins, S. D. H., E. Gavis, J. Lalezari, E. Glutzer, B. DiMassimo, P. Rusnak, S. Wring, C. Smitley, Y. og 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(S 1): 836.

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

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

Sedrani, R., J. Kallen, m.fl. (2003). «Sanglifehrins-cyclophilin interaction: degradation work, synthetic macrocyclic analogues, X-ray crystal structure, and binding data.» J Am Chem Soc **125**(13): 3849-59.

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

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

Steinschulte, C., T. Taner m.fl. (2003). «Cutting edge: sanglifehrins 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, m.fl. (2004). «Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C.» Hepatology **39**(4): 1147–71.

Tropschug, M., I. B. Barthelmess, m.fl. (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, m.fl. (2003). «A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C.» J Viral Methods **110**(2): 201–9.

Wring, S., C. Wille, C. Rewerts, R. Randolph, A. Scribner og S. Hopkins (2010), Journal of Hepatology, **52**, 8263.

Yang, F., J. M. Robotham, m.fl. (2008). «Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro.» J Viral **82**(11): 5269–78.

Zenke, G., U. Strittmatter, m.fl. (2001). «Sanglifehrin A, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action.» J Immunol **166**(12): 7165–71.

5 Zhang, L. H. og 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.

Alle referanser, inkludert patenter og patentsøknader, som omtales i denne søknaden inkorporeres her ved referanse i største mulige utstrekning.

10 Gjennom hele spesifikasjonen og patentkravene nedenfor skal ordet 'innbefatte' og variasjoner av det, som 'innbefatter' eller liknende, forstås slik at det innebærer å inkludere et omtalt heltall eller trinn eller en gruppe av heltall, uten at det utelukker noe annet heltall eller trinn eller noen annen gruppe av heltall eller trinn.

15

Side 1 av 29

## SEKVENSLISTE

- 5 <110> Biotica Technology Limited Moss,  
 Steven James Gregory, Matthew Alan  
 Wilkinson, Barrie
- <120> NY FORBINDELSE OG FRAMGANGSMÅTE FOR Å PRODUSERE DEN
- 10 <130> BOA-P1257PCT
- <150> GB1105293.3  
 <151> 2011-03-29
- 15 <150> GB1113629.8  
 <151> 2011-08-08
- <150> GB1202060.8  
 <151> 2012-02-07
- 20 <160> 8
- <170> PatentIn versjon 3.3
- 25 <210> 1  
 <211> 77  
 <212> DNA  
 <213> Kunstig
- 30 <220>  
 <223> Primer
- <400> 1  
 cgctctgtgg cgcttggtt ccaagcggct cgcggaccgg caccggcaca tgcataatta 60  
 accctcacta aagggcg 77
- 35
- <210> 2  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 40 <213> Kunstig
- <220>  
 <223> Primer
- 45 <400> 2  
 tggatgtatc gtcgcaggac gcccagaatt cacctgcgac gtcctccaga tgcattaata 60  
 cgactcacta tagggctc 78
- 50 <210> 3  
 <211> 46596  
 <212> DNA  
 <213> Kunstig
- 55 <220>  
 <223> Kosmid
- <400> 3  
 acaccggcca caccggcggc ggctgcgtg tgccgatgt tggacttcac cgaaccgagc 60

Side 2 av 29

cacagcggct	cgtecccgctc	ctgcccgtag	gtggcgagca	gcgcctgcgc	ctcgatcggg	120
tcgcccagcc	gggtgcccg	accgtgcgcc	tccaccgggt	ccacgtccgc	ggggtgagc	180
ccggcaccgg	agagcgcctg	acggatcacc	cgctgctgcg	aaggaccgtt	cggggccgtc	240
agaccgttcg	acgogccgtc	ctggttgatc	ggggtgcgcg	gtacgacggc	cagtaacctg	300
tggccgtggc	ggcgggctc	ggagagccgt	tccacgagga	gcatgcgggc	gccctcggac	360
cagccgggtc	cgtcggccgc	ggcggcgaag	gacttgacgc	ggccgtccac	ggccaggccg	420
cgctggcggg	agaagtgcac	gaagacgtcg	ggggcgga	tgacgggtgac	accgccggcc	480
agcgcacatc	agcactcgcc	gctgcgcagc	gcctggatcg	cccagtgcag	ggcgaccagc	540
gacgccgagc	acgcgggtgc	cacggtgacc	gcagggcctt	ccaggccgag	gacgtaggcg	600
atgoggcccg	acagcacgct	ggcggagttg	ccgatgcoga	cgtagccctc	cgcgctctcg	660
acggtcctgc	gcacgagctg	ggcatagtcc	tggccgttgg	tgccgaggtg	gacgccgacg	720
tcgcgcccgc	gcagggactt	cgggtcgatg	ccggcgcggt	cgacggcctc	ccaggcggtc	780
tccagggcca	gccgctgctg	cgggtccatc	gccagcgcct	cgcgcggcga	gatcccgaag	840
aagtcccgct	cgaaccgggc	gacgtccgcg	aggaagccgc	cctccgcgac	gtacgacgtg	900
cccgcgtgct	ccggatccgg	gtggaagagg	cccgcgaggt	cccagccccg	gtcgtcgggg	960
aacggggtga	gcgcgtcgcg	ctcgtcggcg	agcagccgcc	acaggtcctc	gggcgaggtc	1020
acgccgcccg	ggtaccggca	cgccatgccg	acgatgcoga	tgggatcgtc	gtcggcgggg	1080
cgggcgacgg	cgggcaccgg	cgccgtctcc	tgggcgcggt	cgccgaggag	ttcggccagc	1140
aggtggcccg	ccagggagcg	cgggttgggg	tggtcgaaca	cgagggctgc	gggcagggcg	1200
agcccgggtg	cggcggacag	ccggttgccg	agttcgacgg	cggtcagcga	gtcgaagccc	1260
agttccttga	acgcccggcc	gggggtcacg	gcggtgtcgt	cggtgtggcc	gaggaccacg	1320
gcggcgtgcg	agcggacgag	cgtgagcagg	gtccgttgcg	gttccgcggc	ggtgagtccg	1380
gtgagctttc	cggccaggg	gtccggtccg	gcgcccggcg	tggcggcgcg	ccggacgggg	1440
ccacggacca	gccggcgcac	cagcgcgggt	acggcgggtg	cgccgggtggc	gaacgaggtg	1500
aggtccagcc	aggcggggac	gacgacgggg	gcggagccgg	cggtggcgcg	gtcgaacagg	1560
gcgagcgcgt	cgggcgtcgg	cagcggcacc	acgccgtcgc	gggcccgcgc	ccgcaggtcg	1620
gcgccgccca	ggtggccgg	catgccgctg	gcgtgcgccc	acaggccccca	cacctgggag	1680
gtggcgggca	ggccctgggc	gcgccgggtg	gccgcgagcg	cgtccacgaa	ggcgttgccc	1740
gccgcgtagt	tgcctgtcc	gggcgccccg	aagaggccgg	aggtggagga	gaacagcacg	1800
aagacggccc	gccggtgccg	ggcgggtgag	tcggtcaggt	tccaggcggc	gtcgaccttg	1860
gggcggagca	ccttggcgag	ccgctcgggg	gtctgggagg	cgatgacgcc	gtcgtccagg	1920
acgccggcgg	cgtggacgac	tccggtcagg	gggtgctcgg	cggtgatccg	gtcgagcagg	1980

Side 3 av 29

gcgccagtt	cggtgcggtc	ggcggcgctcg	cagggcggcga	cggtcacctc	ggcgccgagg	2040
gcgcgagtt	cgccggcgag	ggtcacggcg	tcgggggccc	cgtcgcccgg	ccgtccggcc	2100
aggaccagcc	ggcgtacgcc	gtgctcgggtg	accagggtggc	gggcgcagag	ggcgccgagc	2160
gtgccggtgc	cgccggtgac	gaggacgacg	ccgtcggacg	gccacagggc	cgctcggctc	2220
gtgggctcgt	cggtgcgcgg	ggcgcggacc	agccgggggtg	cgaggacccc	gccggagcgc	2280
acggcgatct	cggttcgcc	ggtggcgagg	acagcgggca	gctgttgacg	tgcgtcgggg	2340
ccgtcgatgt	cgaccagcac	cagcctgccg	gggtgttcgg	cgcgggcggg	gcgatcagg	2400
ccccacacgg	gcgcgtgggc	gaggtcgggtg	acgtcctcgt	gctcgaccgg	gaccgcggcc	2460
tgggtgagga	cgccagacg	ggtgccggcc	agtgcctcgt	cgcgagcca	ctcctgaaga	2520
gcggtcagca	cgcgccgggc	gccggcggtg	gccgcgccgg	cggtgtcgtc	ggccgactgc	2580
tgccgacacg	gcagcacgag	ggtgccgggc	acggtgtcca	gggcggcgac	ggcgcgagg	2640
tcggggcagg	aggggtatcc	gggcagcggg	aggccgccga	gcacggcgat	gccgtcgacg	2700
tcggcccgcg	gcagcggcac	gggcgtccac	tcgaccgggt	acagctcgtg	gtcgcggccc	2760
gggcccggcc	tggccggcgg	gcgcagggtc	accgcgtcga	cggtgagcac	ggcggtccc	2820
ctgtcgtcgg	tggcgtgcag	ggtgaccgtg	tgctcgccc	cggggtgcag	gcgtacccgc	2880
agccgggtgg	cgcccacggc	gtgcaggggtg	acgcctgcc	aggcggccgg	gaccaggccc	2940
gggtgtacgg	ccgcgagggc	gtcgggtgagc	agggcgggg	gtacgcccc	gccgcccggc	3000
gtctcgtcgg	tcagctcaac	ggtcacgtcg	gtcagctcga	cggtcacgtc	ggtgtccggg	3060
tcccctggcg	cgcgggccc	ggcgggtgcc	gtgtgcggga	ggaggacgcc	ggtcgcgtgc	3120
cggtccaggg	gctggtcgtc	gtcggcgtcg	gcggggcggg	agtggacggc	gaccgggcgg	3180
gcgccgtcct	cgttctccgc	gccaggggtg	acctggaggc	ggcgggcttc	gccgacgggtg	3240
tcgagcgggtg	cctcctcgg	cagttcgccg	agcgtcctgc	cgtcggccc	gtgcagggcc	3300
aggteagta	cggcgcggc	cggcagctcg	gtgccggccc	gcacgcgccc	ggtgaacacc	3360
tgtccgccc	atccggcgag	cggggtgacg	gcgccgagca	gcgggtgcc	ggcgcccgtc	3420
aggcccaggc	cgcgggcgtc	ggaggcgacc	ggcccgctgg	gccagaagcg	gcggcgctgg	3480
aaggcgtagg	tgggcaggtc	gacgtggcgt	ccgtcggggc	agcccaccgt	ccagtcgacg	3540
gacacgccgt	ggacggcggc	ctcggcgagc	gaggtgagga	ggcggcggg	gccgtcctcg	3600
tcggggcggg	gggtgccgac	gacgacggcg	gtccgctcgg	tggcctccgc	cgtctcctgc	3660
acggcgccc	tcagcaccgg	gtgcgggctg	atctccacga	acacggcgtg	gccggagtcg	3720
agcaggccgc	gcaccacggg	ctcgaaccgt	acgggctccc	gcaggttgcg	gtaccagtag	3780
ccggcgtcga	gccgtgtctc	gccgaggggg	ccgccagca	gggtggagtg	gaaggcgatg	3840

Side 4 av 29

ccggcctcac cgggocgcag ttogggcagc gcggcgcgca actcggcttc gagggactcg 3900  
 acatgggccc agtgggaggg gtagtcgacc gcgatgcggc gcagtcgtac cccgtcggcc 3960  
 gaccaggcgg ccatcacctc gtccagcgca tcggggctgc cgctgaggac caccgacgac 4020  
 gggccgttga gggcggcgac gcaaacgcgt ccggaccacg gtgcgagccg ccgtgtgacg 4080  
 gtggcctcgg gcagggcgac ggagaccatg ccgccgcgcc cggccagccg ctcggcgatg 4140  
 agccgcgacc gcagggcgac gatccggggc cgtccgccca gcgacagcac acccgccaca 4200  
 caagcagccg cgatctcccc ctgcgaatga ccgaccacag ccgacggcac gacaccgtac 4260  
 gaacgccaca cctccgcca cgacaccatc accgcccaca acaccggctg aacgacatcc 4320  
 acccgctcca acgccaccgg atcaccagc acaccacgca acgaccagcc cacgaacggc 4380  
 tccaacgcc cgcacactc agccatccgc cccgcgaaca ccggcgacga atccagcaga 4440  
 tccaccgcca tccccacca ctgcgcccc tgaccgggga acacgaacac caccggccc 4500  
 tcaccggca acccggaac acccgacacc acaccctcca ccggctcccc cgggccaac 4560  
 gcgccagag aagcccgcgc accggccaca tcagcggcca ccaccaccgc acgatgcggc 4620  
 aacaacgccc gcgacgggc aagggaccag gagaggtcca ccgggtccag gccgggggtg 4680  
 gtgtcagagt gggcggcgag ccgggtggcc tgctcggcga gggcggcctg ggagcggggc 4740  
 gagagcagcc acggcaccca gcgcgcgcg gcgcccgcgc cgggcggggc cggttccgcc 4800  
 ggggcctcct ccaggatgag gtgggcgttg gtgcgcctgg cgcggaacga cgacacgccc 4860  
 gcgcgcgcg gcgggtcggc cgggggccc agggcggcgc cggtgacgag ttcgacggag 4920  
 ccggaggccc agtcgatgtg cggtgaggg gcgtccacgt gcaggggtgc gggcacttcg 4980  
 ccggcgcgca gcgagagcac cgtcttgatc acgccggcca cgcgcgcgc ggggcgggtg 5040  
 tggccgatgt tggacttcag cgagcccagc cgcagcggct gtgcgcggtc ctggccgtag 5100  
 gtggccagca gggcgttggc ctcgatgggg tcgcccaggg tggtgccggt gccgtgtgcc 5160  
 tccacgacgt cgacgtcggc ggcggtgagg ccggcggcgg ccagcgcgga gcggatgacc 5220  
 cgctgctggg cggagccgtt gggggcggtg agcccggagg aggcgcctc ctggttgatc 5280  
 gccgagccgc ggaccacggc cagcacgggg tggccggtgc gggggcgctc ggacagccgc 5340  
 tccagcacga ccacgcccgc gccctcggac cagccgatgc cgtccgcggc ggcggcgaac 5400  
 gccttgacgc ggcctcggg ggcgaggccg cgtgcgggg agaactccac gaaggcacgc 5460  
 ggggtcgaca tgaccatcac gcgcggcg agggccagcg agcattcggc gctgocgag 5520  
 gactggccgg ccaggtgcag ggogacgagc gaggacgagc aggcgggtgc cacgctgacg 5580  
 gccgggcctt ccaggcogag ggtgtaggcc acccggcgg agagcacgct ggogtagttc 5640  
 ccggtgccga gcagcccctc gtccacggc gcgaccgcgc cgtgccgtga gtcgtagcgc 5700  
 tggtcggtga cgcgcgcaa gacgccggtg gcgctgcgc gcaggccgtg ccgatcgacg 5760



