

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 655 916**

51 Int. Cl.:

**C07H 15/23** (2006.01)

**C07H 1/00** (2006.01)

**A61K 31/7036** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.11.2011 PCT/IL2011/000889**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2011 E 11799501 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.10.2017 EP 2640734**

54 Título: **Aminoglucósidos y usos de los mismos para tratar trastornos genéticos**

30 Prioridad:

**18.11.2010 US 414956 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.02.2018**

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT  
FOUNDATION LTD. (100.0%)  
Senate House Technion City  
32000 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**BAASOV, TIMOR;  
ATIA-GLIKIN, DANA;  
KANDASAMY, JEYAKUMAR y  
BELAKHOV, VALERY**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 655 916 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Aminoglucósidos y usos de los mismos para tratar trastornos genéticos

5 Campo y antecedentes de la invención

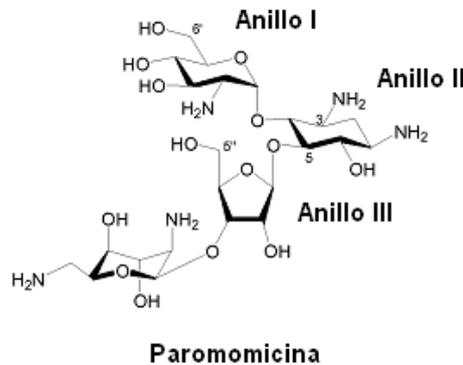
La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos y más particularmente, pero no de forma exclusiva, a nuevos aminoglucósidos con un aumento de la eficacia hacia el tratamiento de trastornos genéticos.

10 Muchos trastornos genéticos humanos resultan de mutaciones sin sentido, en las que uno de los tres codones de finalización (UAA, UAG o UGA) sustituye a un codón codificante de aminoácidos, lo que conduce a la finalización prematura de la traducción y por último a proteínas inactivas truncadas. En la actualidad, se conocen cientos de mutaciones sin sentido de este tipo y se demostró que varias de ellas representan ciertos casos de enfermedades mortales, incluyendo fibrosis quística (CF), distrofia muscular de Duchenne (DMD), ataxia-telangiectasia, síndrome de Hurler, hemofilia A, hemofilia B, Tay-Sachs, y más. Para muchas de esas enfermedades en la actualidad no existe un tratamiento eficaz, y aunque parece que la terapia genética es una posible solución potencial para trastornos genéticos, todavía existen muchas dificultades críticas que resolver antes de que esta técnica se pueda usar en seres humanos.

20 Se ha demostrado que ciertos aminoglucósidos tienen valor terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades genéticas debido a su capacidad para inducir la ultralectura, por parte de los ribosomas, de mutaciones de codón de finalización, generando proteínas de longitud completa de parte de las moléculas de ARNm.

25 Por lo general, los aminoglucósidos son antibióticos de amplio espectro, muy potentes, usados comúnmente para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales. Se acepta que el mecanismo de acción de los antibióticos aminoglucosídicos, tales como la paromomicina, implica la interacción con el ribosoma procariótico, y de forma más específica está implicado en la unión al sitio A de descodificación del ARN ribosómico 16S, lo que conduce a la inhibición de la traducción de proteínas y a la interferencia con la fidelidad de la traducción.

30



35 Varios logros en la determinación de la estructura de ribosomas bacterianos, junto con estructuras cristalinas y de RMN de modelos de oligonucleótidos de sitio A bacterianos, han proporcionado información útil para comprender el mecanismo de descodificación en células procariotas y comprender de qué modo los aminoglucósidos ejercen su lectura errónea perjudicial del código genético. Estos y otros estudios han dado lugar a la hipótesis de que la afinidad del sitio A por un complejo de ARNm-ARNt afín aumenta con la unión a aminoglucósidos, impidiendo que el ribosoma diferencie de forma eficaz entre complejos no afines y afines.

40 Se cree que el aumento de supresión de la terminación por aminoglucósidos en eucariotas se produce con un mecanismo similar al de la actividad de los aminoglucósidos en procariotas de interferir con la fidelidad de la traducción durante la síntesis de proteínas, es decir, la unión de ciertos aminoglucósidos al sitio A ribosómico probablemente induzca cambios conformacionales que estabilizan complejos de ARNm-ARNt casi afines, en lugar de insertar el factor de liberación. Se ha mostrado que los aminoglucósidos suprimen varios codones de finalización con eficacia es notablemente diferentes (UGA > UAG > UAA), y la eficacia de la supresión depende además de la identidad del cuarto nucleótido inmediatamente cadena abajo del codón de finalización (C > U > A ≥ G) así como el contexto de secuencia local alrededor del codón de finalización.

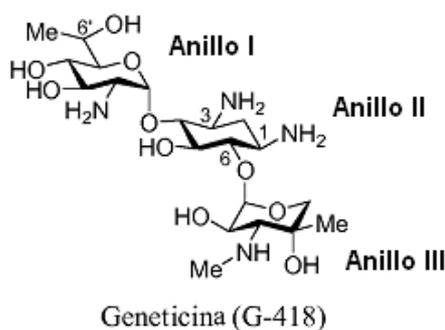
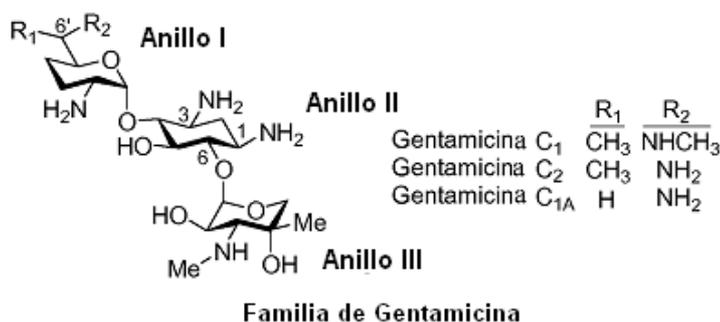
50 Las características deseadas de un fármaco de ultralectura eficaz podrían ser la administración oral y poco o ningún efecto sobre las bacterias. La actividad antimicrobiana del fármaco de ultralectura no es deseada como cualquier uso innecesario de antibióticos, en particular con respecto a la biota gastrointestinal (GI), debido a los efectos adversos causados por la alteración del equilibrio de la biota GI y la aparición de resistencia. En este sentido, además de las

limitaciones mencionadas anteriormente, la mayoría de los aminoglucósidos clínicos son muy selectivos frente a los ribosomas bacterianos y no ejercen un efecto significativo sobre los ribosomas citoplasmáticos de las células humanas.

5 En un esfuerzo por eludir las limitaciones antes mencionadas, la industria biofarmacéutica está buscando nuevos fármacos para la supresión de las mutaciones de finalización mediante la identificación sistemática de grandes bibliotecas químicas para la actividad de ultralectura de contenido sin sentido. Usando este enfoque, se ha descubierto un compuesto no aminoglucosídico, ácido 3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]benzoico (PTC124). Los datos en los que se informa que PTC124 no tiene actividad antibacteriana y ninguna toxicidad informada, sugieren que su mecanismo de acción en el ribosoma es diferente al de los aminoglucósidos.

15 El hecho de que los aminoglucósidos pudieran suprimir las mutaciones prematuras sin sentido en las células de mamíferos fue demostrado por primera vez por Burke y Mogg en 1985, quienes también observaron el potencial terapéutico de estos fármacos en el tratamiento de trastornos genéticos. La primera enfermedad genética examinada fue la fibrosis quística (CF), el trastorno autosómico recesivo más prevalente en la población de raza blanca, que afecta a 1 de cada 2.500 recién nacidos. La CF está causada por mutaciones en la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). En la actualidad, se han identificado más de 1.000 mutaciones causantes de CF diferentes en el gen de CFTR, y un 5-10 % de las mutaciones son codones de finalización prematuros. En los judíos Ashkenazi, la mutación W1282X y otras mutaciones sin sentido representan un 64 % de todos los alelos mutantes de CFTR.

25 Los primeros experimentos de supresión de mutaciones de finalización de CFTR mediada por aminoglucósidos demostraban que las mutaciones de finalización prematuras encontradas en el gen de CFTR se podrían suprimir con miembros de la familia de la gentamicina y geneticina (G-418), tal como se mide mediante la aparición de CFTR funcionales, de longitud completa en líneas de células del epitelio bronquial.



30 Los experimentos de supresión de tejidos intestinales de ratones mutantes transgénicos CFTR<sup>-/-</sup> portadores de un transgén CFTR-G542X humano mostraban que el tratamiento con gentamicina, y en menor medida con tobramicina, han dado como resultado la aparición de proteína CFTR humana en las glándulas de los ratones tratados. De manera más importante, los estudios clínicos que usan ensayos cruzados, controlados con placebo, con doble ocultación han mostrado que la gentamicina puede suprimir las mutaciones de finalización en los pacientes afectados, y que el tratamiento con gentamicina mejoraba la conductancia transmembrana a través de la mucosa nasal en un grupo de 19 pacientes portadores de mutaciones de finalización de CFTR. Otros trastornos genéticos para los que el potencial terapéutico de los aminoglucósidos se sometió al ensayo en sistemas *in vitro*, líneas de células cultivadas, o modelos animales incluyen DMD, síndrome de Hurler, diabetes insípida nefrogénica, cistinosis nefropática, retinitis pigmentosa, y ataxia-telangiectasia.

Sin embargo, una de las principales limitaciones del uso de los aminoglucósidos como agentes farmacéuticos de su toxicidad elevada hacia los mamíferos, por lo general expresada en el riñón (nefrotoxicidad) y en enfermedades asociadas con el oído (ototoxicidad). Se supone que el origen de esta toxicidad surge de una combinación de diferentes factores y mecanismos tales como interacciones con fosfolípidos, inhibición de fosfolipasas y la formación de radicales libres. Aunque se consideran selectivos para ribosomas bacterianos, la mayoría de los aminoglucósidos también se unen al sitio A eucariota pero con afinidades menores que al sitio A bacteriano. La inhibición de la traducción en células de mamífero también es una de las posibles causas de la alta toxicidad de estos agentes. Otro factor a añadir a su citotoxicidad es su unión al ribosoma mitocondrial en el sitio A de ARNr 12S, cuya secuencia es muy parecida a la del sitio A bacteriano.

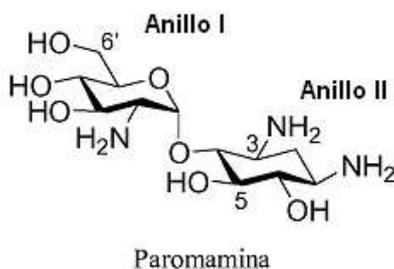
Muchos estudios han tratado de entender y ofrecer formas para aliviar la toxicidad asociada con los aminoglucósidos, incluyendo el uso de antioxidantes para reducir los niveles de radicales libres, así como el uso de poli-L-aspartato y daptomicina, para reducir la capacidad de los aminoglucósidos para interactuar con los fosfolípidos. Recientemente se ha demostrado el papel de la megalina (un receptor endocítico multiligando que es especialmente abundante en los túbulos proximales del riñón y el oído interno) en la absorción de aminoglucósidos. La administración de agonistas que compiten por la unión de aminoglucósido a la megalina también dio como resultado una reducción de la absorción y toxicidad del aminoglucósido. Además, se ha investigado la alteración del programa de administración y/o la manera en la que se administran los aminoglucósidos como medio para reducir la toxicidad.

A pesar de los amplios esfuerzos para reducir la toxicidad por aminoglucósido, pocos resultados han madurado en las prácticas clínicas convencionales y procedimientos para la administración de aminoglucósidos para suprimir las mutaciones de finalización, además de los cambios en el programa de administración. Por ejemplo, el uso de dosis subtóxicas de gentamicina en los ensayos clínicos probablemente causó una reducción de la eficacia de la ultralectura obtenida en los experimentos *in vivo* en comparación con los sistemas *in vitro*. El aminoglucósido geneticin® (sulfato de G-418) presentaba la mejor actividad de supresión de terminación en los sistemas de traducción-transcripción *in vitro*, sin embargo, su uso como agente terapéutico no es posible ya que es letal incluso a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, la DL<sub>50</sub> de G-418 contra células de fibroblastos humanos es de 0,04 mg/ml, en comparación con 2,5-5,0 mg/ml para gentamicina, neomicina y kanamicina.

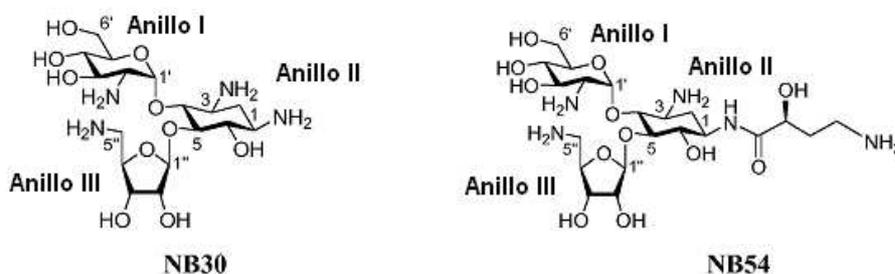
El aumento de la sensibilidad de los ribosomas eucariotas con respecto a algunos fármacos aminoglucosídicos, tales como G-418 y gentamicina, es interesante, pero hasta la fecha no se ha podido explicar de forma racional debido a la falta de suficientes datos estructurales con respecto a su interacción con los ribosomas eucariotas. Dado que G-418 es extremadamente tóxico incluso a concentraciones muy bajas, en la actualidad la gentamicina es el único aminoglucósido sometido a ensayo en diversos modelos animales y ensayos clínicos. Aunque algunos estudios han demostrado que debido a su toxicidad relativamente menor en células cultivadas, la amikacina y la paromomicina pueden representar alternativas a la gentamicina para terapia de supresión de mutación de finalización, aún no se ha informado de ensayos clínicos con estos aminoglucósidos.

Hasta la fecha, casi todos los experimentos de supresión se han realizado con aminoglucósidos clínicos disponibles en el mercado, sin embargo, solo un número limitado de aminoglucósidos, incluyendo gentamicina, amikacina y tobramicina, se encuentran en uso clínico como antibióticos para administración interna en seres humanos. Entre estos, la tobramicina no tiene actividad de supresión de mutaciones de finalización, y la gentamicina es el único aminoglucósido sometido al ensayo para la actividad de supresión de mutaciones de finalización en modelos animales y ensayos clínicos. Recientemente, se demostró que un conjunto de derivados de neamina estimula la ultralectura de la proteína SMN en fibroblastos obtenidos a partir de pacientes con atrofia muscular espinal (SPA); sin embargo, estos compuestos se diseñaron originalmente como antibióticos y no se obtuvieron conclusiones para la mejora adicional de la actividad de ultralectura de estos derivados.

Para algunos de los presentes inventores, el documento WO 2007/113841 enseña una clase de aminoglucósidos obtenidos a partir de la paromomicina, que se diseñaron de forma específica para presentar una actividad de ultralectura de mutaciones codón de finalización prematuras a la vez que producían una baja citotoxicidad en células de mamíferos y de baja actividad antimicrobiana, y por lo tanto se pueden usar en el tratamiento de enfermedades genéticas. Esta clase de aminoglucósidos obtenidos a partir de paromomicina se diseñaron mediante la introducción de ciertas manipulaciones de un núcleo de paromamina, que conducen a un aumento de la actividad de ultralectura y una reducción de la actividad antimicrobiana y toxicidad. Las manipulaciones se prepararon en varias posiciones del núcleo de paromamina.



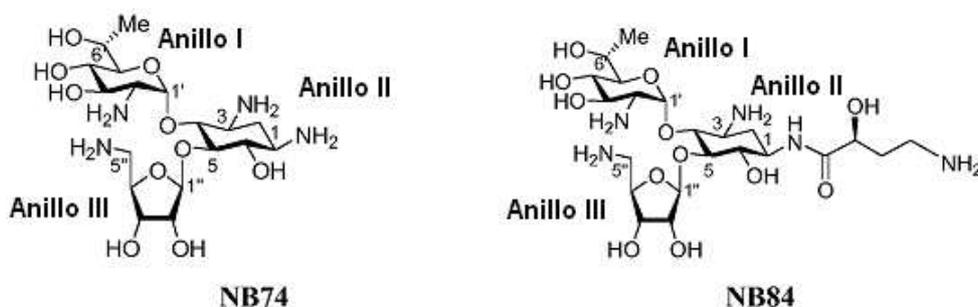
Una de las manipulaciones del núcleo de paromamina de este tipo que se ha descrito en el documento WO 2007/113841 es la determinación del papel beneficioso de un grupo hidroxilo en la posición 6' del núcleo del aminoglucósido (véanse, por ejemplo, NB30 y NB54 a continuación).



Otra manipulación del núcleo de paromamina que se ha definido y demostrado en el documento WO 2007/113841 es la introducción de uno o más restos de monosacáridos o un resto de oligosacárido en la posición 3', 5 y/o 6 del núcleo del aminoglucósido. Esta manipulación se refleja como "Anillo III" en los compuestos NB30 y NB54 a modo de ejemplo mostrados anteriormente en el presente documento.

Una manipulación adicional del núcleo de paromamina que se ha definido y demostrado en el documento WO 2007/113841 es la introducción de un resto de (S)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB) en la posición 1 del núcleo de paromamina. Esta manipulación se refleja en el compuesto NB54 a modo de ejemplo mostrado anteriormente en el presente documento. Se ha demostrado que una introducción de este tipo de un resto de AHB proporciona un aumento de la actividad de ultralectura y una reducción de la toxicidad.

Una manipulación adicional del núcleo de paromamina que se ha descrito en el documento WO 2007/113841 es la sustitución del hidrógeno en la posición 6' por un alquilo tal como un sustituyente metilo. Esta manipulación se ha realizado a modo de ejemplo en un derivado de los compuestos NB30 y NB54, denominados NB74 y NB84 respectivamente.



Nudelman, I., *et al.*, *Bioorg Med Chem*, 2010. 18 (11): p. 3735-46 también se refiere a los compuestos indicados como NB74 y NB84 y describe su toxicidad celular reducida eficacia de ultralectura superior en comparación con la gentamicina.