Side 5 av 29

ccggcgtgct	cgaacgcctc	ccaggcgact	tcgaggaaca	gccgctgctg	cgggtccatc	5820
gccagcgcct	cgcgcgggct	gatgccgaag	aagtccggct	cgaagccggc	ggcgtcgttc	5880
aggaagccgc	cctggcgcag	gtagggtgtg	ccggcccggg	ccgggtcggg	gtcgtagagg	5940
ccgtcgaggt	cccagccgcg	gtcggcgggg	aagtccgccg	tgacgtcacg	gccttcggcg	6000
aggagctgcc	acaggtcgtc	ggcgcaggcc	actccgccgg	ggaagcggca	ggccatgccg	6060
accacggcca	gcggctcgtc	ggccgggggtg	gcgcggacgg	cggggcgggc	cgggacgggc	6120
gcgccgtcga	gccgggtgag	cagatggtcg	gtgagggcgg	ccgggttcgg	gtggtcgaag	6180
acgacgtcgc	tgcccagcgt	caggccggtc	gcctcggtea	gcgcgggtcg	cagccgcagg	6240
gaggcgaggg	agtccaagcc	gagggcggcg	aaaccgcggg	gcggttcgat	cgcggcgggg	6300
tcggcgtggc	cgaacacggc	ggcggtcggc	agccgtacca	ggtccatgac	gcggtgccgg	6360
cgttcggcgg	gggtcagccc	ggccagctcg	tcgcgccagg	gcgtgccctc	gtcggcggtc	6420
cgtcgcgcgg	ggagcgcgac	gggggtggcg	gccgggggca	gcgggcgggc	cgctgcgtcc	6480
acgggcggcc	agtaccggtc	gcgctggaag	gcgtacgtcg	gcaggtcggc	cgggtgggct	6540
ccggtgcccc	ggaagaaggc	ggtccagtcg	atgcgcacgc	cgtgcgtgtg	cgctcggcc	6600
aggttggtca	gcagggtcgg	caggccggcc	cggtcgcgct	ggaggggtgcc	gacgaccgcg	6660
gctccggtct	ccgtgcgctc	gacggtctcc	tgggtgccga	cggtcagtac	ggggtgcgga	6720
ctgacctcga	tgaagccccg	gtggccctgg	gcgagcaggg	cggcgcaggc	gtcggcgtag	6780
cggacggggt	cgcgcaggtt	gcgggtaccag	tagccggcgt	ccagcgcgct	gcggtccgcc	6840
cactcccccg	tcacggtgga	gaacagcggg	accgtgccct	caccgcggcg	caagccctcc	6900
agatcagcca	gcagagcctc	acgcaccggc	tccaccagca	ccgaatgcga	ggcatagtcg	6960
acagcgatac	gcggggcccc	caccccccca	cccccgcaat	gagccaggaa	ctcctccagc	7020
gccacccccct	caccgcgcac	gacgaccgac	tcaggaccgt	tgaccgcagc	caccgccaac	7080
cggccccgcc	agcccaccaa	cagctcctcg	acaccggacg	gcccggcagc	gaccgcaccc	7140
atccccccac	tgcccgccag	cgccgtcaaa	gccctgctgc	gcagggcgac	gaccgcggcg	7200
ccgtccgcca	gcgacaacac	accgcgccca	caagcagccg	cgatctcccc	ctgcgaatga	7260
ccgaccacag	ccgacggcac	gacaccgtac	gaacgccaca	cctccgccaa	cgacaccatc	7320
accgcccaca	acaccggctg	aacgacatcc	accgctcca	acgccaccgg	atcaccagc	7380
acaccacgca	acgaccagcc	cacgaacggc	tccaacgcca	ccgcacactc	agccatccgc	7440
cccgcgaaca	ccggcgacga	atccagcaga	tccaccgcca	tccccacca	ctgcgcccc	7500
tgaccocggga	acacgaagac	ggcgcggccg	tcgccgacgg	cgcggcccg	caccacgtcg	7560
gccgactcgg	cgcttcggc	cacggcggtc	aggccggcga	gcaggggtgc	gtggtccgcg	7620

Side 6 av 29

ccgaggacga	ccacgcggtg	ttcgaaggcc	gtacgggtgg	tggcgagggc	gagggccacg	7680
tcgtgggggg	cggcgtcgtg	cgcgggcccg	tggcgagga	ggcgttcggc	ctgggcgcgc	7740
agtccggccg	ccgtccggga	ggacagcgtc	cacgggacga	ccggcagggg	gcggtccgtg	7800
gcctcgtcgg	tgggctcggg	ccgggcgggt	gcctgctcca	ggatggcgtg	ggcgttggtg	7860
ccggacacgc	cgaacgacga	cacgcccgcg	cggcgcggct	gctcccgcgc	cggccagtcc	7920
cgctcctcgg	tgagcagttc	cacggcgccg	gcggtccagt	cgacgtgcgg	tgacgcctcg	7980
tccacgtgga	gcgtgcgcgg	cagcgtgcgg	tggcgcattg	cctgcacccat	cttgatcaca	8040
ccggccacac	cggcggcggc	ctgcgtgtgc	ccgatgttgg	acttcaccga	accgagccac	8100
agcggctcgt	cccgcctcctg	gccgtagggtg	gcgaggaggg	cctgcgcctc	gatcgggtcg	8160
cccagccggg	tgcccgtacc	gtgcgcctcc	acggcgtcga	cctggctcgc	ggccaggcgg	8220
gcgtcggcca	gcgcctggcg	gatcacgcgc	tgctgggcga	gtccgttggg	ggcgggtgagt	8280
ccgctgctcg	cgccgtcctg	gttgatggcg	gtgccgcgga	ccacggccag	cacgggggtg	8340
ccgttgccgc	gggcgtccga	gagccgttcc	aggacgagca	tgcccgcgcc	ctcggcgaag	8400
ccgaaccctg	cggccgcgcg	ggcgaacgcc	ttgcagcggc	cgtcggccgc	gagggcccgc	8460
tgccggctgt	actcgggtgaa	cacgcccggc	gtggacagca	cggtcgcccc	gccgggtgagc	8520
gccagcgtgc	actcccgggc	gcgcagcggg	cggaccgcga	ggtgcagggc	gaccagggac	8580
gaggagcagg	cgggtgtccac	ggagagggcg	gggccctcca	ggccgagggg	gtaggcgacc	8640
cggccggaga	gcacgctggg	cgaggtgccg	gtgacgacgt	accctccag	ctcgggtggc	8700
accgggcccg	tgatgtcggg	gtagtcctcg	ctgctgaagc	cgacgaacac	gccgggtggc	8760
gtggagcgc	ggccggccgg	gtcgtatgcca	gcccgtcca	gggcctccca	tgaggtctcc	8820
agcaccagcc	gctgctgcgg	gtccatggcc	agcgcctcgc	gcgggctgat	gccgaagaag	8880
ccggcgtcga	agtccggggc	gccgtcggg	aatccgcctt	cgcgggcgta	ggaggttccg	8940
ggccgggtcgg	ggtccgggtc	gtagaccgag	gccatgtccc	agccgcggtc	ggcggggaac	9000
gccgagaccg	cgtcgggtccc	atcggtcacc	agccgcacaca	ggtcctcggg	cgaggtcacg	9060
ccgcccgggt	agcggcaggg	catgcccacg	atcgcgatcg	gttcgcggtc	gcgggcctcg	9120
gcctcgcgca	gccggcgccg	ggcgacctgg	agatcgcccg	tgacctgctt	gaggtagtcg	9180
agcagtttg	cctcgtcagc	catcggtgca	ccccctgcg	gttcgttcgg	cgcggtcac	9240
gagacgcccc	ggtcgtatcag	gtcgaagagt	tcgtcggcgg	tgacgccctc	cagagcggcc	9300
cgctcgggtg	tgccgtcggg	cgtgccggcg	tcccagcggg	ccgcgaggtc	ccgcaggtgc	9360
gccgccaccc	gggcgcggtc	ggtgccgtcg	gccggcagtg	cgccgagcgc	gctctccacg	9420
cgggccagtt	cggcgtatgat	ccggtcggcg	ctcgcctcgc	cggactcgtc	cggcaggagc	9480
gcgtcagga	ggtggtcggc	gagcgcggcc	gggttcgggt	ggtcgaacac	gatggtggtg	9540

Side 7 av 29

ggcagtcgca	ggccggtggc	ggtgccgagg	cggttgcgca	gttccacggc	ggtcagcgag	9600
togaagccca	gttccttgaa	gccgcggtcg	ggtgccaccg	cgtcgcgtcc	ccggtgtccc	9660
aggacgtcgg	cgacctggcc	gcggacgacg	tcgagcaggg	cgggggcgcg	ctcgggcgcg	9720
ggcagccccg	tgatccgcgc	caccagggcc	gccgcaccgg	gcaccggggc	ggcggcggcc	9780
gggcccggcc	gggtggcgac	caggccgcgc	agcagcggcg	gggtgggcgc	ggcggaggcg	9840
gtggcgagg	ccaggcgcgc	ggtgacggtc	acggcgtcgc	cggtggcggt	ggccgtgtcg	9900
aacagggcca	gtccttcggc	ggcggccatc	ggcacgatgc	ggttgcggcc	ggcgcggggc	9960
acgtcggcgg	cgtccagggt	ccgggtgagg	ccggtggcgt	cggcccacag	gccccaggcc	10020
goggcggtgc	cgggcaggcc	ggcggcggcg	cgccgttcgg	cgagcgcgtc	gaggaaggcg	10080
ttggcggcgg	cgtagttggc	ctgcgcgggg	gtgccgaggg	tggcccgcgc	ggaggagaac	10140
agcacgaagg	cggacaggtc	cttgtcctcg	gtgagttcgt	gcaggtgcca	ggcggcgtcg	10200
gccttcgggc	gcagtacgcc	cggcagccgg	ccggcggcca	gttcgggtcag	cacgcccgtcg	10260
tcgagggcgc	ccgcggtgtg	caccaccgcg	gtcagcgggg	cctcggcggt	cagcttggcg	10320
agcagcgcgt	cgagggcggc	gcggtcgggt	acgtcgcagg	tctogaagcg	gacggtggcg	10380
cccgcgcgg	ccagttcggc	gaccagggtc	gcgctgccgg	gggcccgggc	gcccgcggcg	10440
ctggccagca	ccaggtcacg	ggcgcggtgt	tcggacacca	gatgccgggc	gagcatgccg	10500
ccgagcacgc	cggcggcgg	gatcaggacg	gtgccgtcgg	cgtacggggc	gacggtgagc	10560
acgatcttgc	cggtgtgccg	ggcctgggcc	atgaaccgga	acgcggtgog	cgcgtcggcg	10620
aggggcccag	tccgggtggg	cagcccggtc	agctcggccc	cctcggcggt	ggcgcgacc	10680
tcggtcagca	ggctctggac	gcggtcgggg	ccggcgtcca	gcagcaggtc	gaacgggagg	10740
tagtcgacac	cgggcaggcc	ggcgggggtcg	cggcgggtcgg	tcttgccgag	ttccacgaac	10800
cgtccgcccg	gacggagcag	tcgcagcgac	gcgtccacga	actcaccogt	gagggagttc	10860
agcacgacgt	ccatctccgg	gaaccgctgc	gcgaactccg	tatcccgcga	cgacgccaca	10920
cgcgcctcgt	ccagaccggc	cgcccgcagc	acctcgtgct	tgcggggact	cgccgtcgca	10980
tacacctcgg	cgcccagcag	ccgcgccacc	cgcacccggc	ccatgcccac	accaccggcc	11040
gccgcgtgca	ccagcaccgg	ctccccggcc	cgcacccggc	ccacatcgcg	cagcgcgaac	11100
caggcgggtg	cgaacacgga	cggcagggcc	gcggcgcgga	cccaggacca	gccggcggga	11160
acgggcacca	cgagcccggc	gtccaccacg	gcgaggggtc	cgaagccggc	cggcaccatg	11220
ccgaggactc	ggtcgcggac	ggcaggtcgg	gtgaogtccg	ggcgcaccgc	gaccacggtg	11280
cccgcggcct	cggagccgat	cgcgtcgacc	tcgtccgggt	acatgtcgag	cgcgcacagc	11340
acgtcgcgga	agttcaggcc	cgcccgcggc	acggcgtatgc	ggacctggcc	gggtgccagg	11400

Side 8 av 29

ggggcgggtgg cgtcgggagc ggcgacggcg tcgacgccgt cgatgctgcc gggccggacc 11460  
 acgtcgacgc gccaggcgtc ggcgccgacg ggcgggcgca gcgcggtctc agcggcccgg 11520  
 gtgagccggg cgacgaggcg ttcgccgtcg cggagcgcggtc tctgcccgtc gtcgcccagc 11580  
 gccggcacag cgtccaggga ggcggggtgt ccgtcgggtg cgacgagcag gaaccgggtc 11640  
 ggggtgctcgg tctgcgcgga gcgcaccagg ccccagaccg cggcggcggc cgggtcgggt 11700  
 tcctcgccgg gccggggcggc gacggcgtgc cgggtgacga tcgcgagccg ggctcggccg 11760  
 aaccggtcgt cggcgagcca ctctgcagc agttccagca cctggcggtt ggcccgggtg 11820  
 gcggcggcga ccacatcggc tcctgtgctg acgggagcga ggacgaggtc caccgcccgg 11880  
 gcgtcgatgt cggcgagggc ggtgctcagg ggcgcgcgga ggccttcgg tccgtcggcc 11940  
 aggacggcgc agcgcggcggc ggcggtgtc tcggcgtcgg gggctcgcca ggtcacgcgg 12000  
 aacagcgcgt cgcgcgtgcc ggcgggcggc acggcgcgga gctgccggc cgacgcgggc 12060  
 cgcagccgca gcgcggccag ctccacgacg ggcccggcct cggcggtcgg tccgggtgag 12120  
 ctacagctgt cggcgtctc ccggcgggcg cgcaccgca ggaccgggc cgggcggggg 12180  
 tgcaaggca cgcgggtcca ggtgaacggc agcagcagcg gcgcgtctc gggctcggcg 12240  
 gcgggcacgg cctgggtgac ggcgtcgagc agcgcgggtt gcacgagatg gccggcggtg 12300  
 tcgacgggtg cggggagtcc gacctcggcg tagacctcgg tgtcccggcg ccacagggcg 12360  
 cgcagggcct ggaaggcggg ccctagaccg tagcccgggg cggcgaaacg gtcgtacacg 12420  
 ccgtccaccg ggaccggctc agcggccgc gggggccacg cggcggtctc gggctccgc 12480  
 ggctcggccg gctcggccgg tgccaggacg cccgtggcgt gccgggtcca gccgtcggcg 12540  
 gagtgggagt ggaccggcag cgtgcggcgg ccggaccggt cggcgccgtg cacggtgacg 12600  
 cgcagggca gcccgtcggc ggggacgccg atgggcggcg ccagggtcag ctctcgate 12660  
 tgggcggcgt cgagccgggt gccggcgtgg gccaccatct ccaggacggc ggtgccgggc 12720  
 agcagggcgg tgcccagcac ggtgtgctcg gtcagccagg ggtgctctc ggggctgatc 12780  
 cggccgggtg ggagcaggcc gtcctcgtcg gggagttcgg cctcggcggc gagcagcggg 12840  
 tgccctcgg cgggtgaggcc gacggcgtc aggtcgccgg cggcggcctg gggggtgagc 12900  
 cagtagcgtc cgcgctgga ggggtaggcg ggcagttcga cggggcgggc gccgggtggc 12960  
 tcgaacaggg ggcgccagtc gaccggcacg ccgtcggcgg ccacctcggc cagtgcggtg 13020  
 gtcaggcgca gccggtcgct ctctcgcgg cgcaggggtg cggcgaccgg cagttcgggtg 13080  
 ccgcccgtc cggcggtctg ctgcatggcg accgtgagca cggggtgcg gctgatctcc 13140  
 acgaagccgt ggtggccggc ggcgagcaga tcgctgatcg cgttctgga gagcacgggc 13200  
 tcgcgcaggt tgcggtacca gtagcggcg cccagttcgc tgccgtcgat ccagtcggcg 13260  
 gtgacgggtg agtagagggg cacgtcggcg tcccggggc ggatgccctt gaggtcggcg 13320