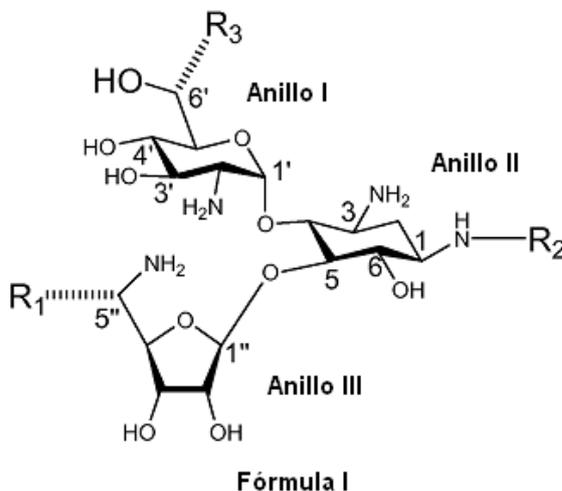
El antecedente de la técnica adicional incluye Nudelman, I., *et al.*, *Bioorg Med Chem Lett*, 2006. 16 (24): p. 6310-5; Hobbie, S.N., *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 2007. 35 (18): p. 6086-93; Kondo, J., *et al.*, *ChemBiochem*, 2007. 8 (14): p. 1700-9; Rebibo-Sabbah, A., *et al.*, *Hum Genet*, 2007. 122 (3-4): p. 373-81; Azimov, R., *et al.*, *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. 295 (3): p. F633-41; Hainrichson, M., *et al.*, *Org Biomol Chem*, 2008. 6 (2): p. 227-39; Hobbie, S.N., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105 (52): p. 20888-93; Hobbie, S.N., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105

(9): p. 3244-9; Nudelman, I., *et al.*, Adv. Synth. Catal., 2008. 350: p. 1682-1688; Nudelman, I., *et al.*, J Med Chem, 2009. 52 (9): p. 2836-45; Venka-taraman, N., *et al.*, PLoS Biol, 2009. 7 (4): p. e95; Brendel, C., *et al.*, J Mol Med (Berl), 2010. 89 (4): p. 389-98; Goldmann, T., *et al.*, Invest Oftalmol Vis Sci, 2010. 51 (12): p. 6671-80; Malik, V., *et al.*, Ther Adv Neurol Disord, 2010. 3 (6): p. 379-89; Warchol, M.E., Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2010. 18 (5): p. 454-8; Lopez-Novoa, J.M., *et al.*, Kidney Int, 2011. 79 (1): p. 33-45; Rowe, S.M., *et al.*, J Mol Med (Berl), 2011. 89 (11): p. 1149-61; y Vecsler, M., *et al.*, PLoS One, 2011. 6 (6): p. e20733.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos pseudotrisacáridos, que se pueden usar de forma beneficiosa en el tratamiento de enfermedades genéticas, tales como fibrosis quística, presentando actividad de ultralectura de mutaciones prematuras de codón de finalización elevadas a la vez que ejercen una baja toxicidad en células de mamífero y baja actividad antimicrobiana. Los aminoglucósidos desvelados en la actualidad se caracterizan por una estructura de núcleo basada en los Anillos I, II e III de la paromomina con la adición de un alquilo en la posición 5" en el Anillo III.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención se proporciona un compuesto que tiene la fórmula general I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

- R<sub>1</sub> es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;
- R<sub>2</sub> es hidrógeno o (S)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB);
- R<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono; y

una configuración estereoquímica de cada una de la posición 6' y la posición 5" es independientemente una configuración R o una configuración S.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el alquilo es metilo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno hidrógeno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, R<sub>2</sub> es AHB y R<sub>3</sub> es hidrógeno.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, R<sub>2</sub> es hidrógeno y R<sub>3</sub> es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, R<sub>2</sub> es AHB y R<sub>3</sub> es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el alquilo es metilo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los compuestos presentados en el presente documento se seleccionan entre el grupo que consiste en los compuestos NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los compuestos presentados en el presente documento se caracterizan por que presentan una proporción de inhibición de traducción  $CI_{50}$  en eucariotas con respecto a la inhibición de la traducción  $CI_{50}$  en procariotas inferior a 15. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la proporción es inferior a 1.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los compuestos presentados en el presente documento se caracterizan por una MIC en bacterias Gram-negativas superior a 200  $\mu$ M y una MIC en bacterias Gram-positivas superior a 20  $\mu$ M.

10 De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que incluye uno cualquiera de los compuestos presentados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica de forma impresa, en o sobre dicho material de envasado, para uso en el tratamiento de un trastorno genético.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los compuestos presentados en el presente documento son para uso en el tratamiento de un trastorno genético.

De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de uno cualquiera de los compuestos presentados en el presente documento en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno genético.

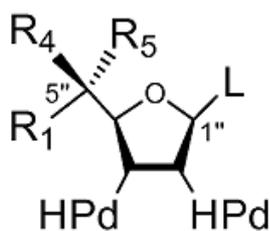
25 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trastorno genético está asociado con una mutación prematura del codón de finalización y/o un fenotipo de truncamiento de proteína.

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trastorno genético se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis quística (CF), distrofia muscular de Duchenne (DMD), ataxia-telangiectasia, síndrome de Hurler, hemofilia A, hemofilia B, síndrome de Usher y Tay-Sachs.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el trastorno genético es fibrosis quística.

35 De acuerdo con otro aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un proceso para preparar el compuesto presentado en el presente documento, proceso que se realiza mediante:

(a) proporcionar un compuesto dador que tiene la Fórmula general II:



Fórmula II

40 en la que:

$R_1$  es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;

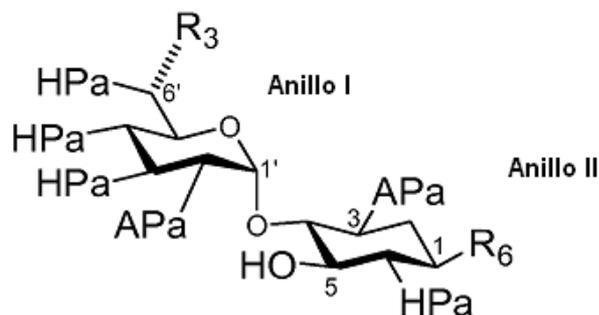
$R_4$  es hidrógeno o un grupo protector de amino dador;

45  $R_5$  es un grupo protector de amino dador si  $R_4$  es hidrógeno o hidrógeno si  $R_4$  es un grupo protector de amino dador;

cada uno de HPd es un grupo protector de hidroxilo dador; y

L es un grupo saliente;

50 (b) acoplar el compuesto dador con un compuesto aceptor que tiene la fórmula general III



Fórmula III

en la que:

- 5            la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;  
                $R_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;  
                $R_6$  es un grupo protector de amino aceptor o (*S*)-4-azido-2-*O*-acetil-1-butirilo;  
               HPa es un grupo protector de hidroxilo aceptor; y  
               APa es un grupo protector de amino aceptor; y

10            (c) retirar cada uno del grupo protector de amino y el grupo protector hidroxilo, obteniendo de ese modo el compuesto.

15            De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo saliente es tricloroacetimidato.

              De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo protector de hidroxilo dador es *O*-benzoílo y el grupo protector de amino dador es azido.

20            De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el grupo protector de hidroxilo aceptor es *O*-acetilo y el grupo protector de amino aceptor es azido.

              A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que qué entiende normalmente alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque en la práctica o ensayo de realizaciones de la invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, a continuación se describen métodos y/o materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser necesariamente limitantes.

30            Breve descripción de las figuras

              Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas. Ahora con referencia específica a las figuras en detalle, se pone énfasis en que los datos mostrados se producen a modo de ejemplo y para fines de discusión ilustrativa de realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con las figuras hace evidente para los expertos en la materia cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

              En las figuras:

40            Las FIGs. 1A-C presentan una ruta de síntesis para preparar ésteres C5-diastereoméricos (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28, de acuerdo con algunas realizaciones de la invención, en las que "a" representa DCC, 4-DMAP, CSA, DCM, a temperatura ambiente (FIG. 1A); se resaltan los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28, en los que las diferencias de desplazamiento químico ( $\Delta\delta$ ) entre protones particulares de (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28 (FIG. 1B); y una asignación de la configuración absoluta en el carbono 5 (indicado por X) del Compuesto de alcohol 9 principal mediante la regla de Sector (FIG. 1C);

45            Las FIGs. 2A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por el ejemplo de referencia NB30 informado anteriormente (marcado con círculos vacíos), por los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB118 (marcado con triángulos de color negro) y NB119 (marcado con triángulos vacíos), y por el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X

(USH1) se muestran en la FIG. 2A, R245X (USH1) en la FIG. 2B, G542X (CF) en la FIG. 2C, W1282X (CF) en la FIG. 2D, Q70X (HS) en la FIG. 2E, y R3381X (DMD) en la FIG. 2F;

Las FIGs. 3A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por el ejemplo de referencia NB54 informado anteriormente (marcado con círculos de color negro), por los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB122 (marcado con triángulos de color negro) y NB123 (marcado con triángulos vacíos), y por la gentamicina como un fármaco de control (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la FIG. 3A, R245X (USH1) en la FIG. 3B, G542X (CF) en la FIG. 3C, W1282X (CF) en la FIG. 3D, Q70X (HS) en la FIG. 3E, y R3381X (DMD) en la FIG. 3F;

Las FIGs. 4A-D presentan supresión *ex vivo* de las mutaciones sin sentido *PCDH15-R3X* (FIG. 4A), *PCDH15-R245X* (FIG. 4B), *IDUA-Q70X* (FIG. 4C), y *CFTR-W1282X* (FIG. 4D), realizada por el ejemplo de referencia NB54 informado anteriormente (marcado con círculos de color negro), por los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB122 (marcado con triángulo de color negro) y NB123 (marcado con triángulos vacíos) y por el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro);

Las FIGs. 5A-D presentan representaciones comparativas de los resultados de ensayos de supresión de mutación prematura del codón de finalización *in vitro* de *CFTR-G542X* (FIG. 5A y 5C), y *CFTR-W1282X* (FIG. 5B y D) realizados con compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), NB127 (marcado con triángulos de color negro), y NB128 (marcado con triángulos vacíos), con los ejemplos de referencia informados anteriormente, NB74 (marcado con rombos vacíos) y NB84 (marcado con rumbos de color negro), y con los fármacos de control, gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos);

Las FIGs. 6A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de ultralectura del codón de finalización *in vitro* inducidos por los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB124 (marcado con círculos de color negro) y NB125 (marcado con círculos vacíos), con el ejemplo de referencia NB74 informado anteriormente (marcado con rombos vacíos) y con el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro), en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la FIG. 6A, R245X (USH1) en la FIG. 6B, G542X (CF) en la FIG. 6C, W1282X (CF) en la FIG. 6D, Q70X (HS) en la FIG. 6E, y R3381X (DMD) en la FIG. 6F;