Side 9 av 29

agcagccgct gccgtacggc ctccacctgc ggggagtgcg aggcgtagtc ggcggcgacg 13380  
 cggccggcgc gcagcccctc gtcgtcgcag aggtcgcgca gctcctccag ggcctcggg 13440  
 tcgcccgcga cgaccagcga gcgggggctg ttggcagcgg cgatgccgag ccggccgggc 13500  
 cagcgctcca gcatccgctc gacgttcgcc gcggggggcg cgacgaaggc catgccgcag 13560  
 cggccgggca ggtcggcgac ggccttggcg cgcagcgcga cggctctcgc ggcgtcgtcc 13620  
 agggtgaggg cgccggcgac gcaggcggcg gcgatctcgc cctgggagtg gccgaccacg 13680  
 gccgccggca cgacgcctg gcgagcgcac accgcggcca gcgagaccat gagcgcgaac 13740  
 agcaccggct gcaccacgtc gacgcggctg agcggcggcg cgtcctcggc tccgcgcagc 13800  
 acgtccacga ccgaccagtc caggtagggg gcgagggcgc gctcgcactc ggccatgccc 13860  
 gcggcgaaca ccgggtgggt gtcgagcagt tccacgcca tgccgagcca ctgtccgccc 13920  
 tgcccgcgga agacgaagac gacgctgccg tcggctccgg cggtgcccg gcagacggcc 13980  
 gggtcggcgc cgcgccggc gagcacgctg agcgcggcga gcagttcggc gcggtcccgg 14040  
 cccacgacgg cggcgcggtg ctogaacgg gtgcggcggg tggccagggt gaaccgcagc 14100  
 gaggcgggct cgaggccggg gtcggcggcg acgaactcgc gcagccgggc ggccctgttcg 14160  
 agcagcgcgg cctcggtgcg cgcggacagc tgccagggca cggggagcgc accggccggc 14220  
 ggcgccgtcg ctctcctcggg ttggggcgcc tccgccacga tcacatgggc gttggtgccc 14280  
 ctgaccccga acgaggacac gccggcccgg cggggacgct cgcgccgggg ccacgggcgg 14340  
 gcctcggta gcagccgtac gtcgccggac acccagtcca cgtgcggggg gggctcgtcg 14400  
 acgtgcagcg tcttcgggag cagtccgtgc cggagcgcga gcaccgtct gatcactccg 14460  
 ccgacgcgg cggcggcctg ggcgtggccg aggttgact tcagcgagcc cagccacagc 14520  
 ggcgggtcgc ggtcctggcc gtaggaggag aggagtgcct gggcctcgat ggggtcggcc 14580  
 agggcggtg cggtgccgtg gccctccacg gcgtccacgt cggcgggacg cagtccggcg 14640  
 tcggccagtg cctgccggac cacgcgctgc tgggcggcgc cgtcggcgc ggtgaggccg 14700  
 ttggaggcgc cgtcctggtt gacggcggtg ccgggcagca gggcgagcac cgggtggccg 14760  
 tttcgccggg cgtcggagag ccgctccagc aggagcatgc cgacgcctc ggaccagccg 14820  
 agtccgtcgg cggccttggc gtacgagcgg cagcgaccgt cctcggacag gccgccctgc 14880  
 ttggtgaagt cgacgaacag ctccggcgtc ggcctgacgg tcacaccgcc ggccagcgcg 14940  
 agggtgctct cgcggagcgc cagcgaccgc accgcctggt gcagggcgac gagggaggac 15000  
 gagcaggcgg tgtccaccgt gaaggcgggg ccttcaggc cgaggacgta ggagatgcgg 15060  
 ccggccacca cgtcggccag gcggccggtc agggcgtgcc cgtcggcgc ttccgggatg 15120  
 ccggcgagca gcgaggagta ggactggcg ttggcgccga cgaacacgcc gacgcgtccg 15180

Side 10 av 29

ccccgccacg agccgggtgc gacgccggcc cgctccagcg cctcccagct ggtctccage 15240  
agcagccgct gctgggggtc catcagctgg gcctcgcgcg ggctgatgcc gaagaagccg 15300  
gcgtcgaaca gggcgacgtc gtcgaggaat ccgccgtgcc gggcgcggtt ggccgagggg 15360  
ccgtccgggt cggcgagggc ggcgaggtcc cagcccggtt cggcggggaa cggcgtgatg 15420  
gcgtcgcgct cctccagcac gagccgccac agctcgtcgg ggggggtcac accgcccggg 15480  
aagcggcagg ccatgccgac cacggcgacc gggtcgtcgt cggcccgcg ctgtacgggc 15540  
tcgtcgtcct cggcgagccg gacgtgccgg ccggagggcg cgtcgaccag gacgtccgcc 15600  
agggcgcggg cggggtgggtg gtcgtagatg gcggtgggtg gcagcttcac gccgggtccg 15660  
cggctgagcc gcagcagcag ttgtacggcg gtcagcgagc gcagtccgag ttcccggatc 15720  
gcccgggtccg gcggtaacgtc ggcggcggtg ccgaggtcga gcacctccgc gacctgtgtc 15780  
cggaccaggt ccaggacgac gcgccggcgc tcgggttcgg gcagaccggc gagccgggtc 15840  
gcgagcgcgg gcggctgagc agccttcggg tcggtcagcg gctcagtcac ggggtggccc 15900  
ctccagcggg tccggtgcgt gcagtgcgga gacgggcagg ccgggttcgg cgagtgcggc 15960  
ctgtagcagc gcggcggtgc cggccagcag gccgtccacg acgcgtcggc cgagggcggc 16020  
ggcgcgggtg acgacgtgtc cggtgaggcc gccgtcgggg tectcgacca ggtgcacctc 16080  
gaggtgccag cgggcgtacg cctgttgcc cgtgaactgc tcgacgcggg cggcaggcag 16140  
gccgagttcg ccgagttcga cgttgacgag ctggaacacg acgtcgacca gcggctgttc 16200  
gggtccagg ccgaggcctt cgacgacgcg tcccagggc agggcctggt gggcgtaggc 16260  
gtcgagggcg gtgtcccga cccgctccag caggccggcg aaggacgggt ccgctgtgag 16320  
gtcgacgcgc aggggcacga agttggcgaa gaagccgatc agcccctcga cctcggcccg 16380  
ggtgcggccc gccaccgggg agccgacggc gaggtcgtcc gtgcccgccc agcggggcag 16440  
cgtggccgtg aacgcggcca gcagggtcat gtagaggggtg gcgtcgtgct cggcgccgac 16500  
ccggcggggc gtggcgacca ggccggcggg cagccgccac tcggtcagca cggcgggtggc 16560  
gtcgtgggcc gcgtcggccg ggacgcccgg cagggcgagg ggcgcaggc cgtccagccg 16620  
gcggcgccag tggccgagct gggcgtcgag cgggctccg gtcagccagg accgctgcca 16680  
gaaggcgaag togccgtact ggacgggcag ttcgggcagc tcggccggac ggttctctcg 16740  
tagtgcccg taggcgccgg acagttcggc ccagagcacg ccctgggacc agccgtcggc 16800  
ggcgatgtgg tgcaacctca gcagcaggac gtggtcgtcg gggcgatcc gcagcagtc 16860  
ggcccgacg accgggtccc ggacgaggtc gaacggccgg gccgctgcct cgtcggccag 16920  
ggcgcggggc gcggctctgt cggccacgtc caccgggtcc agcacgatgt ccgtggcggg 16980  
caggatcacc gacgccggct cgtcgcggg cacgaagacc gtgcgcagcg cctcgtgccg 17040  
gcgcacgacc tcggtcaggg cggggcccag caggtcggcg tccagttcgc cgggtgatccg 17100

Side 11 av 29

cacggccagc	gggatcgtcc	agaccgggtc	gccgggggtc	gcctcgtgca	gccgccacag	17160
ccgcagctgg	cccagcgaca	goggcagggg	ctcctgccgg	gacaccggca	ccaggggogg	17220
tacggccgtg	cgcggggcca	cggcgacgac	ctcggcgagg	gcgcgcgggg	tgcggtgctg	17280
gaacagctcc	cgcagggaca	cctcggcgcc	cagcgcctcg	cggatccggg	cgaccgtgcg	17340
ggccgcgacc	agcgagtgcc	cgccgagcgc	gaagaagtcg	tcgtcgtatc	cgaccccgcc	17400
ggtctccagc	acctcggcga	acacctcgca	cagcgtctgc	tccgcaccgg	tacgggggtc	17460
ggtgaagccg	gtgtcgagcg	tggtgcgcag	gtccggggcg	ggcagcgogg	cccggtcgat	17520
cttgccgggtg	gtggtcagcg	ggaacgcgtc	cagcgcgacg	agcgcggacg	gcaccatgta	17580
gtccggtaag	gcgtcggcca	ggtgggogcg	cagcggggcc	ggcagccctc	cgtcggtaac	17640
ggggaccggc	acgacgtagc	cgacgagccg	cttgaccggc	ggggcgtcct	cgcgggcgac	17700
gatgaccggc	cgggtgacct	cggggtggcg	cagcaggacg	gcctcgacct	cgcccagctc	17760
caccocgaag	ccccggatct	tgacctggtg	gtcagagccg	cccaggtatt	ccaggtctgc	17820
gtcggggccg	cagcgggcca	ggtccccggt	goggtagagg	cgggagccgg	gcgggcccga	17880
cgggtcgggc	acgaacttct	gcgccgtcag	ttccggcttg	ccgacgtagc	cgcgggogag	17940
tccggggccg	gcgaagcaga	gttcgcccgg	cacgcccacg	gggaccggcc	gcagccggtc	18000
gtccaggacg	taggcgcggg	agttgtcgac	cggtcgcgcc	aggtgtgogg	tccggggcca	18060
gtcggcgacg	tcagcgggca	gggtgaagga	ggtgacgacc	tggatctcgg	tgagaccgta	18120
gtggttgtgc	agacgcagac	ggggcccggc	ggcgcagaa	tcgcgcagca	cgggtgtccag	18180
cgacagcggc	tcgcccgcct	gggagatgtg	ccgcagcgag	gtgagccggg	cccggcccgg	18240
gccggcctcc	tcggcgagcg	cgcgatcat	caggttgggc	acgaatatct	gctcgacggc	18300
ccgttcgtcg	agccagcggg	cgaagcgggc	cgggtcgcgg	cgggtctcct	cgtggggat	18360
gaccagcgtc	tcgcccgtaca	ggagcgcgga	gagcacctcc	tgacatgca	cgtcgaaggt	18420
gagggcgggtg	aactgggogg	tgocgctgcc	gggtccgccc	ggtaccgtct	tcttctgcca	18480
ggcgagcatg	ttgaccacac	accgggocgg	catggcgatg	cccttgggca	cgccgggtgga	18540
gccggaggtg	tagacgacgt	aggcagggga	gtcggggccg	ggtcgtccgg	cgcccgttgc	18600
cgcgggcggc	tcctgcccgg	ccggggcgtc	cacgaggacg	aggcgggtgc	cctcggcgaa	18660
gacgtccggg	tgagcccggg	cgggtgacgg	gacggtcatc	cgggcgtcgt	cgacgatgag	18720
ccggatccgg	tcccgggggt	ggctcgggtc	gatcggcaca	taggcggcgc	cgcccttgag	18780
gatgccgatc	agagcggcca	tctgcacggg	gccgcgctcc	aggcagagge	cgacgaggtc	18840
gtccggcccc	acgccttggg	ccgcagccc	ggcggcgatc	cgctcggcct	cgtggtccag	18900
cgcgggcgtg	gtgaggacgt	cgtcctcgca	ctccacggcg	cgggcggccg	gggtgcgggc	18960

Side 12 av 29

gacctgctcg gcgaacagct ccacgagcgg gacgtcccgg tacgggaggg cgggtgctgtt 19020  
ccaccgctcc agcagcaggg gccggtcgtc gtcgtccagc agcgagagcg cggacagcgg 19080  
cgcgtcccgg tcggcgaggg cggcgcgagc cagcaccgtg tggatgatga gcaggcggcg 19140  
gaccgtgtcc gcctcgaaca gcgcggtgga gtgcagcacg gtgcccgca cccggtcgcc 19200  
gtcctcggtg aggtgcactt cgaggtcagc gcgggtgaag gcgtgctcgt ccagcagcgg 19260  
ttccaggcgg gcggcgccga ggcggtcgcc cttgtccccg ggcgcccga tcagctgaa 19320  
gaccacctgg accagcgggt tcggggacag gtcccgtcgg ggtgccaggg tctccaccag 19380  
gtgctogaag ggcaggtcct ggtggtccat ggcgcccacc accgtctcgc gcaccggcc 19440  
cagcaggtcg cggaaggtcg ggtcgccgga gacgtcggtg cgcagcacca gcatgttgac 19500  
gaagaagccg atcagccgct ccacctcggg gcgggtacgg cctgccacgg gggcgccgac 19560  
ggcgacgtcc tcgggtgccg cgaacctgac caggaccacg gtgaaggcgg tcagcagcgt 19620  
catgtagagg gtggcgccct cgggtgctgc gaacgcgcgc gcggcccgga ccaggtcctc 19680  
gggcagttcc cacggctggg aggcgcccgc cgagccggcg accgcggggc gggcgcggtc 19740  
caggggaagt tccagggggc gcagcccggc gagcccgccc cgcagtagg tgaggtaccg 19800  
ctccagttcg gcgcgggtga gccggccctg ctgccagacg gcgaagtgc cgtactggac 19860  
aggcagttcg ggcagttcgg cggggtcgcc ggacagttcg gcgcggtagg cctcggccag 19920  
ctcggcccag aacacggcgt gcgaccagcc gtccgtgacc gcgtggtcgc cggatgatcag 19980  
gacggcgtgg tctcggccg cgagcgagc cacgcggggc cgcagcagcg gtccccggc 20040  
caggtcgaag gggcgcgcg cgcccgctc ggccagggcg cgtacctcg cctcgtcggc 20100  
gacgtcgtg acctccaggc ggagcgggt cgcgggccgt acgacggcca taggctcgc 20160  
ggcgtcggcg gcgaagacgg tcgcagcgc ctctggtggg gagaccacca gggacagtgc 20220  
cggcccagg gcgtcagcgt cgagcgggc gtgggcgct acgcccctc ccacgtcca 20280  
gaagccgctg tccgggtga gccggtccag gaaccacagg cgcgctggg aggacgacag 20340  
cggaagcgc gcgcgtccc ggcgggccg ccgatgacg tccgtggcgg tgccgggctc 20400  
gccgagggtc tcggccagcc ggcgcgggga gcgcccgtc aacaccgct ggagcggcac 20460  
gtcgggcccg aagcgggcgc ggatccggc gatggcgcg gtggccagca gcgagtccc 20520  
gccagggcg aagaagtct cgtcggcgcc caccgggtg acgtccagca cctcggcgaa 20580  
gatctgcac agcaccgct ccgcctcgt cgcgggcggg acgtaccgc tctcggcgac 20640  
cgagcgggtg tcggcgcggg gcagggccc gcggtcgatc ttgcgggtg tgacagcgg 20700  
gaacgcgtcg agcgcgacga acgcgacgg caccatgtag tcgggtacgg agcccggc 20760  
gtggcgcgc agggcgggca gcacgctcgc gccggcctc ggctccagca ccacataggc 20820  
gaccagggc ttgtcggccg ggatgtcctc gcgcacggcg acggtgacct gcgagaccgc 20880



Side 13 av 29

cggtgcccgc	agcagcgcgg	cctcgacctc	gccgggctcc	acccggaagc	cgcgatcctt	20940
gacctggacg	tcggcgcggc	cgaggaactc	cagcgcgcgg	ccgggcagcc	accgtacgac	21000
gtcgcccgtg	cggtacatcc	gctcgcccgg	cccgcgccac	gggtccggca	cgaacttctc	21060
ggcgtcagg	toggccggc	ccaggtagcc	gcgcgccacc	cggggcccgc	cgatgaccag	21120
ttcgcccgcc	acgcccagcg	gcgcccggcg	gagggtgtcg	tcgaggacgt	acaccggggt	21180
gttgtcgatc	ggcgcgccga	tgggcacccg	ggagccggcg	agccggaagc	cggttccat	21240
cggaacagc	gtggtgaacg	cggtcgccctc	ggtcgggccc	taggcgtcgg	ccacggtcag	21300
gtcggggtgg	gcggccatca	cctgggcgac	ggtctcgccc	gacacggcct	cgccgcccgt	21360
gagcacctcg	cgcagcccgc	cgaagcactc	catgcactcc	tcggccagga	ggctgaacag	21420
gggtgcgggc	aggcacatcg	cggtgacgcc	gtgctcgccg	atgagccggt	cgaaggtgtg	21480
cggttcgacg	tgctcgtcgg	tggcgacgac	gatctgcttg	ccggtcagca	ggaacggcca	21540
cagctcgtag	gtggagatgt	cggtggccag	cggatagtgc	agcagcacc	gttcgtggtt	21600
gccgttgctc	cagcggcggg	cgccggccag	cacgacgacg	ttcggtggg	tcacggccac	21660
gcccttgggc	tcgccgctgg	acccggagg	gtagatgacg	taogccgtgg	tgtcggggtg	21720
cggttcgata	ccggggtcgg	tgtcgggccc	ggggcccggg	tcggtgacgt	cgaggacggt	21780
gatgccgtcg	gtcccgggca	ccgggcggtc	ggcgatgacg	acgcgcagcc	ccgaggtggc	21840
cacgatgcgc	tcggtgcggc	ccgggggggt	gcgcgggtcg	agcggcacgt	aggcggcgcc	21900
cgccttgagc	acgccgagca	cgccggccac	catgccggtg	gagcgtccgg	tggcgacgcc	21960
gaccggttcg	tcggcgccga	cgccgtgggc	cagcaggagg	tgggcgaagc	ggttggcccg	22020
ccggtccagt	tcggcgtagg	tgaccgcctc	gtcgccgcag	atcagggcga	cgccgtcggg	22080
ggtgcgggcg	gcctgctcgg	cgtagagccg	gggcacgcag	ccgtccggca	gcggtgcggc	22140
cgtgtcgttc	caggcgacca	gggtgcgggtg	ccggtcggtc	tcgtcgagca	tggtcgccc	22200
ggagaccggc	cggtcggggt	cgccgagcac	ctcgccgagg	accaccgaca	cgtggtgcat	22260
cagctggcgg	acggtgtcgg	cgtcgaacag	gtcggcccgg	tacaggacgg	tcgcgccgac	22320
ctcgtcgccg	gtctcgacgg	cgtgcacctc	caggtccatc	cggtgtacg	cgtggtcgat	22380
gtcgaacggc	tcggcccggg	cgccctgcc	ccagggccc	cggggcgct	cgccgagcag	22440
ctggaacgcc	acctgcacga	gcgggttgcg	ggacaggtcg	cgctcggggc	gcagccgttc	22500
caccaggtgc	tcgaagggga	cgtcctggtg	ctcgacggcg	ccgaccaccg	actcccgtac	22560
ccggcccagg	agttcccggg	aggtcgggtc	gccggacagg	tcggtgcgga	cgccgacgac	22620
gttgacgaag	aagccgatca	gcgcctcgg	ctcggcgcgg	gtccggccc	ccgtcggcga	22680
gcccacggcg	atgtcctcgg	tgccggcgta	ccgggacagg	acgaggggtg	acgcggccag	22740

Side 14 av 29

gagcaccatg tagagcgtgg ctccctcgcg ggcggcgacg gcccgggcgt cccggatcag 22800  
ctcggcgggc agctgccagg gcagggtgcc cgcgcccccg gtggcgacgg cgggcccggc 22860  
cttgtccagc ggcagttcca gcggggcgag gccggccagc cggccgggtcc agtagccggc 22920  
ccggcgctcc agcacctcgc cggtcagcca ggaccgctgc catacggcgt ggtcgcctga 22980  
ctggacgggc agttcgggca gcggggcgcc gtcgtacgog gggcgatct cggcccacag 23040  
cagggcctgg gaccagccgt cggtcgcgat gtggtgcacg gcgacgacga ggacgtggtc 23100  
gtcggggggc agccggagca gcgtggcgcg cagcagcggg ccccgctca ggtcgaacct 23160  
ggtggacagc tcggcggagg ccgcgggcgc tgcgcgctcg gcgtcgggta cgtcgcgat 23220  
ccgcggggcg accggggcgg cggcgccgat gaccgcggcg ggcacgccgt cggcgaccgt 23280  
gaaggtggtg cgcaggtct cgtgccgggc gacgaccgcc gacagggcgc cggccagccg 23340  
ctcggggtcc agcggctcgc gcacgcgag ggctccgcc gaggtgtacg aggcgctgcc 23400  
gggggcgagc tgggtccagga accacatccg ctgctgggog aaggacagcg gcagcagccg 23460  
gtcgcggtcc gcgggacca gcggcggcgc cgggtcggcc gggagcgcgg ccggcgagc 23520  
caccgagccc agggctcgcg ggggtcgggtg ctcgaaacc tcgcgagcg ggacctcgt 23580  
gccgaaggcg cgggcgattc gggcgacgag gcgggtggcg agcagcaggt ggccgccgcg 23640  
tacgaagaag tcgtcctcgg ccggaaacc gtccggcgtcg agcagctcgg cgaagatctc 23700  
gcacagcgc ccgctcggcgt cggtcgcgog ggcggccagg ccggcgtcgc ccgtctcgc 23760  
cggggcgggc agcggcgggc ggtcgcacct gccgggtggcg gtcagcggca gcgctcggc 23820  
gaggacgaag gccgagggca ccaggtagtc gggcagggcc gcccgggcgt gggcgcgag 23880  
ggcggcggtg tcgggtggtg gcccggcgog cgggacgacg tgggcgacga gccgcttgc 23940  
ggccgggccc tcaccgcgca ccacgacgac ggcgtgcgog acggcggggt gggcggccag 24000  
gacggcctcg acctcgcgg gctcgcacct gaggcgcgc agcttcgct ggtcgtcggc 24060  
gcggccgagg aactccagga ccgctcggg gcggcggcgc accacgtcgc cggtcgcgta 24120  
catgcggctg cccgccggtc cggacgggtc gggcaggaag ccgctcggcg tggccgccgg 24180  
ccggccggcg tagcccggg ccaggcgcgg gccgcgacg tacagttcgc cgggcacgcc 24240  
gaacgggacg ggccgcagcc ggtcgtcag gacgtgggog cgggtggtgt ccagggggct 24300  
gccgatgggc acccggccgc cgggggcccgt gtcggccggc gcgatcgggt ggagggtggc 24360  
gaaggtggtg gtctcgggtg gcccgtagcc gttgacgacc gtcaggtcgc ggtggcgccc 24420  
gogcacgcgg gccacggtc ccggggacac ggtgtcgcgg ccgacgacga gttcgcggac 24480  
gccggccagg caggtgacgt cctcctcgc cacgaggtcg aagaggccgg aggtcagcca 24540  
cagcgcggtg accccctggt cggcgacgac acgggcgagg gcggcgggtc cgagggcgcc 24600  
gggcggggcc accacgacgc ggcggccgga cagcagcggg gaccacagtt cgtaggtgga 24660

Side 15 av 29

ggcgtcgaac gectgcgggg agtgacagcag gaccogtctg tgggcgcgcg cggaccagcg 24720  
 ccggtggagg gcgagggcgg ccacggcgcg gtgggtcgtg gcgacggcct tgggcgtgcc 24780  
 ggtggaaccg gaggtggaca tcacgtacgc gaggcctcc gggccgacgg tgttcggcaa 24840  
 agccgtgtcg ggggctgtgc cggggacggc gcgacaggtct acggccggca ggtgctcggc 24900  
 gccggcgggt gcgggaccgc cgtcggtcag cagcagcgcg gcaccgggtg cggcgaggac 24960  
 ggcgcgggtc cgggcggcgc ggttgcgggc gtcgagcggc aggtaggcgc cgcggcctt 25020  
 gaggaccgcg agcacggcga cgaccaggtg ggcggaacgt tccgtcgcca gcgacgac 25080  
 gctctcgggt ccggctccgt ggccggccag gacatgggcg agccggttgg cggcgcggtc 25140  
 cagctgggcg taggtgaggt gttccgtccc gtcggccacg gcgacggcgt ccggggtgcg 25200  
 ggcgccctgg gcggcgaaca gctcgggcag cgaggcctcg ggcagcggta cgcgggtgcc 25260  
 ccgggcggcc cggteccagg ccgcgtcctc gcccgctcg gtcctcgtca gccgggacag 25320  
 cggccggctg ggctcggcgc aggcggcgcg cagcagggcc gtcaggtggc gggccagccg 25380  
 ctgacggtc tcccggtcga acagggcgcg gctgtagttg atcagtccct cgacgccgc 25440  
 ctggcgtcc tcgcccaggt agacctccag gtccatgcgg gtgaaggcgc ggtcgcccgc 25500  
 gaagggttcg gcggtggtgc cggggaacgg cgcggggcgc gcggcggcc ggggcacgta 25560  
 ctggaagacg acctgggcga gcggggttcg ggacaggtcg cgctcgggga ccagccgctc 25620  
 caccaggtac tcgaacggca cgtcctggtg cgccatctcg tccaccgagg cggcgcggac 25680  
 gcgttcgacg agttccgcga aggtggggtc gccgccgagg tcggtgcggg tgacgacggt 25740  
 gttgacgaag aatccgatga gttgctcgac ctcgccagg ggcggccgg cgaccgctg 25800  
 ggacgaggc acgtcctcgg tcggggcgtg ccgccgagg accgcgctga acgcggccag 25860  
 cagggtcatg tgcaggtcg cgcctgcgcg tgcggcgacg gccggggcgg cggcgacggc 25920  
 gtcggccggc agccgccagg tgacgacgcc gccctcggcg gaggcgacgg ccgggcgggg 25980  
 ccggtcgagc ggcaggtcca gcgggggcag gccggccagc cggctcctgcc agtacgccag 26040  
 ccgccgctcc agcacggcgg gcgacagggc acggcgcctg caggcggcga agtcggcgtg 26100  
 ctgcaccggc agttccggca gcgcgggctg ccggccgtcg gccagggcgg tgtaggccgc 26160  
 ggtcagctcg gccacagca ggccgtgcga ccagccgtcg gtggcgatgt gatgcaccgt 26220  
 cagcagcagg acgtggtcgt cgtcggcgag ccgcagcagg cgggcgcgga gcagggggcc 26280  
 cttggtgagg tcgaaggggc gcgcgccctc ctgcggccgc agccgctcgg cgtcgccctc 26340  
 gtcacggcg tcggtcacgg gaacgggcac cggctccggc ggcaggacga cggcgccggc 26400  
 cacgccctcg tggtcggcga agacggtgcg cagggtctcg tgccgggcga cgacacagct 26460  
 cagcggccgg gccagcagg cggcggcgg cgggcgcggc acgcgcacgg cggtgccgaa 26520

Side 16 av 29

gttgtagaag gcgctgtccg gcatcagccg gtcgaggaac cacagccgct gctgggcgaa 26580  
 cgacagctcc agcggccggt cgcgggggac ccggtgatg cccgcgggtg tcgtgccggt 26640  
 cctcgccgtg cgctcccgga gccggttgag tgccgagtcc agtcccggcc gtcgagagct 26700  
 ccctcgctc atccggctgt ctcccctcc tcgtcggtt cggtgagtcc gcggtcgcgc 26760  
 atcacgctgg ccagggcgcg gtgggtgccg gactcgctt cttcgaactg ctcgaccacg 26820  
 cgccgccgca tcggggcggg cttctcctgg ctgagcttga acatcgtctg cacggaatcg 26880  
 acccgccagg tgaaggcgcc cacgccgggc gcgatctggc ggaagtagtc gagggaggac 26940  
 tcctggtccc agccgcgccc gaagccggac tccagccgcc gggcgggtgc ggagacgatg 27000  
 tccagcacgg cggcggggtc ggcgggtggc tccactgtgc cgttcacgtg gacggcgatg 27060  
 aagtcccagg tgggggcccgc gggcgtgacc ccgtagaccg tcggcgagac atagccgtgc 27120  
 gggccctgga agacgatgag cgcgccggtc ccggagcgca tccggcgcca ctgcccgttc 27180  
 tcgacgttca tgtggccgat cagggtggag ccggcgagcg ggacgggtgcc cgcggcgacg 27240  
 gcctcgcggt cggcgcgctc gggctcgtgc cggaacagca ccggcgcgtg ggtggccacc 27300  
 gggacgtcgt cgtgagaggt gacgaccatt gccagtggtg tgtgtcgag aaacgccagg 27360  
 acgacgccgt cgcaatcctc ccggtacagc ggacgttcgt acacttcagc ccctgttccc 27420  
 cgctgctgcc ttgcttcggg tggagcggtc cgggtcgcac cggccgcccg tgatcgaccg 27480  
 ggagatctcg cccgcgcgga ccgccaccat ggacagcagg gtggaggcga tgccgtgggt 27540  
 cgctcggtg ggcacctgga cgtagatgcc gcaccggaaa tcccgggtg tgccgagccg 27600  
 gtagtcgagg ccgatcagca actccccgc ctcgctcccg cggagggcgc cggagacgcc 27660  
 gccgagcagt tcggccgggt cgggtggagt gtaccgggtg gcgtacacga ccaggtcggc 27720  
 gtccaggtcg gtgtgttcgc ccgtgggcag gaactccacg cgtacggcgg cggattcctg 27780  
 gcgcggttcg acggacacca ggcgggaggc gttcatcacc cgcagccgcg gggcgcggga 27840  
 caccttctgc tcgtactggc ggcggtagag gccctggagg acgtcctcgt cgacgacggc 27900  
 gtagttggtg ccgccgtggt agcgcgatgat ggctgcttg acctcgggcg gggcgaagt 27960  
 gaagtcgtcc acggcggccg ggtcgaagac gcggttgccg aacgggctgg agtcggcgac 28020  
 gctgtagccg tagcgggcga acaccgcgca cacctcggcc tcggggtagc ggtccatgag 28080  
 gtgcgcggcg acctcggccg cgtcttgccg ggcgccgacc acgacggccc ggcggggcgg 28140  
 gcgttcgtcg aacgcgggca gccgggtgcag caactgggag ctgtgccaga cgcgttcgcc 28200  
 ggtctccgcg ccctcgggca gccgggggcg caggccggag gcgaggacga ggtttctggt 28260  
 ccgggcgacc acccgggtcc cggcgagcac gtcgagcgcg acgacctcac cggcttcggt 28320  
 caccggccgc acaccggtg cctccacgcc gtactcgacc aggtggttca gccggtcggc 28380  
 ggcccactgg aggtagtcgt ggtactcgat ccgggagggc agcaggggtg gctggttgat 28440