Las FIGs. 7A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por el ejemplo de referencia NB84 informado anteriormente (marcado con rumbos de color negro), por los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB127 (marcado con triángulos de color negro) y NB128 (marcado con triángulos vacíos), y por los fármacos de control, G418 (marcado con rectángulos vacíos) y gentamicina (marcado con rectángulos de color negro), en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la FIG. 7A, R245X (USH1) en la FIG. 7B, G542X (CF) en la FIG. 7C, W1282X (CF) en la FIG. 7D, Q70X (HS) en la FIG. 7E, y R3381X (DMD) en la FIG. 7F;

Las FIGs. 8A-D presentan representaciones comparativas de resultados de ensayos de supresión de mutación prematura del codón de finalización *ex vivo* realizados para las construcciones *CFTR-G542X* (FIG. 8A y 8C) y *CFTR-W1282X* (FIG. 8B y 8D), realizados con compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), NB127 (marcado con triángulos de color negro) y NB128 (marcado con triángulos vacíos), por los ejemplos de referencia informados anteriormente, NB74 (marcado con rombos vacíos) y NB84 (marcado con rumbos de color negro), y por los fármacos de control, gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos);

Las FIGs. 9A-E presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *ex vivo* inducidos por compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB124 (marcado con círculos de color negro) y NB125 (marcado con círculos vacíos), por el ejemplo de referencia NB74 informado anteriormente (marcado con rumbos de color negro), y por los fármacos de control, gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos), en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la FIG. 9A, R245X (USH1) en la FIG. 9B, Q70X (HS) en la FIG. 9C, W1282X (CF) en la FIG. 9D y G542X (CF) en la FIG. 9E;

Las FIGs. 10A-E presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *ex vivo* inducidos por compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB127 (marcado con rectángulos de color negro) y NB128 (marcado con triángulos vacíos), por el ejemplo de referencia NB84 informado anteriormente (marcado con rumbos de color negro) y por los fármacos de control, gentamicina

(marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos), en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de *R3X* (USH1) se muestran en la FIG. 10A, *R245X* (USH1) en la FIG. 10B, *Q70X* (HS) en la FIG. 10C, *W1282X* (CF) en la FIG. 10D y *G542X* (CF) en la FIG. 10E;

Las FIGs. 11A-D presentan representaciones semilogarítmicas de inhibición de la traducción *in vitro* en sistemas procariotas (marcado con círculos de color negro) y eucariotas (marcado con círculos vacíos) medida para los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB118 (FIG. 11A), NB119 (FIG. 11B), NB122 (FIG. 11C) y NB123 (FIG. 11D);

Las FIGs. 12A-D presentan representaciones semilogarítmicas de los porcentajes de viabilidad celular *ex vivo* con respecto a la concentración del compuesto sometido al ensayo en células HEK-293 (FIG. 12A y FIG. 12C) y en células de fibroblastos de prepucio humano (HFF) (FIG. 12B y FIG. 12D), para gentamicina (marcado con rectángulos vacíos), y para los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB118 (marcado con círculos vacíos), NB119 (marcado con círculos de color negro), NB122 (marcado con triángulos vacíos), y NB123 (marcado con triángulo de color negro); y

Las FIGs. 13A-B presentan representaciones en diagramas de dispersión para identificar la posible correlación entre actividad de ultralectura e inhibición de la traducción de proteínas *in vitro* en sistemas eucariotas como se observa para una serie de compuestos conocidos y compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, en los que el aumento de la inhibición de la síntesis de proteínas (valores más bajos de  $CI_{50}$ ) está asociado con el aumento de la actividad de ultralectura, mientras que la Figura 13A es una representación semilogarítmica de la inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la actividad de ultralectura *in vitro* a una concentración de 1,4  $\mu$ M de los aminoglucósidos sometidos a ensayo (se muestra en el eje X) usando seis mutaciones sin sentido diferentes (*W1282X*, *Q70X*, *R3X*, *R245X*, *G542X* y *R3381X*) y la FIG. 1B es una representación lineal de los mismos datos presentados en la FIG 13A.

#### Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos y más particularmente, pero no de forma exclusiva, a nuevos aminoglucósidos con aumento de la eficacia hacia el tratamiento de trastornos genéticos.

De forma específica, la presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a una nueva clase de compuestos, obtenidos a partir de la paromomicina, que presentan una actividad de ultralectura de mutaciones altamente prematuras de codón de finalización a la vez que ejercen una baja toxicidad en células de mamífero. Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos, y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos genéticos, tales como fibrosis quística (CF). La presente invención también se refiere a procesos para la preparación de estos compuestos.

Los principios y funcionamiento de la presente invención se pueden comprender mejor por referencia a las figuras y descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención con detalle, se debe entender que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles que se presentan en la siguiente descripción o que se realizan a modo de ejemplo en los Ejemplos. La invención es capaz de realizar otras realizaciones o de ser puesta en práctica o realizada de otras formas. Además, se debe entender que las expresiones y terminología usadas en el presente documento tienen fines de descripción y no se deberían contemplar como limitantes.

Como se ha analizado anteriormente, varias manipulaciones estructurales en la estructura de la paromamina han dado lugar a aminoglucósidos sintéticos que se ha mostrado que ejercen un aumento de la actividad de ultralectura de mutaciones prematuras de codón de finalización a la vez que ejercen una baja toxicidad en células de mamífero. El seguimiento de estas manipulaciones estructurales ha conducido al desarrollo de los compuestos de referencia a modo de ejemplo, NB30 y NB54, como derivados pseudotrisacáridos del aminoglucósido clínico paromomicina. El concepto estructural demostrado en el ejemplo de referencia NB30 presentaba una citotoxicidad significativamente reducida en comparación con la gentamicina y la paromomicina, y estimulaba la supresión dependiente de la dosis de mutaciones sin sentido del gen *PCDH15*, la causa subyacente del síndrome de Usher de tipo 1 (USH1), pero su potencia de supresión era notablemente inferior con respecto a la de la gentamicina y la paromomicina. El ejemplo de referencia NB54, que se desarrolló como la estructura conceptual de segunda generación, presentaba una reducción significativa de las toxicidades celular, coclear y aguda, y presenta una eficacia de ultralectura sustancialmente más elevada que la de la gentamicina y la paromomicina.

Mientras descifran adicionalmente la relación de estructura-actividad de los aminoglucósidos de este tipo, en un intento para mejorar aún más su efecto terapéutico en el contexto de trastornos genéticos, los presentes inventores han investigado numerosas modificaciones adicionales, en posiciones variables de la estructura de la paromamina, y han encontrado sorprendentemente que mediante la sustitución de un hidrógeno en la cadena lateral en la posición 5" en el anillo de ribosamina (anillo III) con un grupo metilo, el aminoglucósido resultante muestra una toxicidad celular significativamente reducida mientras que en paralelo presentan una actividad de ultralectura sustancialmente

mayor de mutaciones sin sentido causantes de enfermedad, incluso cuando se comparan con las de la gentamicina. Por lo tanto, los presentes inventores han identificado otra posición importante en el farmacóforo que constituye candidatos a fármaco viables que pueden combatir enfermedades que surgen de mutación genética.

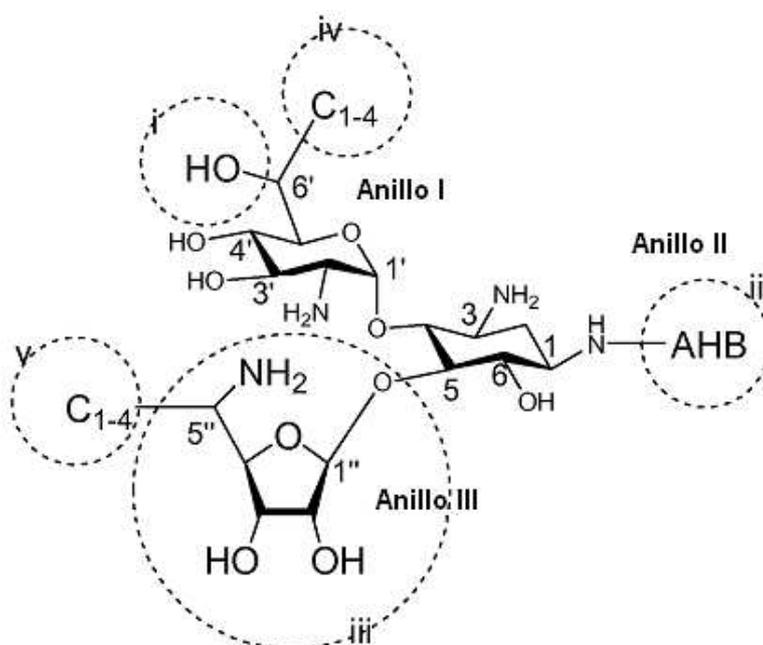
5 Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, se sugiere que la introducción de una modificación en el anillo de ribosamina (Anillo III) conserva los impactos ya bien establecidos de los anillos I e II en las estructuras conceptuales previas (véanse, por ejemplo, los compuestos de referencia NB30 y NB54 a modo de ejemplo descritos anteriormente), al tiempo que se introduce un nuevo motivo estructural con actividad de supresión significativa y toxicidad reducida.