Side 17 av 29

gaagtcgacc	agccggtcct	tctcctggag	ataggacagg	aatccgaaat	cactggtggg	28500
attgcgcac	gtggcgatgt	ccttgagaaa	ggacacctgg	agcgaggagc	ccccaggag	28560
catccccga	tgccagccga	attccttctg	cttctccag	aaaagggcct	tcccgggcgc	28620
ttcggattca	tggagcgcca	ccgccagggc	gagattcgcg	gcaccgaatc	cgattccggt	28680
gacgtccagt	acttctgatt	ccgggctctg	ctgcgcagt	gatgattgct	ctgcgagccg	28740
ggtcatatat	caaccgccat	tagtttttca	atggatgtat	cgtcgcagga	cgcccagaat	28800
tcacctgcga	cgctctccag	atgcgtgagg	gaacgcgcgc	tgtaaaaggt	ggtctggtac	28860
tgggttatgt	cgtagtcgac	gtgggccatg	tggcgatgt	ccagcggccg	gatctccgcg	28920
gaacggaagt	gctccagctc	gcgtaggag	gagacgacgc	tggcgccgta	ggccccgggc	28980
ccgtcggcgg	cgccagcag	gccgattcg	agcgtgaacc	agaaggtctt	ggcgacgaac	29040
tggacggcgt	cctcggactc	caccctgogc	acggcctcgc	cggccaggcg	gtacaggttg	29100
gcgaaccggg	cgtcggccag	ggcgctgccg	tgcccgatga	cctcgtgcag	gatgtccggt	29160
tccgtcgagt	agaagggtgt	cgcgctgtcg	cggaggtaact	gggtggagt	gaagtaccgg	29220
tggccagag	agccgcagaa	cagggcgaag	ggaaccacgc	cggacgcggg	gcgtaggcgg	29280
aatccggcca	gctggtcgag	ccggtcggac	acttcacgca	actgcgggac	gccgtcggcg	29340
cccactcga	gccgctccgc	cgctcagacg	aactccggcg	ccgccatgtg	ccggtgcggg	29400
tccgcgagcc	gcttgaaaac	cagggccac	agagcgtgct	cggcgtccgt	gtactcgacc	29460
tctggaatgg	gctgcggggg	cacataggcg	gcagcgttg	cggcgatttg	gtcacgcgc	29520
tgctgataca	ccgacgacgc	ggttaattcg	ggcgcgcccg	agccgatttc	caogaacttc	29580
cccactctc	catcgacaga	aggcagcagt	tgctgtccga	agctattttg	gttcggacgc	29640
ccgcatcaac	cttcccttgt	ccagccgatt	cattaggacc	ctacaagcca	ccgcgacac	29700
tgcgaagagt	tttctatgcg	cccgtatgt	acccttttg	gcagactcac	cggaaattat	29760
cgatcatcgc	accgccgaa	ccggagtcaa	gcgttggtc	ggcagggcgg	cttcaagttc	29820
ccgataggag	cgggccctag	gcgattcctc	agatccggcc	ggcgcgttcg	ggtgtgtccc	29880
aaatcactgg	cctaaatcct	tcatgaggac	ccgtcagctt	gccgacggac	gctctttcgc	29940
ttgtggtgcc	gggcgtttcg	gtgtccgggc	agggccgcgc	ggagcgcccc	aactgccgcg	30000
tgggctgtc	gcgtcgggtg	ggcgccgggt	tccacggctc	cgggagtcct	tgcacagggc	30060
ccggcgaata	tctccaggac	caagccgtgg	gcggtgaggt	ggtcggcgag	ggcggtgagt	30120
tggcggcgt	tgcgaccgag	ccgcttccgc	tcgtaaccgg	tgaagatgac	acggcagttg	30180
ggggcgtgcg	ccttgacctc	ccgcgccgcc	ctcagcgctt	cctcccggaa	cttcgggctg	30240
ccccgcgcc	gggtgctgat	cttctcgccg	aagatgtagt	cgcgcgagat	gccgtgtttg	30300

Side 18 av 29

gcgagcgcgt cgagctggga gtcacttgc ctgcatccgc ccgcgcgcgg agtgggtgogg 30360  
 catcgtggca gcgcgcgtca gatgcgcggc gtgcceccca ggtgaactcc gtcgcacctg 30420  
 gggcaggggtg ggcggagttc accgcgtcgt gcggttcaac gggccaatg gaggtgcgga 30480  
 tacggteccgc ccggcgcgcg ggcgcgatc atcattccgg cggggcggag ccgtcagtgc 30540  
 ttgacgggtga acgtggcgcc ttggggcgcg aaggtcgtgt cgtggtcctt ggcggtggcc 30600  
 agcacggata cgtgccagac gcccttgggc aacgcggcgg ctcccttggc cgagctcttc 30660  
 acggtgtagg tgcacaccga ggcgcgcgcg gaagtgcctt tgcacgtggc ttctctgaca 30720  
 tcccgcacct cgcgcgcgt gggcgcaagg cccgaactcg ccggccaggc gagcaccgcg 30780  
 aggtcttga ttccggagtt gtcggccacg gtggcgcgtga aggtgagcga ggcgctccca 30840  
 ccggccgtac tgggtgagtg ggcgggtggcc tttgagatct ccggcttggc cggcacagcg 30900  
 gcgtcggccg aggagacgaa caccacggtg ccggcaacga cggctgcggc cacggcgagc 30960  
 gacgagacga caaggcgctt ggacatgaag tatcccctca tagatgaccg ctactggtct 31020  
 ctgcgcgcgag cgctctgcgc accgcggcgt tgtgtacaca gcctgtctcg acggccctgc 31080  
 ccctcacatg ggcagaacta ctcaaccgaa gtactcagac gccctgagct tgtcgttcaa 31140  
 cctcgtctcc gttggggggc ggtattgagc aggcgctttt cgaatgtggc gtcacagacc 31200  
 gccgtccagg atgtgcagcc ggtctgcaag ctgcgtcgcg atcaggacct tcagcagatc 31260  
 cagcgcgctg tccaccgccc gcgacgtgag gtacaccgcc gcggccagca gcgttgtgag 31320  
 gctgcgagag tccagagtgc ggcgcggcaa cgacaccttg tcgtccgccc cgtaccgcga 31380  
 ccactctgcg ccgcccgcgc acccgtaccg gtccgcggcg cagccggtcc agctccacca 31440  
 ggcggcccga cgagcagaga atccagcacc gccgcgtgca cgacgcgcgg catcccgcac 31500  
 aaggcgtccc aaaacgcgga ttgcgcgcct cccacaccga tcccacagga caggccggac 31560  
 agctcgcgcc cagcagcagc ggctactgtc acccgttcgg cggcggggcg gacagagccc 31620  
 gtgacaacca gattgtgacg ttccggtgat gtgacaccaa ttoggagctg gccgcgtgac 31680  
 ctgtgacagc ggactggcct cgaaggtgga ccgaatgcag ttcttgacag caaagacgga 31740  
 ccgcgcgagc tcagggggcg agtgcccgcc cgcagcacag tcggttcagg gctcagcgc 31800  
 ggctacggac agacgtggat cgcgcgtcgc ggtcagcgcg aacgctgtcc ggtgaagagg 31860  
 cggtacagca ggagcacgat caccgagccg acgaccgcgg cgatccatgt cgagaggtgg 31920  
 aagaagccgt tgatggagtg cacgcogaag atcaccttgc cgagccagcc gccgagcaga 31980  
 ccgcgcagca tgccgatgag catcgtgacg aggcagccgc ccgggtcctt gccgggcatg 32040  
 agtgcccttg cgatggcgcc cgcgatgagc ccgatgagaa tccaggcgat gatgcccacg 32100  
 gtgtgcgtcc tttgctgtag gtggtgcoga ggaaggcccg acgaggctcc gccggggctg 32160  
 cccgcgcgtc gctcgcgcgc gacgaccggc gacatacga tatccgctcc ggaacctcc 32220

Side 19 av 29

acacgggtca	aaggtcccg	ttcctccgac	cgacccaccc	ggcatccgat	cogtoggcog	32280
atccggtcga	cggcggattc	ggtgactggt	caaccttcga	tggcgtcga	tcaaggttcg	32340
ctgtcacagg	tcatccgccc	tcagtccctc	aggtcgcccc	toggaaggcg	tccaccagag	32400
gtcaggcggg	tccattcctc	cggatcccca	gctgcctcac	aggggtgctg	ggacccgggg	32460
acggccctcg	gtgttatgga	taagccgaag	ctcaggacgt	tctcacggcg	acgccggatg	32520
agctggcgag	gagggcgtgc	cgaggcagtt	cggttgtcac	cgaggaggca	tcccacttct	32580
cacgcgtgct	cattcggcgg	acttctctgc	accggcgccg	acgagccgga	gttcccgggc	32640
tccccggctg	ggccccgctg	agggctgagc	ccttccacgg	cgaggcggaa	gaggcggctg	32700
gcctgggtgt	cggggtctgt	gtggtgctcg	gtggccaggg	cgatgccgac	ggcgagggtc	32760
agcaggtcgt	gaaaggtgac	gtgcggtgca	accgccttgt	cgcggtggc	ccgctggagc	32820
aagggagttg	cggctgcttc	gattacgccc	ccgcagctct	tccgggaggg	ttcttcggtg	32880
ggcggctcgt	agctgaggat	atgggcgaat	ccgcgggctg	agacggcgtg	gcggacgaag	32940
gcgtggaacc	actccagcag	tgcggtgagg	ccgtcctcgg	acgcactcag	ccgatggggc	33000
cgctcgcaca	ggccccgaat	gcgctcctgg	aagacggctt	cgaggagcgc	ccggcgggtg	33060
gggaaagtac	ggcgcacggt	cgccgaaccg	acgcctgcga	tgcgggcgat	ctgctcctgg	33120
gatgcctcgg	cgccgtgogc	ggcgacttcg	gcttcggcga	cggcgaggat	gcgctgatag	33180
ttgcgtcggg	cgtccgagcg	ctggccagtc	atggtctcct	cgttgctaag	tggcggggcc	33240
cgccatatct	tagcggcaca	cgaaacggcg	ggcccccgcc	ttttgtctct	ccggcccttg	33300
aggagcagca	ccatgcccag	cagcagcgat	accgtcctgg	tcaccggcgc	caccgycag	33360
caaggcgggg	ccacggctcg	cgcgcttttg	gccgccaagg	tgcccgtaag	tgcgctcgta	33420
cgcgatccct	cgtcgaagtc	cgccccggcg	atcgaggcgc	tgggcgcgga	actggtacgc	33480
gcggatcttt	ccgaccgggc	ctccctcgac	ccggcggctg	agggggctcc	cgcggtgttc	33540
tcggtgcaga	tgccgcccac	gaccgagacc	agcgtggact	tgcgagcga	actcgcccag	33600
gccaccaacc	tggtggacgc	ggcgaagata	gggggagtac	ggcagttcgt	acagtcctcg	33660
accagtggag	tcggtgaaca	caccgggtc	gccggctggg	ccgagggccg	ctgggcggcg	33720
atggcggagt	acttccacac	caagcaggcg	atcatggagg	cggtcgctgg	tgcgggtttc	33780
gcccgtgga	cggatgatca	gcccgccttc	ttcatggaga	acctgcccct	gctggcacc	33840
aaggggcccc	gcggcggact	gctgacggta	ctgaagccgg	acaccgaact	ggccttggtg	33900
gccgtgcggg	acatcggcac	ggccgcggca	cacgcctcc	gagaccccga	ccggttccac	33960
caggtggaac	tggaactggc	tggtgacctt	cgcacgatgg	agcagatcgc	gcagaccttg	34020
tccgcccct	ggggcgtgcc	cgtgaccgg	ccctccctga	gcgtggaaga	ggcccttgcc	34080