10 Cuando la presente invención se reduce a la práctica, los presentes inventores han preparado aminoglucósidos de forma satisfactoria (por ejemplo, los compuestos de referencia NB30, NB54 NB74 y NB84 a modo de ejemplo) en los que el grupo (S)-5"-metilo de cadena lateral se introdujo en un anillo de ribosamina (anillo III), y de ese modo han generado una nueva familia de aminoglucósidos. Los presentes inventores han demostrado que estos compuestos recientemente diseñados muestran una toxicidad celular significativamente reducida mientras que en paralelo presentan una actividad de ultralectura sustancialmente mayor de mutaciones sin sentido causantes de enfermedad, en comparación, por ejemplo, con la gentamicina. También se observó que la instalación del grupo (S)-5"-metilo no influye de forma significativa en la toxicidad celular, mientras que aumenta en gran medida la actividad de ultralectura del codón de finalización y la especificidad con respecto al ribosoma eucariota de las estructuras resultantes en comparación con las de las estructuras informadas anteriormente.

20 Dado que la instalación de un grupo metilo en la posición C5" del anillo de ribosamina genera un nuevo centro estereogénico, los presentes inventores han preparado los dos diastereómeros C5" con una configuración absoluta definida y compararon sus propiedades biológicas.

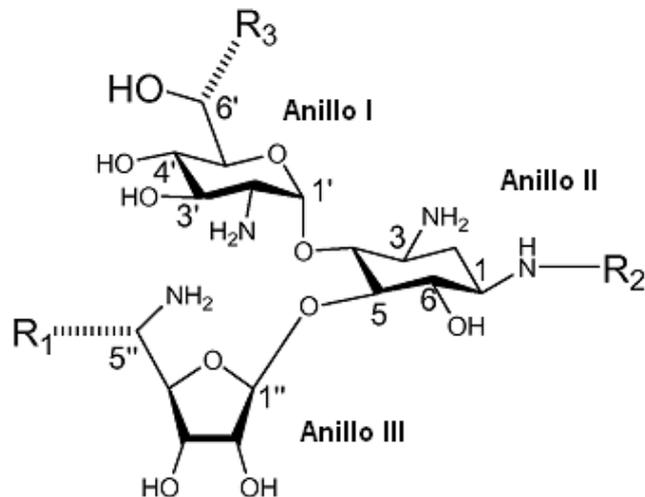
25 Por lo tanto, se ha descubierto un nuevo punto de farmacóforo, el grupo (S)-5"-metilo, como un elemento estructural valioso del anillo de ribosamina (anillo III) que influye de forma significativa en la actividad de supresión y no tiene una influencia significativa en la toxicidad celular. Este nuevo punto de farmacóforo es un quinto punto agregado ahora a los cuatro puntos anteriores descubiertos y desvelados en, por ejemplo, el documento WO 2007/113841. El Esquema 1 presenta el núcleo de paromamina con los cinco puntos de farmacóforo descubiertos hasta el momento, numerados i-iv de acuerdo con la secuencia de su descubrimiento. De forma específica, el punto farmacóforo indicado como "i" se refiere a la provisión de un grupo hidroxilo en la posición 6'; el punto indicado como "ii" se refiere a la provisión de un grupo AHB en la posición N1; el punto "iii" se refiere a la provisión de un tercer resto de sacárido (Anillo III) unido al segundo anillo de sacárido; "iv" es la provisión de una modificación en la posición 6' (a modo de ejemplo en el Esquema 1 como un alquilo inferior); y el punto de farmacóforo que se desvela en el presente documento se indica con "v" y se refiere a la provisión de modificación en la posición 5" de acuerdo con las presentes realizaciones (a modo de ejemplo en el Esquema 1 como un alquilo inferior).

Esquema 1



40

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de realizaciones de la presente invención, se proporciona un compuesto que tiene la fórmula general I:



**Fórmula I**

5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

R<sub>1</sub> es preferentemente un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;

R<sub>2</sub> es hidrógeno o (S)-4-amino-2-hidroxi-butirilo (AHB);

10 R<sub>3</sub> es preferentemente hidrógeno o un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono; y

una configuración estereoquímica de cada una de la posición 6' y la posición 5'' es independientemente una configuración R o una configuración S.

15 En el presente documento se observa que aunque se ha mostrado que la posición del Anillo III en la posición 05 en el Anillo II presenta resultados óptimos, se contemplan otras posiciones para el Anillo III, tales como la posición 06 en el Anillo II y las posiciones 3' y 4' en el Anillo I.

20 Los términos "hidroxilo" o "hidroxi", como se usan en el presente documento, se refieren a un grupo -OH.

Como se usa en el presente documento, el término "amina" describe un grupo -NR'R" en el que cada uno de R' y R" es independientemente hidrógeno, alquilo, cicloalquilo, heteroalíclico, arilo o heteroarilo, tal como estos términos se definen en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" describe un hidrocarburo alifático que incluye grupos de cadena lineal y de cadena ramificada. El alquilo puede tener de 1 a 20 átomos de carbono, o 1-10 átomos de carbono, y puede estar ramificado o sin ramificar. De acuerdo con realizaciones de la presente invención, el alquilo es un alquilo inferior, que tiene 1-4 átomos de carbono (es decir, metilo, etilo, propilo y butilo).

30 El término "cicloalquilo" se refiere a un grupo ramificado o no ramificado, de anillos monocíclicos o fusionados completamente de carbono (es decir, anillos que comparten un par de átomos de carbono adyacentes), que contiene 3 o más átomos de carbono en el que uno o más de los anillos no tiene un sistema de electrones pi completamente conjugados, y puede estar adicionalmente sustituido o sin sustituir. Los grupos cicloalquilo a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, o ciclododecilo.

35 Siempre que en el presente documento se indica un intervalo numérico; por ejemplo, "1-10", esto implica que el grupo, en este caso del grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta, e incluyendo, 10 átomos de carbono. En algunas realizaciones, el alquilo es un alquilo inferior, que incluye 1-6 o 1-4 átomos de carbono. Un alquilo puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, El sustituyente puede ser, por ejemplo, un alquilo (que forma un alquilo ramificado), un alqueno, un alquino, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un halo, un hidroxilo, un alcoxi y un hidroxialquilo tal como estos términos se definen a continuación en el presente documento. El término "alquilo", como se usa en el presente documento, también incluye hidrocarburo saturado o insaturado, por lo tanto con este término incluye adicionalmente alqueno y alquino.

45

El término "alquenilo" describe un alquilo insaturado, como se define en el presente documento, que tiene al menos dos átomos de carbono y al menos un doble enlace carbono-carbono, por ejemplo, alilo, vinilo, 3-butenilo, 2-butenilo, 2-hexenilo e i-propenilo. El alquenilo puede estar sustituido o sin sustituir con uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

5 El término "alquinilo", como se define en el presente documento, es un alquilo insaturado que tiene al menos dos átomos de carbono y al menos un triple enlace carbono-carbono. El alquinilo puede estar sustituido o sin sustituir con uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

10 El término "arilo" describe grupos monocíclicos o policíclicos de anillos fusionados completamente de carbono (es decir, anillos que comparten pares de átomos de carbono adyacentes) que tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. El grupo arilo puede estar sustituido o sin sustituir con uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

15 El término "heteroarilo" describe un grupo monocíclico o de anillos fusionados (es decir, anillos que comparten un par de átomos adyacentes) que tiene en el anillo o anillos uno o más átomos, tal como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, que tiene un sistema de electrones pi completamente conjugados. Los ejemplos, sin limitación, de grupos heteroarilo incluyen pirrol, furano, tiofeno, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirimidina, quinolina, isoquinolina y purina. El grupo heteroarilo puede estar sustituido o sin sustituir con uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los ejemplos representativos son tiadiazol, piridina, pirrol, oxazol, indol, purina y similares.

25 El término "heteroalíclico", como se usa en el presente documento, describe un grupo monocíclico o de anillos fusionados que tiene en el anillo o anillos uno o más átomos tales como nitrógeno, oxígeno y azufre. Los anillos también pueden tener uno o más dobles enlaces. Sin embargo, los anillos no tienen un sistema de electrones pi completamente conjugados. El heteroalíclico puede estar sustituido o sin sustituir. El heteroalíclico sustituido puede tener uno o más sustituyentes, de modo que cada grupo sustituyente puede ser independientemente, por ejemplo, alquilo cicloalquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heteroarilo y heteroalíclico. Los ejemplos representativos son morfolina, piperidina, piperazina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano y similares.

30 El término "haluro", como se usa en el presente documento, se refiere al anión de un átomo de halo, es decir F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> e I<sup>-</sup>.

35 El término "halo" se refiere a átomos de F, Cl, Br e I como sustituyentes.

El término "alcoxi" se refiere a un anión R'-O<sup>-</sup>, en el que R' es como se ha definido anteriormente en el presente documento.

40 El término "hidroxialquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo hidroxilo, por ejemplo, hidroximetilo, p-phidroxietilo y 4-hidroxipentilo.

El término "alcoxialquilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi, por ejemplo, metoximetilo, 2-metoxietilo, 4-etoxibutilo, n-propoxietilo y t-butiletilo.

45 El resto (S)-4-amino-2-hidroxibutirilo, también se denomina AHB en el presente documento. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, una alternativa para el resto AHB puede ser el resto  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -aminopropionilo (AHP). Se cree que estas denominadas cadenas laterales o restos opcionales bloquean el acceso de enzimas que modifican aminoglucósido a los sitios diana. Además, AHB o AHP contienen un resto de 1,3- o 1,2-hidroxilamina que se une a fosfodiésteres y a la cara de la base de Hoogsten de la guanosina en el sitio A del ARNr

50 16S. En el presente documento se indica que de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, otros restos que implican una combinación de grupo(s) carbonilo(s), hidroxilo(s) y amino junto con un alquilo inferior que presente cualquier estereoquímica, se contemplan como sustituyentes opcionales en lugar de AHB y/o AHP. Por ejemplo, 2-amino-3-hidroxibutanoílo, 3-amino-2-hidroxipentanoílo, 5-amino-3-hidroxihexanoílo y similares.

55 En el presente documento, se debe entender que siempre que se hace una referencia a AHB, también están incluidos los grupos equivalentes como se describe en el presente documento (por ejemplo, AHP).

60 Como se usa en el presente documento, el término "resto" describe una parte, y preferentemente una parte principal, de una entidad química, tal como una molécula o un grupo, que ha experimentado una reacción química y no está unido con enlace covalente a otra entidad molecular.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, R<sub>1</sub> es alquilo.

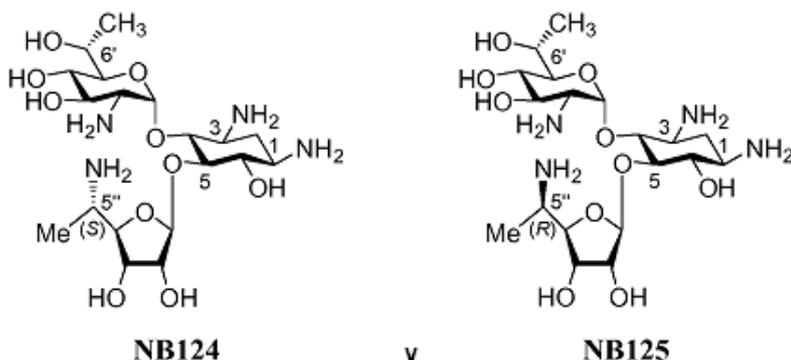
65 De acuerdo con algunas realizaciones, R<sub>1</sub> es un alquilo inferior como se define en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, metilo, etilo, propilo, butilo, e isopropilo. De acuerdo con otras realizaciones de la presente invención, R<sub>1</sub> es metilo.



cuenta para su uso en el tratamiento de trastornos genéticos, es decir, estos compuestos son menos tóxicos y más eficaces para la ultralectura de mutaciones prematuras de codón de finalización, como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente en las que R<sub>3</sub> es alquilo, R<sub>3</sub> es un alquilo inferior, como se define en el presente documento. De acuerdo con estas realizaciones, R<sub>3</sub> es metilo.

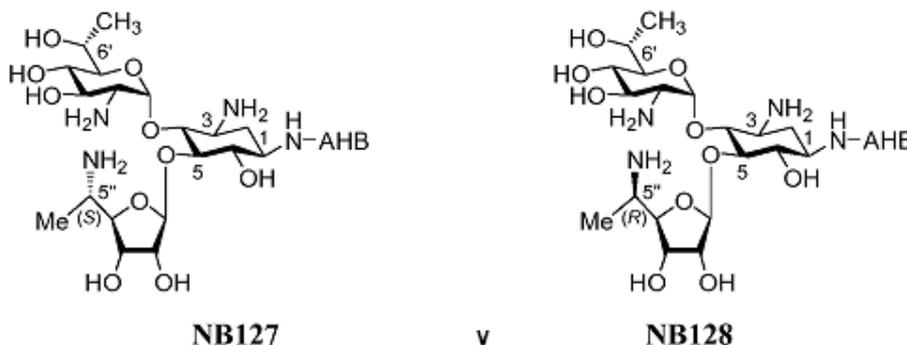
Los compuestos de aminoglucósido a modo de ejemplo que presentan hidrógeno en la posición R<sub>2</sub> y alquilo en la posición R<sub>3</sub> incluyen:



que se diferencian entre sí en la configuración estereoquímica del centro quiral en la posición 5'' del Anillo III.

En algunas realizaciones de la presente invención, R<sub>2</sub> es AHB y R<sub>3</sub> es alquilo. En términos de los puntos de farmacóforo presentados en el Esquema 1 (véase anteriormente), estos compuestos poseen los cinco puntos. Estos compuestos presentan el perfil farmacológico más superior en comparación con los compuestos y fármacos conocidos previamente en términos de menor citotoxicidad y mayor eficacia de ultralectura, como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación.

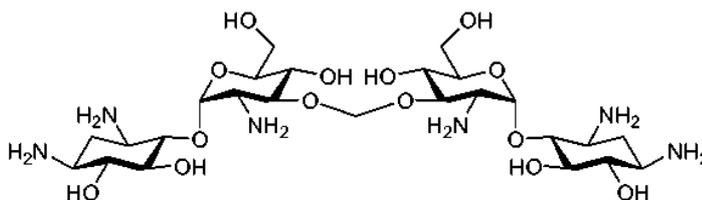
Los compuestos de aminoglucósido a modo de ejemplo en los que R<sub>2</sub> es AHB y R<sub>3</sub> es alquilo incluyen:



que se diferencian entre sí en la configuración estereoquímica del centro quiral en la posición 5'' del Anillo III.

A la vez que se buscaba una forma para predecir y evaluar de forma cuantitativa la capacidad de un aminoglucósido sintético para constituir un candidato a fármaco para el tratamiento de enfermedades genéticas causadas por mutaciones prematuras del codón de finalización (presentan actividad de ultralectura) y que al mismo tiempo presentan una citotoxicidad baja o ninguna citotoxicidad, se encontró que la selectividad elevada del compuesto con respecto a sistemas de traducción citoplasmática eucariotas (es decir, ribosomas citoplasmáticos eucariotas) en comparación con sistemas de traducción procariotas, que son similares o se parecen en cierta medida al sistema de traducción mitocondrial, se puede usar como una medida predictiva. Un valor numérico que se puede usar fácilmente para cuantificar esta selectividad es la proporción de  $Cl_{50}^{Euc} / Cl_{50}^{Pro}$  que correlaciona una inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la inhibición de la traducción en procariotas (véase, Tabla 3 a continuación en el presente documento). Como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, una selectividad notable de cualquier compuesto de aminoglucósido dado, tales como los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, hacia la inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la Inhibición de la traducción en procariotas se puede usar para predecir su eficacia y seguridad como candidato a fármaco para el tratamiento de trastornos genéticos asociados con votaciones prematuras del codón de finalización.

Sin embargo, en el presente documento se indica que la proporción de  $CI_{50}^{Euc}/CI_{50}^{Pro}$  que indica selectividad, no es un criterio suficiente para seleccionar candidatos a fármacos de esta familia de aminoglucósidos; también se debe considerar el mecanismo de inhibición de la traducción. Por ejemplo, se encontró que el aminoglucósido De referencia NB33 a modo de ejemplo, que es un dímero del compuesto precursor, paromamina, presenta un valor de proporción de aproximadamente 2, que se contempla como bajo y por lo tanto predictivo para un buen candidato a fármaco de ultralectura. Sin embargo, el compuesto de referencia NB33 a modo de ejemplo presenta esencialmente ninguna actividad de ultralectura. Se supone que el compuesto de referencia NB33 a modo de ejemplo inhibe el mecanismo de traducción de un modo diferente, como se muestra en el cristal del complejo entre el ARN del sitio A citoplasmático y el compuesto de referencia NB33 a modo de ejemplo [ChemBioChem, 2007, 8 (14), p. 1617].



NB33

Sin desear quedar ligado por una teoría en particular, una posible conclusión de la discusión mencionada anteriormente es que para que un aminoglucósido presentes rasgos deseados de un candidato a fármaco de ultralectura de mutación prematura del codón de finalización, 1) éste debería inhibir los ribosomas tanto procariotas como eucariotas con el mismo mecanismo que para unirse al sitio de unión de aminoacilo-ARNt y estabilizar la conformación de descodificación, o inhibir el proceso de producción de proteínas interfiriendo con la fidelidad del proceso de corrección; y 2) la proporción de  $CI_{50}^{Euc}/CI_{50}^{Pro}$  que favorece a los eucariotas también debería ir acompañada de una disminución significativa en la especificidad del compuesto con respecto al ribosoma procariota; en otras palabras, valores elevados de  $CI_{50}^{Pro}$ . Un ejemplo representativo de este requisito es G418; su proporción de  $CI_{50}^{Euc}/CI_{50}^{Pro}$  es 225, que es significativamente menor a la de la gentamicina pero aún es altamente tóxica como se indica mediante un valor de  $CI_{50}^{Pro}$  relativamente muy bajo.

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los compuestos presentados en el presente documento se caracterizan por una proporción de inhibición de la traducción  $CI_{50}$  en eucariotas con respecto a la inhibición de la traducción  $CI_{50}$  en procariotas inferior a 15, inferior a 10, inferior a 5 o inferior a 1, incluyendo cualquier valor intermedio entre 15 y 1.

Como se demuestra a continuación en el presente documento, a la vez que se preparan se someten a ensayo los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se ha observado que el aumento de la inhibición de la síntesis de proteínas citoplasmáticas procariotas también está asociado con un aumento de la actividad de ultralectura. Los datos presentados en la Tabla 3 muestran que la adición sistemática de puntos del farmacóforo presentado en el Esquema 1 aumenta de forma gradual la especificidad de los compuestos con respecto al ribosoma citoplasmático y disminuye su especificidad con respecto al ribosoma procariota.

Podría ser razonable esperar que los aminoglucósidos fueran selectivos hacia los procariotas, dado que los aminoglucósidos se han desarrollado mediante selección natural en el género *Streptomyces* y otras especies tales como las especies *Saccharopolispora erythraea*, para que sean activos frente a otros procariotas. Sin embargo, los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, presentan una inversión de la selectividad para sistemas de traducción eucariotas con respecto a procariotas (ribosoma).

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los compuestos presentados en el presente documento se caracterizan por una proporción de inhibición de la traducción  $CI_{50}$  en eucariotas con respecto a inhibición de la traducción  $CI_{50}$  en procariotas inferior a 15, inferior a 1.

Como se ha discutido anteriormente en el presente documento, un compuesto de aminoglucósido prometedor, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, es uno que no tenga una actividad antimicrobiana notable o de cualquier tipo. La no actividad de este tipo también es predictiva de una citotoxicidad baja o ninguna del compuesto para los mamíferos. Los resultados, que muestran que los compuestos a modo de ejemplo que se han preparado y sometido a ensayo para actividad antimicrobiana o carencia de la misma, se presentan en las Tablas 1 y 2 a continuación en el presente documento.