Side 20 av 29

gcgggcatgc cgaagtgggg agccggacac gagtggaaaca acgtggctct ccagcccggc 34140  
 cggcccacat tcgcccggaa gttgggcata ccgctcacca ccttcgccga gtgggaggat 34200  
 gagcagttga cacatgtgtc tgattagggg tgtggcggca agggcgccgc attgaccctc 34260  
 acggggagcg cggcggttgc ccgcagaggg cattgocggtc ggggggcata ggtgccggtc 34320  
 ccctggacgg gctgcaatga gcaggacagc gcagaggggt ggacacgaga tccttgagg 34380  
 gcacgacgtg gccatcaggg ggtcggggcg tacgggatgg ggatgatgta gcgcgggtgt 34440  
 ggaggcatcg gccagtgcg ctgcttcggc tgttcgcgog ggtgccggca gcctgttcgt 34500  
 tggagtctgc gtggcttcgg agcccgtccg ggaagtacac gccgtgggcg ctggcccatg 34560  
 ctgcccgggt gtgcctcggc tgggggaacg agtacggcaa ggacggggc gatgcggctt 34620  
 cggcggcctc cctcgggtcc tcgccctctt cctcgtcgtc ctggttcag tcgagagcgc 34680  
 ggccgggtcc cgcctatccg cacgagcaca ccgcgcgcaa cgtgccggc cgcggctcgc 34740  
 catgaggccg gccgtcgtag acgctccgct ccgatagcca cctggcctcc gctccggaag 34800  
 agctgaggaa gagcacagga tccgggacgg tgccatcggc cagcaacacc ccgaccgcac 34860  
 ccacgtggga cgaaccgaac tcctcgtcgc tccacgtctc cctctcacct tcacccatcg 34920  
 tctcggcctc ctctcatcg ccgcatcggc acccggccga acgcacggat acagacgatt 34980  
 ccggagtcca aggttcggca cagcgagatc ctcgaaaagg tgacctcgca cctccaccgt 35040  
 gcaccaggcc tcaaagccca cgacgagccg accgagcgca gaccaccgaa gacgaagcgc 35100  
 atcggcgtt cccagtgcgc tggttgatga ggttcaggaa agcgggggtca cttctctaca 35160  
 tcggacagct accgcagctt gccgcgcccg ccgcccggag cggcgggttc tcggcgcccg 35220  
 cgtgcgggtc ggaagcggag gctcggccgg cgaggttcgc cgtcgtatgc gccggcacga 35280  
 cgggccagct ctccgatctt ctctcgggc agtccggaca tcctgacggc ctggcgact 35340  
 gcggcccggc agtcgggccc tgagcagtc gccgacgata ccggccgtcc gaccgtcgg 35400  
 tgctcggcg gcaggtagat cgctgcgag ccgacgcaca gatagattga tcgcaaggcg 35460  
 ctccccctc gtcagctgag gccgctgccc tggcaggtat tgcaggagcc ggtccagcta 35520  
 cggcgacgg gcttctggtt cccgtcctta tcgacttoga cagagtgtc ggtgtgctca 35580  
 gtgactccgg atccgctgca agcggagcaa ggcacgtcag acattttccc aggatgcccg 35640  
 attctgtggg gccgtgtcag tcgtcccgg acactcggc gctaccggac cggcgggcc 35700  
 catcccgaga atctcccgc tcgatcagc cggcgcaca ggagagccc aacctctggg 35760  
 ccacgcggtc gctcggcggc ccggtggcg acctcgtgcc gccacgttcc cactgcgcgc 35820  
 tgttcggca ctccccggc ccccagggcg agtccctcgt gcgctcgcag tactgcccga 35880  
 cgagcaggtc gcccgctccc ggagaggccc cagcatcacg gcccgtaag gtgctccgga 35940  
 tcggtggtgg ccggtgtgaa ccgccacgc ccgcccggct cgtcggcctg gccatcgccc 36000



Side 21 av 29

ggcttgggtcc cgctcaggat gccggggcgg tcaggacggc cttggcagcc agccggaaat 36060  
 tcctgatcat cggattcggg tcgcccttgc ggctgaccag gacgaccgg ctggggggag 36120  
 cgccctcgac cgggacggtg acgaggtcgg gacgcagtga gctgcgccga tcgccgaccg 36180  
 gtagcacggc gatggccctg ccgctcggca cgagttcgag cttgtcctcg tagctctcga 36240  
 tcggcggcac gccggtcccg aggaactggt aggaagccca gcctgcggtc tcgaacgcac 36300  
 acggcgcggc ctcttcggcg gccagttctt ccgcggtcac cgacgcggcg tcggccagag 36360  
 gatggccggc cgggaccacg agcatccggg gctcctcgtc cagcgggggtg gtgaacacgt 36420  
 cgtcggcgac gagcggcagc ggggcccggc cgatcagggc gtcgacggc ctgtcggaca 36480  
 gtgccccgac gtcgcgccag tgcagatgcc ggggtgggat ctcggcgtcg gggtaacggc 36540  
 ggcgcagttc ccgcacggcg gcagtgatca ccaggtcttc gacgtagccg atggcgattc 36600  
 gttcgggtccg ggcttgttca cgcacggcca gctcggcctg gcgggcggcc cgcagcaggg 36660  
 cctgggcccg ggggaggaac gtccggccgg ccggagtgag ccgggtgccc tgggggggtgc 36720  
 ggtccagcag tcgtgtgccg agatatttct cgagccgttg gatctgacgg ctcagcggcg 36780  
 gctgggctac gtgcaggtcg gcggcggccc ggccgaagtg ctggtgcgcc gccaccacgg 36840  
 tgaagtagcg caccagcccg agttccaggt cctgcccggg atcgttcacc ctgcaggggt 36900  
 acggtcatg ccgtttcgga atggtcagat tgccgaaccg gtcttggacg gccatgcccg 36960  
 ccgggcttt gactgaagga gcaacgtttc cccgagaaaag cgacaggcgc gatgaaggcg 37020  
 atccagatcc acgaagcggg tgggcccggaa gttctgcggg acgacgaggt gccggctccc 37080  
 gagatcggcc cgggcgaggt gctcgtccgg gtgcacgcgg cgggcatcaa cccgccggac 37140  
 tggtagctgc gtgaagggat gaaggtcatg ccggcccggg tgaggccggc gctggagttc 37200  
 cctctgatcc ccggaacgga catgtcgggc gtggtccagg cggtcgctcc ggacgtgccg 37260  
 gggttcggcg tcggcgacga ggtcttcggc atgctcgggt tccccgatt cgacggccgg 37320  
 acgtacgcc agtacgtggc cgcgccggct tctgacctgg ctcaaacgcc ggccggtatc 37380  
 gaccacgtgc aggcggcccg ggcgccgatg gccgtgctca cggcctggca gtacctggtc 37440  
 gacctcggcc acgaggtgcc gtctccttcc accggccagg tgcaccagcc ggtgccgatc 37500  
 acgccgggga tgacctgct ggtcaacggg gccgccggtg gagtgggcca tttcgcgggtg 37560  
 caattggcga aatggaaggg ggcacacgtc atcgcgggtg cctcaagtgc gcacgagcgg 37620  
 ttctcgcgg agctcgggtc cgatgagttc atcgactaca ccacgacgca ggccgcggac 37680  
 gtggtcagcg gtgtcgacct ggtgatcgac accgtcggcg gcccgacgg ctcacgcttc 37740  
 ctgacctac tcaagcggc cggcaccctg ctcccgggtg tcttcgccga gtacgaccgg 37800  
 gaagagacgg cgagttcggg catcaccgtc tcgaacatc aggtacgttc ccacggcccc 37860

Side 22 av 29

cagctcgccg agatcggggc cctgttcgac gagggcacac tccgggtcgg ggtggacagc 37920  
acctaccgcg tgteccaagc ggtcagcgca cacacgcgag ccgcgcaggg ccacatccaa 37980  
ggcaagatcg tgctgacggt ggcctcgtga tcgccgaaac tccagcaggg ggtggcgaac 38040  
tacgcccacg ccttggaaga gttgcatata cccgagctgg aaacggctct ggccaagac 38100  
accacctgga ccgtcacgat gcccgacag gggatgctcg gcccgcgctc cggacgcgcg 38160  
gccgcggcgg tgctcgactt catcttcac ccccggtgca gctcggtag cgggtgcca 38220  
gaccggcccg ggacctcagc agttgccag ccgaccgat gagcgcgggc gccgagttgc 38280  
ccgcgagcag ccgcggcgcc atcttgacgg gcaggcccag tcgcgctgcc gcgtcggatt 38340  
cacgccggtt tectcgggtc gctgtcggcc aagtcagcgg tcattgtgcc acccgtcca 38400  
cttcggaaga cgctgaccgc cgctccccg atcctggatg cggcggcttt cacggcacgc 38460  
tgctccgctg ccgtgccgac gaggtctccg gacggctgag ccgtgctgcg catgccgcgc 38520  
cgctcggcg accgatgcc gcgcagcgtc agatgcgccg gactttcgcc accgcaaggg 38580  
cgtcgcgac ctcccggacg acacgcttcg cgtcgtcggg gctgttcacc acgtcgggtc 38640  
ggttcacgtc gatcacgagg acatcgtcgg cggaatagtg ctcgtgcacc cagtcgtcgt 38700  
accggccca aagcgtccgg tagtactcga cgagactttg gtectgctcg aagtcacgcc 38760  
cccgcagtc gatcggcgc agcaccgtct cgaagtcgc tctgagatac accatgagat 38820  
cgggtgcctt gcgatagggc aggcgctcga tctcaogcat catctccgg agcaaccct 38880  
cgtacaactg catctccagg gaactgatcc tgccgaggtc gtgattgact ttggcgaagt 38940  
accagtcctc gtagatcagc cggtcgagga cgttgctcgc ctgtttgtac gcctccttga 39000  
tcgcggcgaa tcgcgtctgc aagaagtaga gctggagaag gaaggatag cgcttcgccc 39060  
ctatctctc aggaccggcg gtgtagaaga gcggcaggat cgggttgtcc tccaogctct 39120  
cgtagaagac catgctcccc agctctttgg cgtacagctc ggccaogctt gtcttccga 39180  
tcccgatcat gcgcgcgacg cagatcactg ccatacctcg cttctttccc gggacaccgt 39240  
ccgcggcgc gattcccgcg caccggctct tccaogcac acgcaccgcc gcggagcgca 39300  
gtcgtggaag cgcgccaggg gcaggtgacg agcctggcct ccgtcggacg accgaagcgg 39360  
catcatatcg gcacggaggg gtgttcgaat ctacgtgctc gtgccctgga tggaaagcgc 39420  
tggtgcaccg ggtagcggga tcatcggagg tgatcatgta gcgggtgggc ggaacgacgc 39480  
ggaacgacgg agtggcggga caggggccac tgacgcacgt atccgcagcc gcgctggagt 39540  
cgccgacctc cacaggttca ctctcaccgg tgaccaagga aagatcgccc gcatgccagg 39600  
ctcgcgcgct cctccccgga acagcgcgta caccgatcag gagaacgacg ccgcgacccc 39660  
gagcgcgacg ccgagcctgt gtggacgcg aacgtgtcgg ttaccactcg acgaccagcc 39720  
ttgacacacc gcgcgtcgcg aggcctccc gccatacag ggcctcgtcc cccggtgca 39780

Side 23 av 29

gtcgcaggcc ggggaagcgc tgccacaagc gggtcagcgc gatcttcacg tggagaagaa 39840  
 ccagtggcgc gcccatgcac cgggtggcgc cgtgtccgaa tgtgaggtgt gcaggccggc 39900  
 gggcgctgct cttcgcaccc 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 ggcggtggtc tcgtaaccgg ccatgagaag tgccagtccg aggttgatca 40200  
 actcgatgcg ggatatctca ccgactgct caaccgcgac cagcgcgctc aggagatcct 40260  
 gcccgggcgc atccctcttt ctttcgatca gtgaggacat gtacttgata agagtcagga 40320  
 tatggcggcc tcttctgocg gttccctgag gcgtcatgct gaacagcgcg gtcacggcgg 40380  
 cgtcgaaaac gggccgctcc gccgcggca cgcgcagcag tgagctcaac gcgaccatgg 40440  
 gaaggggcga agcataaccg ctgaccaggc cggcgcctgg ccccgcaacc tgtagccgat 40500  
 ccagcagtg ctcggcggcc tcctcgatca ccgtgcctg tgccgtgact cgggocgctg 40560  
 tgaacgctgc tcggcgacc cggcgcagcc gggcgtggtc cgcaccgtcc agactcatga 40620  
 tcgagttggg tgagaggtcg acggatcccc atttcggagc atcggggtgg gtggccgcag 40680  
 ctctgctgag acgtgtgtcg gcgagcggg cgcgccccac ggcgtagtcg gtgaccagcc 40740  
 acatgtgatc accagtgggc atccgcaccc gtttgacggc ctcacttgat ggocgtgcca 40800  
 ggaagggcgg cagggggcgg accctgtggt gatcgaaaag gccggacatg gtcgattact 40860  
 cctgttcggc cggaaaacgc gcggggtgct tgtctccct gccgcgcag gcggtgggag 40920  
 acgaccatc ggggtggcggc cgggtcgggc gagcgggctt tttccaccgc ccggaaggcg 40980  
 gcccgctgtt cggctcgcac gctgttcggg ctgcccggct tcggcggaca gaccggcttt 41040  
 ggcggacaga ccggctgccg gatgttcgct acgtagcgcg cacggtgtgt tcctgcctc 41100  
 tcagcgcac cgcgcgtcgc ggctgacgc gttggacgcc tgtggtctca gccgagcgtg 41160  
 ggcaccgaac tgcgtcggcc cgtcgacctg cgtctcgcgg gacaggacga ggtcccggag 41220  
 tcgctgtggc agggcgtcgt caaagcggag gtggtccggc accgtgacgc cggcgttgcg 41280  
 cagcggcgtc gcgatctcgc ggcaggtggt gctgagccag ttgaggaccg cgggatctcc 41340  
 cgagcggccc gcgaccggcg tcaggtggc cacttcggc tgccggaggc cggcgtcag 41400  
 gaacgtccgg gtgaggcggg ggcogaagt cgggacggcg ccggccgcca ggaaggggccc 41460  
 gggccacagc gcgtagtact cgtcccactc cggcagcggc ggacgtgacg gcgacgtgtt 41520  
 ggtgaagtcc atctcgtgca tgacgacgat ccgctccggt ttcagcaggg acgtcagacg 41580  
 gcgcagtgcg gatgocggat cgggcaggt catcaggtg tacctgcoga ccaggacgtc 41640

Side 24 av 29

gaacttcata gccaggtga agtcggccag gtccgaggct tcgtaccgca ccgagtcggc 41700  
 gagccccgcc tectgtgcca ggatccgggc cttgtggacg gttccgggggt cgcgctcgat 41760  
 tcccacgacg tgtccggcgg gcccgaccag ttggggcggc agcagagaga cgtatcccag 41820  
 tccggcaccg atgtcgagga cgtcatccc cggacgtact ccggccgacc gcagggtgcg 41880  
 ttcgggtgaa gccgagatcg cctcgttctg aagggtcagc ctttgggtgct cgctatcggg 41940  
 gtaaccgagc aggtatgctg cgtgcgccat gcgaggcctc cagggccgggt cgtgcgggga 42000  
 gttccccacg gcaggtggcc agggggctcc gcggtgtctg gagcactgag tgccctgtag 42060  
 cggccgtgcg gtgtgggtcc gtgttccggg tatgtcacgc accggagcgg gacatgtacg 42120  
 tgtccgaagg cggcggggcg cgcagagcct tgccgctgga ggtgcgtgcg atcccgccgc 42180  
 gccgcacgaa ctcgatcgtg tcgggtgtga tgcccagctc ggccaccaca cgtgcgaggga 42240  
 tgtgttgctg cgtggcacga cggctcgcct cgtcgtgccg cgtcgtctcg acgacgagcc 42300  
 cgaggcggcc tccctcgtcg ctccagatct gctcggccag gacgccgtgg acgaggaggc 42360  
 cgggtgtgtc ccgcacgacc gcctcgtatg cgtcgcgccg gtggttcgcg ccgaagacga 42420  
 tgatcacctc tttcgtgagg ccacagatgt acagctcggc gtcgtgccac agggcccagg 42480  
 caaccgctgc caaccagccg cccggaagga ggacgcgacg gctctcttcg ggggtggcgg 42540  
 cgtaccgggt gctcgtgacg gacgcccccc ggacctcgac ggcccgacc gtgccgggca 42600  
 cggccgggtc gccgctcggg gtggtgagcc ggacctcggg acgccgcacc ggcgttccca 42660  
 cactgaccag ttccgacac gccccggcgc cggacggcac cggtagtaa cggccccggg 42720  
 tcagttcgtc ccggtcggca cgcagcacct tggccggggc gccgagggga gggaaaggca 42780  
 ccgccagggt cgcctcggcc agtcctgtag ccggcaggaa gacgttctcg gacagtcggg 42840  
 cgggcgcgaa acgctcggcg aaggcgtcct gaagccggcg gtcgaccggc tcggcggcgt 42900  
 tcaccgcatg gcgccagcgg gagagatcga ggccggccgg cggcgcggcg tcgcgcctca 42960  
 ggacgtagcg gtagccggag tcaggagcca tgggtgaagg cggccccagc cggcccatgg 43020  
 cccggatcca gtcaccggga ctgcgcagggt agtcctcggg tgtcagcaga tggatgtcga 43080  
 cgtcgtgacg cagcgggtgtc aagaaggaac cgatcaggcc catgtcgtgg aagaggggca 43140  
 gccaggtgca gccgacgtcg gtccctggcga gccgtgtgcc atgggcgatg gccgccacc 43200  
 cggccggcac gttgcctggg ctgagcacga cggccccggg ttccgtgctc gtgcccgacg 43260  
 tgtactgaa gacggccggg tccgacggcg cccgcggcag gtggggccgg gacggctcgg 43320  
 ccacctcgg caccaggagt acgtcgaccg ggccggcgcc gtcggacagt ccaggaccga 43380  
 gcagcggggc catggccgga gccgtcagca cggtccttac ccgagagcgg cgcaggggcg 43440  
 cggaggtgcg ccggagatag gcgtcggacg acccgaaggg cgggggaccg ggcagcggca 43500  
 ccgcgaccgc gcccgccgc agcacgcgga agaaggcgcg cgcgaagtcc accgacgtcg 43560

Side 25 av 29

gcaggacgag ggcgacccgc tcgccgggtc gcacccccgc cgacagcagc cccgcggcca 43620  
ccccccggc ctccggcaag aggtcgctgt aggacagcgc gtcgccgtcc tggccccggc 43680  
gcagcacgtg catgccccgt ccggagcctt gtgcccgcgc gcggccgagc gcggcgaaaca 43740  
gggtcacgac agcggttccg tgccggcctc cgcgatcacc ttggtgatcg cggcccgcgaa 43800  
ctcccgcacg gtgctcgtct cgaagacgat gcggtcctcc acctcgatgt cgtagtgtctg 43860  
ctcgatctcc agcacgatct ggagcgcgtg gatcgagtcg aagcgcggca aggagcgcag 43920  
atcgggtgtec acccccacct cctcgacacc gatgcgcagt tgctcggcga cggatcggcg 43980  
gacggtctgt tcgatgtcgg tgacactcgc ctgtgacatg gcgtgggtgt gtctctgtct 44040  
gtgaggccgg cgcgtcgggg cgcggcggga ggcggacgcc gggactgacg gtcagcagc 44100  
gccgggcccgg cgggcccagg cgcgcagctt ggctttgatg tcccgcgggg tctccaacga 44160  
gtcgtcgtcc gccaggagcc ggacgatcga catcaccttg gcgtccgcgg cgtccaccga 44220  
gtcgtgctgg atggtctcga tacggcggat gccggccgtg gatgtggaat gcgggtagaa 44280  
catgcccgcc ggggtgcttga cgccttgct acggtccgcg agccagatgt aggccatgcg 44340  
cagcgcggcg gcctgatggg ccggatcgct gtgcacagt tcccgcata gaacggagaa 44400  
cgcacggcag tgccgggcct cgtcgcgggc caggagccc cagattctgc ggatcaccgg 44460  
ctccgacaca tgggcggcga gcgccttgta gaggcggac gcgcgtgact ccgagatcac 44520  
gttcatcatg aggggtggcg agcgcacgtc gccctgcgga tacggctctc gttttagtag 44580  
cgcgtgcttc gaacggagtg agacccccgat ccggtccagg tagcgggcct ggaccagtga 44640  
gtgcccggat tccctccgac ccattgcag tgcccaggag gagaagctga cctcgtcctg 44700  
ccattcccgc aggaagtgt gagcgcggg tagggtgcc aactcgatga cggccgcctc 44760  
ggtgaggaag tccacgggtcc gttcgtcag catgcccgtc tcgatgcggc ccagggtccac 44820  
ctcgggtccag tcccagcgc tcgtctcga ccagtcgaag atcttggtga aggtcatgtc 44880  
gaggtagtag tcggtgtaga ggtcgtccgt catcagcgcg cgggtgcgcc gcagggccag 44940  
ttcgaccgag gtggtgaacc ctccgggcgc caccgcggcg ggcggacga tgtcctcgc 45000  
gtccagtgt tccgccagc cgggaaccgg gcccgccgta tcgggcccga cgacgtacac 45060  
ccgggtccgg ttgaacttc agtgcgacc cagcgcggc acggcgggca gcggctcggc 45120  
gtccgcccc atccacacc cgcgagctc ggatgacggt tcgaactcgt gcaggtagcg 45180  
gtgccagtgc gcgtgtgcc gccggtccac ggtgacgtc ccgaaggcgg ggaagggtgag 45240  
cctttcggcg ggggagactg cgggtggtgg tgccagcagg gcgatggtgt gcgggggcac 45300  
ggagggcgtc ctctctgtc gtctgcgcag gccgtcggcg agcaccttc cgcgcgttgt 45360  
gtggggctcg gctccgtaac acgtgcgtgc cgcgacgtca gagccgcccg tactccgcg 45420

Side 26 av 29

cagggccgag gagtacgggc agcgccctoga tgctgttgct gacgaacgag ggcacggggcc 45480  
 gcacgggtcca cgtgtcggac ggggccagcc gcacgtcggg gaaccgggtg aagaatccgg 45540  
 ccagtgccgt ctccagctgg agacgggcca ggtgtgtccc gatacagaag tgcgggccgt 45600  
 gcccgaagcc gaggtggccg gcctgccgcc ggccggacgtc gaagaggtcc gcgtccggcc 45660  
 cgtggtgcgc cgggtcccgg cccgccgagc cgaaggacgc gaggatggct tctccccggt 45720  
 ggatcgtctg gccggcgatg acgacgtcct cggtcgggta gcgcatcggg aactggttca 45780  
 ccgcgccgtt ccagcgcac cgtctcctoga ccaccgcact ccacgggacc tccccggcgc 45840  
 gggcggaggc cagttgctcg gggtaggtga gcagcgcgtg gcaggcgtg acgagtacgt 45900  
 tgatgacgct ctggtggccg gcgaagaaca tcagcaggat catgccgtgc agttcgtctg 45960  
 cggtagcccg gtcgtctccg tcttggcgtg ccgtgagcag gacgctgatg aggtcgtccc 46020  
 gggggacgtc gcgacgttcg gcgacgatct cccggagcag cgttcgatc cgtccgtcga 46080  
 tctcctggac ctgttcgggg gagttgttcg tacgggtctg catgccggtg agcacgtgca 46140  
 gcagacgccg cttgcgctgc gggatcccc gcaggtcgga gatgacggtg gtggggatgg 46200  
 ggtaggcgaa agccttgccg agatccaccg gccggctctc cggccgtgtg gcgagctggt 46260  
 cgaggagccc gtcgacgagg cgttccacc cccgggcgat gccctccacc cgttccgggg 46320  
 tcagtgcctg gtcgaccagt ccgcgcagcc gccggtgatc cgcgcgctgc gaattgatga 46380  
 cgctgtcggg cgcgacgaag cccatcaacg gccaccgctc cggcaactcg ccgcgggccc 46440  
 ctgcctcca gtgcgtgatt cccttggcga ccctgggatc cgtcagcact cggcgcaggt 46500  
 cctcgtggtg cggaatgcc cacgcccga caccgccggg gagttggacc ggaacggctc 46560  
 tccccgcgc ccgcaggcgg gcgttctccg cgtgct 46596

<210> 4  
 <211> 37  
 5 <212> DNA  
 <213> Kunstig

<220>  
 10 <223> Primer

<400> 4  
 cagagaattc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtc 37

<210> 5  
 15 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Kunstig

<220>  
 20 <223> Primer

<400> 5  
 gcgcatgcat gtgccggtgc cggtcgcgga gccgcttg 39

Side 27 av 29

<210> 6  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 5 <213> Kunstig  
  
 <220>  
 <223> Primer  
  
 10 <400> 6  
 cctcatgcat ctggaggacg tcgcaggtga attctgggcg 40  
  
 <210> 7  
 15 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Kunstig  
  
 <220>  
 20 <223> Primer  
  
 <400> 7  
 gggcaagctt ctcttgctg agcttgaaca tcg 33  
  
 25  
 <210> 8  
 <211> 3994  
 <212> DNA  
 <213> Kunstig  
 30  
 <220>  
 <223> DNA fragment  
  
 <400> 8  
**cagaggatcc gcggtacggg gcggacgaca aggtgtcgtt gccgcgccgg cactcggact 60**  
**ctcgcagcct cacaacgctg ctggccggcg cgggtgtacct cacgtcgcgg gcggtggacg 120**  
**acgcgctgga tctgctgaag gtcctgatcg cgaogaagct tgcagaccgg ctgcacatcc 180**  
**tggacggcgg tgctggacgc cacattcga aagcgcctgc tcaatacccg cccccaacgg 240**  
**agacgaggtt gaacgacaag ctcagggcgt ctgagtactt cggttgagta gttctgcccc 300**  
**tgtgaggggc agggccgctg agacaggctg tgtacacaac gccgcggtgc gcagagcgtc 360**  
**cggcgaagag accagtagcg gtcattctatg aggggatact tcatgtccaa gcgccttgtc 420**  
**gtctcgtcgc tcgccgtggc cgcagccgtc gttgccggca ccgtggtggt egtctctctcg 480**  
**gccgacgcgg ctgtgccggc caagccggag atctcaaagg ccaccgcca ctacaccagt 540**  
**acggccggtg ggagcgctc gtcaccttc agcggcaccg tggccgacaa ctccggaatc 600**  
**aagagcctgc ggggtgctgc ctggccggcg agttcgggccc ttgcgcccac ggcgggcgag 660**  
**atgcgggatg tcgaggaagc cacgtgcaag gcgacttccg cgacggcctc ggtgtgcacc 720**  
**tacaccgtga agagctcggc caaggaagcc gccgcgttgc ccaagggcgt ctggcacgta 780**  
 35 **tcctgtctgg ccaccgcca ggaccacgac acgaccttcg ccccccaagg cggccagttc 840**

Side 28 av 29

accgtcaagc	actgacggct	cgcgcccgcc	ggaatgatga	tgcgggccc	cgcgccgggc	900
ggaccgtatc	gcgacctcca	ttggaccctg	tgaaccgcac	gacgcggtga	actccgccca	960
ccctgcccc	ggggggacgg	agttcacctg	ggggcgacgc	cgcgcatctg	acgcgcgctg	1020
ccacgatgcc	gcaccactcc	gcgcgcgggc	ggatgcaggc	gaagtgactc	ccagctcgac	1080
gcgctcgcca	aacacggcat	ctcgcgcgac	tacatcttcg	gcgagaagat	cagcaccocg	1140
gcgcggggca	gcccgaagtt	ccgggaggag	gcgctgaggg	cggcgcggga	ggtcaaggcg	1200
cacgccccac	actgccgtgt	catcttcacg	gtgtacgagc	ggaagcggct	cggtcgcaac	1260
gcccgcgaac	tcaccgccct	cgccgaccac	ctcaccgcc	acggcttgg	cctggagata	1320
ttcgccgggc	cctgtcgaag	gactcccgga	gccgtggaac	ccggcgcccc	cccgacgcga	1380
cagcccgaag	cggcagttgg	ggcgctccc	cgcgccctgc	ccggacaccg	aaacgcccg	1440
caccacaagc	gaaagagcgt	ccgtcggcaa	gctgacgggt	cctcatgaag	gatttaggcc	1500
agtgatttgg	gacacaccgc	aacgcgcgg	ccggatctga	ggaatcgct	agggcccgct	1560
cctatcggga	acttgaagcc	gccctgccga	gccaacgctt	gactccggtt	ccggcggtgc	1620
ggatgacgat	aatttcgggt	gagtctgcc	aaaagggtac	atagcggggc	catagaaaac	1680
tcttgcgagt	gctgcgggtg	gcttgtagg	tctaataa	tggctggac	aaggaaggt	1740
tgatgcgggc	gtccgaacca	aaatagcttc	ggacagcaac	tgctgccttc	tgctgatgga	1800
agtaggggga	agttcgtgga	aatcggctcg	ggcgccccg	aattaaccgc	gtcgtcgggtg	1860
tatcagcagc	ggcgtgacca	aatcgcgcga	agcgtcgcg	cctatgtgcc	cggcgagccc	1920
attccagagg	tcgagtacac	ggacgcgcg	cacgctctgt	ggcgccctgt	ttccaagcgg	1980
ctcgcggacc	ggcacccgca	catgcatctg	gaggacgtcg	caggtgaatt	ctggggtcc	2040
tgcgacgata	catccattga	aaaactaatg	gcggttgata	tatgaccgg	ctcgcagagc	2100
aatcatccac	tcgcgagcag	agcccggaat	cagaagtact	ggacgtcacc	ggaatcggat	2160
tcggtgccgc	gaatctcgcc	ctggcggtgg	cgctccatga	atccgaagcc	gccgggaagg	2220
cccttttct	ggagaagcag	aaggaattcg	gctggcatcg	ggggatgctc	ctggggggt	2280
cctcgtcca	ggtgtccttt	ctcaaggaca	tcgccacgat	gcgcaatccc	accagtgatt	2340
tcggattcct	gtcctatctc	caggagaagg	accggctggt	cgacttcctc	aaccagcaca	2400
ccctgctgcc	ctcccggatc	gagtaccacg	actacctcca	gtgggcgcgc	gaccggctga	2460
accacctggt	cgagtacggc	gtggaggcca	ccggtgtgcg	gccggtgacc	gaagccgggtg	2520
aggtcgtcgc	gctcgacgtg	ctcgcgggg	accgggtggt	cgcccggacc	agaaacctcg	2580
tcctcgctc	cgccctgcgc	ccccggctgc	ccgagggcgc	ggagaccggc	gaacgcgtct	2640
ggcacagctc	ccagttgctg	caccggctgc	ccgcgttcga	cgaaccccgc	ccccgcggg	2700
ccgtcgtggt	cggcgcgggc	cagagcgcgg	ccgaggtcgc	cgcgcaacctc	atggaccgct	2760