Por lo tanto, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, los compuestos presentados en el presente documento se caracterizan por un valor de MIC en bacterias Gram-negativas que es superior a 200  $\mu$ M, superior a 300  $\mu$ M, superior a 500  $\mu$ M, superior a 700  $\mu$ M, o superior a 1000  $\mu$ M, así como un valor de MIC en bacterias Gram-positivas que es superior a 20  $\mu$ M, superior a 40  $\mu$ M, superior a 80  $\mu$ M, o superior a 100  $\mu$ M.

Las presentes realizaciones incluyen además cualquier enantiómero, diastereómero, profármaco, solvato, hidrato y/o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos que se describen en el presente documento.

5 Como se usa en el presente documento, el término "enantiómero" se refiere a un estereoisómero de un compuesto que es superponible con respecto a su homólogo solamente mediante una inversión/reflexión completa (imagen especular) entre sí. Se dice que los enantiómeros tienen "quiralidad" ya que se relacionan entre sí como la mano izquierda y la mano derecha. Los enantiómeros tienen propiedades químicas y físicas idénticas excepto cuando están presentes en un entorno que tiene quiralidad por sí mismo, tales como todos los sistemas vivos. En el contexto de las presentes realizaciones, un compuesto puede presentar uno o más centros quirales, cada uno de los cuales presenta una configuración *R* o *S* y cualquier combinación, y los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, pueden tener cualquiera de sus centros quirales presentando una configuración *R* o *S*.

15 El término "diastereómeros", como se usa en el presente documento, se refiere a estereoisómeros que no son enantiómeros entre sí. La diastereoisomería se produce cuando dos o más estereoisómeros de un compuesto tienen diferentes configuraciones en uno o más, pero no en todos centros estereogénicos equivalentes (relacionados) y no son imágenes especulares entre sí. Cuando dos diastereoisómeros se diferencian entre sí solamente en un centro estereogénico estos son epímeros. Cada centro estereogénico (centro quiral) da lugar a dos configuraciones diferentes y por lo tanto a dos estereoisómeros diferentes. En el contexto de la presente invención, las realizaciones de la presente invención incluyen compuestos con múltiples centros quirales que se producen en cualquier combinación de configuración estereoquímica, es decir, cualquier diastereómero.

25 El término "profármaco" se refiere a un agente, que se convierte en el compuesto activo (el fármaco precursor activo) *in vivo*. Los profármacos por lo general son útiles para facilitar la administración del fármaco precursor. Pueden estar, por ejemplo, biodisponibles mediante administración oral mientras que el fármaco precursor no lo está. Un profármaco también puede presentar una mejora de la solubilidad en comparación con el fármaco precursor en composiciones farmacéuticas. A menudo los profármacos también se usan para conseguir una liberación sostenida del compuesto activo *in vivo*. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco podría ser un compuesto de la presente invención, que tenga uno o más restos de ácido carboxílico, que se administra como un éster (el "profármaco"). Un profármaco de este tipo se hidroliza *in vivo*, para proporcionar de ese modo el compuesto libre (el fármaco precursor). El éster seleccionado puede influir tanto en las características de solubilidad como en la tasa de hidrólisis del profármaco.

35 El término "solvato" se refiere a un complejo de estequiometría variable (por ejemplo, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, etc.), que se forma con un soluto (el compuesto de la presente invención) y un disolvente, de modo que el disolvente no interfiere en la actividad biológica del soluto. Los disolventes adecuados incluyen, por ejemplo, etanol, ácido acético y similares.

40 El término "hidrato" se refiere a un solvato, como se ha definido anteriormente en el presente documento, en el que el disolvente es agua.

45 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una especie cargada del compuesto precursor y su contraión, que por lo general se usa para modificar las características de solubilidad del compuesto precursor y/o para reducir cualquier irritación significativa a un organismo por el compuesto precursor, mientras que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un ejemplo, sin limitación, de una sal farmacéuticamente aceptable podría ser un anión hidroxilo ( $O^-$ ) y un catión tal como, pero no ha limitado a, amonio, sodio, potasio y similares. Otro ejemplo, sin limitación, de una sal farmacéuticamente aceptable podría ser un catión de amonio y una sal de adición de ácido del mismo. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen, pero no se limitan a, sal de adición de ácido clorhídrico, sal de adición de ácido sulfúrico (sal sulfato), sal de adición de ácido acético, sal de adición de ácido ascórbico, sal de adición de ácido bencenosulfónico, sal de adición de ácido canforsulfónico, sal de adición de ácido cítrico, sal de adición de ácido maleico, sal de adición de ácido metanosulfónico, sal de adición de ácido naftalenosulfónico, sal de adición de ácido oxálico, sal de adición de ácido fosfórico, sal de adición de ácido succínico, sal de adición de ácido sulfúrico, sal de adición de ácido tartárico y sal de adición de ácido toluenosulfónico.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la sal de adición de ácido es una sal de sulfato.

Además de acuerdo con la presente invención, se proporcionan procesos para preparar los compuestos que se describen en el presente documento.

60 Las rutas de síntesis que se describen en el presente documento incluyen una reacción entre un aceptor y un dador, de modo que el término "aceptor" se usa en el presente documento para describir la estructura del esqueleto obtenido a partir de la paromamina que tiene al menos uno y preferentemente un grupo hidroxilo disponible (no protegido) seleccionado de forma selectiva en posiciones tales como C5, C6 y C3', que es un reactivo durante una reacción de glicosilación, y puede aceptar un glicosilo, y el término "dador" se usa en el presente documento para describir el glicosilo. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la posición en el aceptor es la posición C5.

El término "glicosilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo químico que se obtiene mediante la retirada del grupo hidroxilo de la función hemiacetal de un monosacárido y, por extensión, de un oligosacárido inferior.

El término "monosacárido", como se usa en el presente documento se conoce bien en la técnica, se refiere a una forma sencilla de un azúcar que consiste en una única molécula de sacárido que no se puede descomponer adicionalmente por hidrólisis. Los ejemplos más habituales de monosacáridos incluyen glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa, y ribosa. Los monosacáridos se puede clasificar de acuerdo con el número de átomos de carbono del carbohidrato, es decir, triosa, que tiene 3 átomos de carbono tales como gliceraldehído y dihidroxiacetona; tetrosa, que tiene 4 átomos de carbono tales como eritrosa, treosa y eritrolusa; pentosa, que tiene 5 átomos de carbono tales como arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa y xilulosa; hexosa, que tiene 6 átomos de carbono tales como alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa y tagatosa; heptosa, que tiene 7 átomos de carbono tales como manoheptulosa, sedoheptulosa; octosa, que tiene 8 átomos de carbono tal como 2-ceto-3-desoxi-mano-octonato; nonosa, que tiene 9 átomos de carbono como sialosa; y decosa, que tiene 10 átomos de carbono. Los monosacáridos son los componentes básicos de oligosacáridos tales como sacarosa (azúcar común) y otros polisacáridos (tales como celulosa y almidón).

El término "oligosacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende dos o más unidades de monosacárido, tal como éstas se definen en el presente documento. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, un oligosacárido comprende 2-6 monosacáridos. Como alternativa, un oligosacárido comprende 2-4 monosacáridos, o como alternativa adicional, un oligosacárido es un resto de disacárido, que tiene dos unidades de monosacárido.

Los donadores y aceptores se diseñan para formar los compuestos deseados de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Lo sucesivo describe algunas realizaciones de este aspecto de la presente invención, presentando procesos a modo de ejemplo de preparación de subconjuntos a modo de ejemplo de los compuestos que se describen en el presente documento. Los procesos detallados de la preparación de compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, se presentan en la sección de Ejemplos que sigue a continuación.

Las síntesis de los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, generalmente incluyen (i) preparar un compuesto aceptor mediante protección selectiva de uno o más hidroxilos y aminos en posiciones seleccionadas presentes en el armazón de paromamina, dejando una o dos posiciones sin proteger y por lo tanto libres para aceptar un compuesto dador (glicosilo) como se define en el presente documento; (ii) preparar un compuesto dador mediante protección selectiva de uno o más hidroxilos y aminos en posiciones seleccionadas presentes en el glicosilo, dejando una posición sin proteger y por lo tanto libre para acoplarse con un compuesto aceptor como se define en el presente documento; (iii) someter al dador y al aceptor a una reacción de acoplamiento; y (iii) retirar todos los grupos protectores para obtener de ese modo el compuesto deseado.

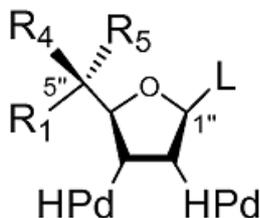
La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento, se refiere a un sustituyente que se usa normalmente para bloquear o proteger un grupo funcional en particular a la vez que reacciona con otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector de amino" es un sustituyente unido a un grupo amino que bloquea o protege el grupo funcional amino en el compuesto. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen azida (azido), N-ftalimido, N-acetilo, N-trifluoroacetilo, N-t-butoxicarbonilo (BOC), N-benciloxicarbonilo (CBz) y N-9-fluorenilmetileno carbonilo (Fmoc). De forma análoga, un "grupo protector de hidroxilo" se refiere a un sustituyente de un grupo hidroxilo que bloquea o protege al grupo funcional hidroxilo. Los grupos protectores adecuados incluyen cetal de isopropilideno y dimetil cetal de ciclohexanona (formando un 1,3-dioxano con dos grupos hidroxilo adyacentes), 4-metoxi-1-metilbenceno (formando un 1,3-dioxano con dos grupos hidroxilo adyacentes), O-acetilo, O-cloroacetilo, O-benzoilo y O-sililo. Para una descripción general de grupos protectores y su uso, véase T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

De acuerdo con algunas realizaciones, los grupos protectores de amino incluyen un grupo azido (N<sub>3</sub>-) y/o un grupo N-ftalimido, y los grupos protectores de hidroxilo incluyen O-acetilo (AcO-), O-benzoilo (BzO-) y/o O-cloroacetilo. En el presente documento se indica que cuando sea aplicable, un "grupo protector" se refiere a un resto que puede proteger un grupo funcional reactivo o más de un grupo funcional en un compuesto al mismo tiempo, tal como en el caso de dos grupos funcionales adyacentes, por ejemplo, dos grupos hidroxilo que se pueden proteger al mismo tiempo con un cetal de isopropilideno.