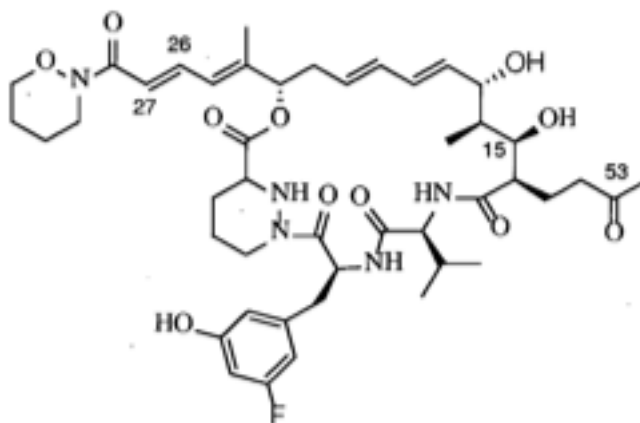
Side 29 av 29

accgcagggc	cgaggtgtgc	gcggtgttcg	cccgctacgg	ctacagcgtc	gccgactcca	2820
gcccgttcgc	caaccgcgtc	ttcgaccctg	ccgcccgtga	cgacttctac	ttcgccccgc	2880
ccgaggtcaa	gcaggccatc	atgcgctacc	acggcggcac	caactacgcc	gtcgtcgacg	2940
aggacgtcct	ccagggcctc	taccgcccgc	agtacgagca	gaaggtgtcc	ggcgccccgc	3000
ggctgccccg	gatgaacgcc	tcccgcctgg	tgtcccgtcg	accgcgccag	gaatccgccg	3060
ccgtacgcgt	ggagttcctg	cccacggggc	aacacaccga	cctggacgcc	gacctggtcg	3120
tgtacgccac	ggggtacgac	tccaccgacc	cgccogaact	gctcggcggc	gtctccggcg	3180
ccctccgccg	ggacgaggcg	ggggagttgc	tgatcggccg	cgactaccgg	ctcggcacca	3240
ccggggattt	ccggtgcccc	atctacgtcc	agggcgccac	cgaggcgacc	cacggcatcg	3300
cctccaccct	gctgtccatg	gtggcggtcc	gcgcgggcga	gatcgcocgg	tcgatcaccg	3360
gcggccggtg	cgaccocggc	cgctccaccg	gaagcaaggc	agcagcgggg	aacaggggct	3420
gaagtgtacg	aacgtccgct	gtaccgggag	gattgcgacg	gcgtcgtcct	ggcgtttctg	3480
cgacacaacc	cactggcaat	ggtcgtcacc	tcgcacgacg	acgtcccggg	ggccaccacc	3540
gcgcgggtgc	tgttcocgca	cggaccocgac	ggcgccgacg	ccgaggccgt	cgcccggggc	3600
accgtccocg	tcgcccggct	caccctgatc	ggccacatga	acgtcgagaa	cccgcagtgg	3660
cgccggatgc	gctccggcga	ccgggcgctc	atcgtcttcc	agggcccocga	cggtatgtc	3720
tcgcccagcg	tctacggggg	cacgcccgcg	gccccacct	gggacttcat	cgccgtccac	3780
gtgaacggca	cagtggagcc	caccgcocgac	cccgcocccg	tgtggacat	cgtctccgac	3840
accgcccggc	ggctggagtc	cggttcgggg	cgcggctggg	accaggagtc	ctccctcgac	3900
tacttccgcc	agatocggcc	cggcgtgggc	gccttcaccc	tcggggctga	ttccgtgcag	3960
acgatgttca	agctcagcca	ggagtctaga	gccc			3994

---

## Patentkrav

## 1. Forbindelse av formel (I):



5

Formel (I)

inkludert alle tautomerer av den, eller en isomer av den der C=C-bindingen i C-26,27 som er framstilt som trans, er cis, og inkludert en metanoladdisjonsforbindelse med den, der det er dannet et ketal ved å kombinere (eventuell) keto i C-53 og hydroksylgruppen i C-15 med metanol,  
 10 eller et farmasøytisk akseptert salt av den.

## 2. Forbindelse ifølge krav 1 i fast krystallinsk form.

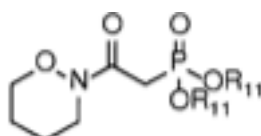
3. Forbindelse ifølge krav 2 i form den krystallinske polymorfen Form I som  
 15 har følgende røntgenkrystallografiske data:

Toppnr.	Posisjon [ $^{\circ}2\theta$ ]	Relativ intensitet [%]
1	6,2097	6,86
2	6,5031	7,76
3	8,2581	27,43
4	8,4838	33,64
5	9,5994	23,88
6	10,0981	8,54
7	11,0546	29,76
8	12,5883	14,81

9	13,1703	7,1
10	13,9184	100
11	14,2891	13,04
12	14,9759	10,37
13	15,3159	5,81
14	16,8844	18,15
15	17,1816	9,72
16	17,7384	53,03
17	18,1703	9,02
18	18,5613	32,19
19	19,0241	52,81
20	19,4201	5,08
21	20,0954	13,7
22	20,449	63,25
23	20,8962	43,44
24	21,1871	15,02
25	21,6388	16,08
26	23,0029	50,8
27	23,2869	17,19
28	23,6883	17,16
29	24,1071	13,7
30	24,2587	19,55
31	24,9948	13,34
32	25,209	26,16
33	25,9577	10,06
34	26,4298	9,38
35	27,3687	11,1
36	29,0171	7,95
37	29,5603	5,14
38	30,0609	7,35
39	30,5824	6,5
40	32,1814	4,39
41	32,6521	6,74

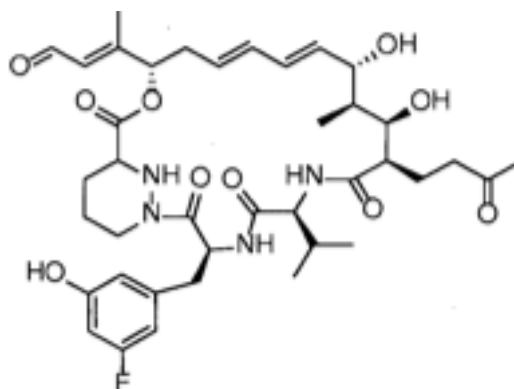
42	33,5957	6,6
43	34,7946	9,04

4. Forbindelse ifølge ett av kravene 1 til 3 til bruk som legemiddel.
5. Forbindelse ifølge ett av kravene 1 til 3 til bruk som legemiddel til  
5 behandling av virusinfeksjoner som HCV- eller HIV-infeksjoner eller som immunundertrykkende middel eller antiinflammatorisk middel.
6. Farmasøytisk sammensetning som innbefatter en forbindelse ifølge ett av kravene 1 til 3 sammen med et farmasøytisk aksepterbart fyllstoff eller bærerstoff.  
10
7. Farmasøytisk sammensetning som innbefatter en forbindelse ifølge ett av kravene 1 til 3 sammen med et farmasøytisk aksepterbart fyllstoff eller bærerstoff og som også innbefatter et andre eller påfølgende virkestoff.
- 15 8. Prosess for å framstille en forbindelse ifølge krav 1 som innbefatter å bringe en forbindelse av formel (V)



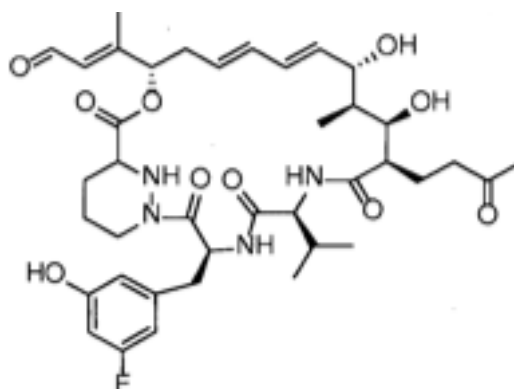
Formel (V)

- der begge R<sub>11</sub> hver for seg er C<sub>1-4</sub>-alkyl eller benzyl,  
20 til å reagere med en aldehydisk makrosyklisk forbindelse (av formel VI):



Formel (VI)

9. Forbindelse av formel (VI):



Formel (VI)

- 5 10. Framgangsmåte for å framstille en forbindelse av formel (I) i form av sin krystallinske polymorf Form 1 ifølge krav 3, som innbefatter trinnet å krystallisere en forbindelse av formel (I) fra metylisobutylketon.
-

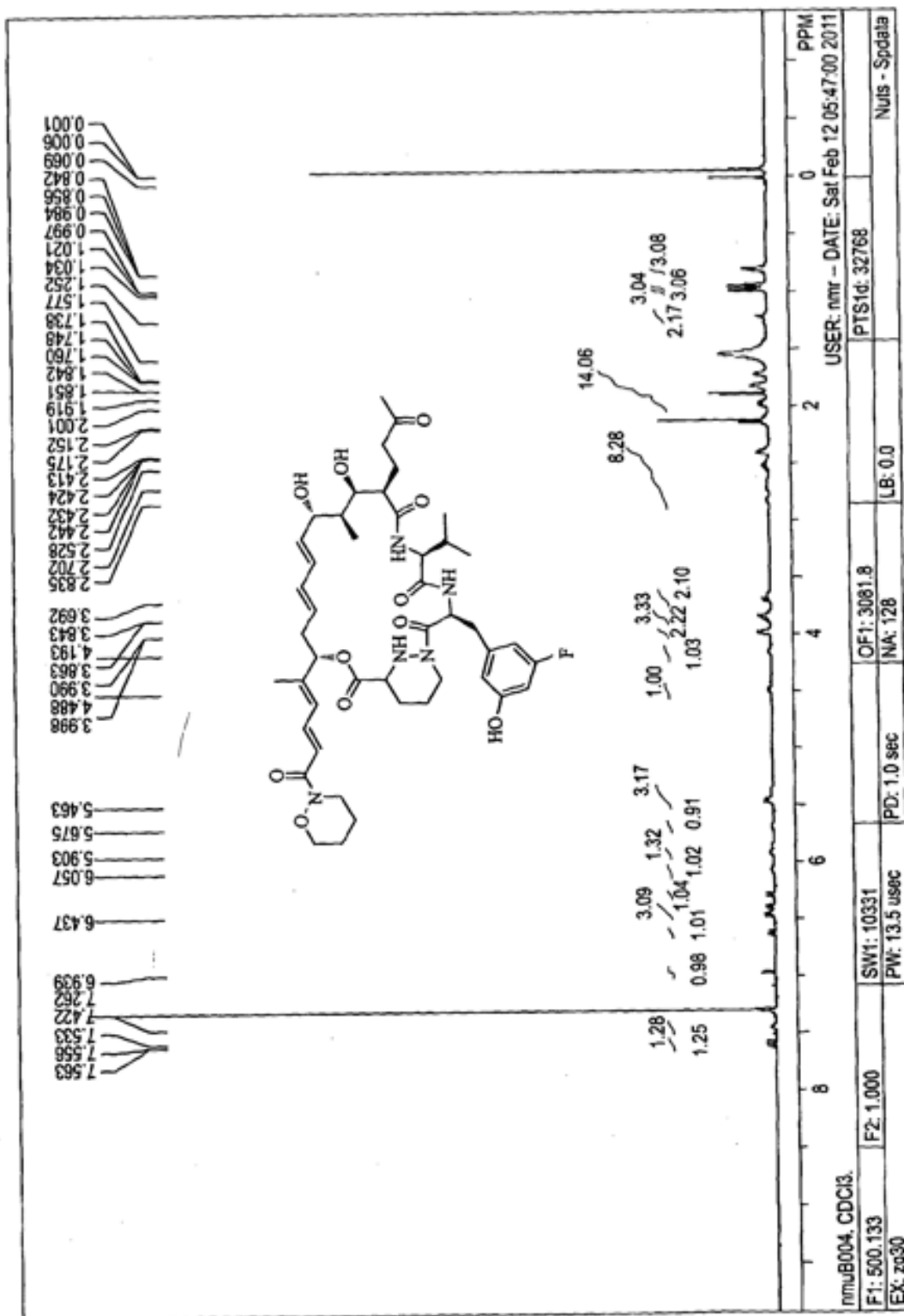


FIG. 1

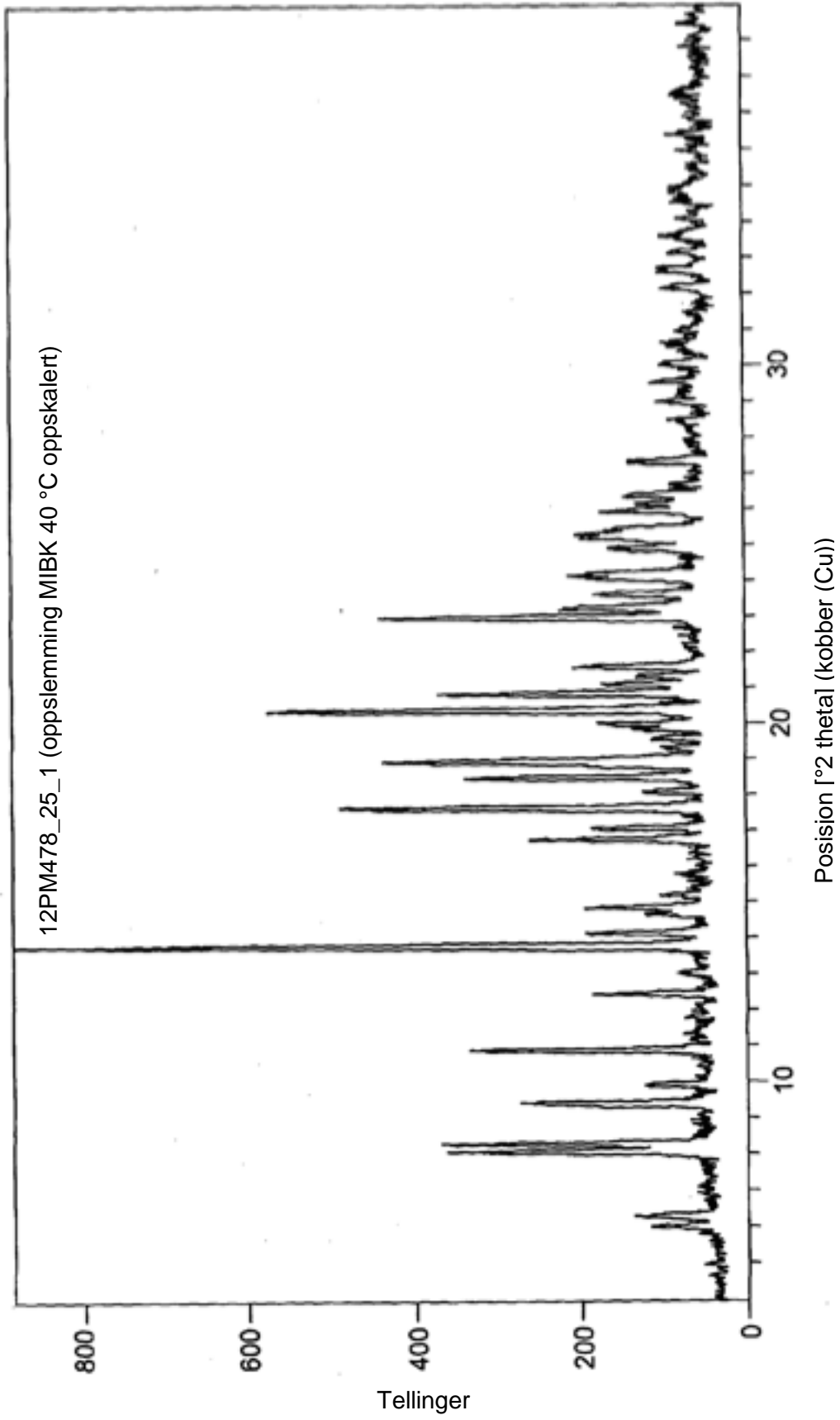


FIG. 2