Por lo tanto, se proporciona un proceso para preparar los compuestos que tienen la Fórmula general I como se presenta en el presente documento. El proceso se realiza mediante la preparación de un compuesto aceptor protegido de forma adecuada y un compuesto dador protegido de forma adecuada, acoplando estos dos compuestos entre sí, y posteriormente retirando todos los grupos protectores del compuesto resultante.

El compuesto dador es un monosacárido protegido que se puede representar con la Fórmula general II, que tiene un grupo saliente en la posición 1" del mismo, indicado como L, y un alquilo, cicloalquilo o arilo en la posición 5", indicado como R<sub>1</sub>:

5



Fórmula II

en la que:

- 10 R<sub>1</sub> es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;  
 R<sub>4</sub> es hidrógeno o un grupo protector de amino dador;  
 R<sub>5</sub> es un grupo protector de amino dador si R<sub>4</sub> es hidrógeno o hidrógeno si R<sub>4</sub> es un grupo protector de amino dador; y  
 cada uno de HPd es un grupo protector de hidroxilo dador.

15

En el presente documento se indica que la configuración estereoquímica absoluta del centro quiral en la posición 5" se determina mediante la identidad de R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub>, dando ambas opciones de configuración R y S como dos dadores individuales y separables (que son diastereómeros) o como una mezcla racémica de los mismos. Un proceso detallado para obtener cada uno de los compuestos dadores R y S y un método para asignar la configuración estereoquímica absoluta de los mismos se presenta en la sección Ejemplos que sigue a continuación.

20

Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo saliente" describe un átomo, grupo o resto químico lábil que experimenta rápidamente la separación de una molécula orgánica durante una reacción química, mientras que la separación está facilitada por la estabilidad relativa del átomo, grupo o resto saliente en el mismo. Por lo general, cualquier grupo que sea la base conjugada de un ácido fuerte puede actuar como un grupo saliente. Los ejemplos representativos de grupos salientes adecuados de acuerdo con las presentes realizaciones de los mismos incluyen, pero no se limitan a, tricloroacetimidato, acetato, tosilato, triflato, sulfonato, azida, haluro, hidroxilo, tiohidroxilo, alcoxi, cianato, tiocianato, nitro y ciano.

25

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el grupo saliente es tricloroacetimidato, que proporciona los resultados más satisfactorios en la reacción de acoplamiento con el aceptor, aunque se contemplan otros grupos salientes.

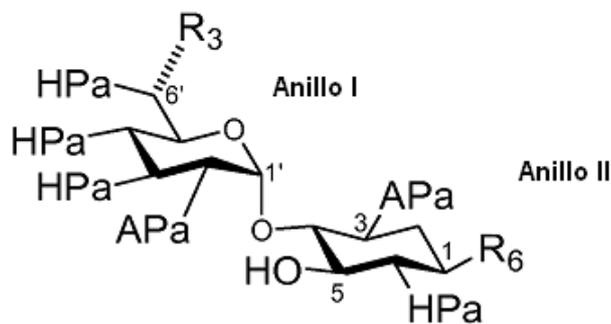
35 De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, cada uno de los grupos protectores de hidroxilo dadores es O-benzoilo y el grupo protector de amino dador en cualquiera de R<sub>4</sub> o R<sub>5</sub> es azido, aunque se contemplan otros grupos protectores.

40 La estructura del compuesto dador establece la estructura absoluta del Anillo III en el compuesto resultante de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, es decir, la configuración estereoquímica de la posición 5" y del tipo de alquilo en esa posición. Los compuestos dadores a modo de ejemplo, adecuados para proporcionar compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, incluyen el Compuesto (S)-17 y El Compuesto (R)-18, cuya preparación se ilustra en el Esquema 2 que sigue a continuación en el presente documento.

40

45 El aceptor, de acuerdo con algunas realizaciones, tiene la Fórmula general III:

45



Fórmula III

en la que:

la línea discontinua indica una configuración R o una configuración S;

R<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;

R<sub>6</sub> es un grupo protector de amino aceptor o (S)-4-azido-2-O-acetil-1-butilo (una forma protegida de AHB);

HPa es un grupo protector de hidroxilo aceptor; y

APa es un grupo protector de amino aceptor.

De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el grupo protector de hidroxilo aceptor es O-acetilo, y el grupo protector de amino dador es azido, aunque se contemplan otros grupos protectores.

En el presente documento se indica que la realización a modo de ejemplo proporcionada anteriormente en el presente documento se refiere a un grupo al protegido para AHB, sin embargo no pretende ser limitante del uso del resto AHB así como de otros restos útiles, tales como AHP como se ha presentado anteriormente en el presente documento, que se pueden usar en su lugar. En esos casos, el proceso se modificará usando un compuesto aceptor en el que los grupos reactivos del resto usado en lugar de AHB están protegidos en consecuencia.

La estructura del compuesto aceptor establece la estructura absoluta del Anillo I y del Anillo II en el compuesto resultante de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, es decir, la configuración estereoquímica de la posición 6' y el tipo de alquilo en esa posición cuando está presente, y el sustituyente en el grupo amino en la posición N1. Los compuestos aceptores a modo de ejemplo, adecuados para proporcionar compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, incluyen los Compuestos 19, 20, 219 y 220, cuya preparación se ilustra en el Esquema 3 y en el Esquema 4 que sigue a continuación en el presente documento.

Por lo tanto el proceso se realiza al:

(a) proporcionar tanto el compuesto dador deseado como el compuesto aceptor deseado;

(b) acoplar el compuesto aceptor mencionado anteriormente al compuesto dador mencionado anteriormente (también denominado reacción de glicosilación); y

(c) retirar posteriormente cada uno de los grupos protectores para obtener ese modo el compuesto deseado.

Por ejemplo, el compuesto NB118 a modo de ejemplo se puede proporcionar desprotegiendo el Compuesto (S)-21, que se obtiene por glicosilación (acoplamiento) del Compuesto aceptor 19 con el Compuesto dador (S)-17. De forma correspondiente, el compuesto NB119 a modo de ejemplo se obtiene desprotegiendo el Compuesto (R)-22 que es el producto del acoplamiento del Compuesto aceptor 19 con el Compuesto dador (R)-18.

De forma análoga, el compuesto NB122 a modo de ejemplo se proporciona desprotegiendo el Compuesto (S)-23, el producto del acoplamiento del Compuesto aceptor 20 y el Compuesto dador (S)-17. De forma correspondiente, el compuesto NB123 a modo de ejemplo se obtiene desprotegiendo el Compuesto (R)-24 que es el producto de acoplamiento del Compuesto aceptor 20 con el Compuesto dador (R)-18.

El compuesto NB124 a modo de ejemplo se proporciona desprotegiendo el Compuesto (S)-221, el producto del acoplamiento entre el Compuesto aceptor 219 y el Compuesto dador (S)-17. De forma correspondiente, el compuesto NB125 a modo de ejemplo se obtiene desprotegiendo el Compuesto (R)-222 que es el producto de acoplamiento del Compuesto aceptor 219 con el Compuesto dador (R)-18.

El compuesto NB127 a modo de ejemplo se proporciona desprotegiendo el Compuesto (S)-223, el producto del acoplamiento entre el Compuesto aceptor 220 y el Compuesto dador (S)-17. De forma correspondiente, el compuesto NB128 a modo de ejemplo se obtiene desprotegiendo el Compuesto (R)-224 que es el producto de acoplamiento del Compuesto aceptor 220 con el Compuesto dador (R)-18.

Como se demuestra en la sección de Ejemplos que sigue a continuación, los compuestos presentados en el presente documento se diseñaron para que, y ciertamente se mostró que, poseyeran una actividad de supresión de mutación de truncamiento, es decir, la capacidad para inducir la ultralectura de una mutación prematura del codón de finalización. Una actividad de este tipo hace que estos compuestos sean adecuados para su uso como agentes terapéuticamente activos para el tratamiento de trastornos genéticos, y en particular tales trastornos que se caracterizan por una mutación de truncamiento.

Por lo tanto, se desvela un uso de los compuestos desvelados en el presente documento con la Fórmula general I para tratar un trastorno genético. Entre tanto se realiza mediante la administración, a un sujeto con necesidad del mismo, de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos presentados en el presente documento que tienen una Fórmula general I.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, sustancialmente inhibir, reducido invertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" describe una cantidad del polímero que se está administrando que aliviará hasta cierto punto uno o más de los síntomas de la afección que se está tratando.

La expresión "trastorno genético", como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno crónico que es causado por uno o más genes defectuosos que a menudo se heredan de los padres, y que puede ser producido de forma inesperada cuando dos vehículos sanos de un gen recesivo defectuoso se reproducen, o cuando el gen defectuoso es dominante. Los trastornos genéticos se pueden producir en diferentes patrones de herencia que incluyen el patrón autosómico dominante en el que solo se necesita una copia mutada del gen para que una descendencia se vea afectada, y el patrón autosómico recesivo en el que se deben mutar dos copias del gen para que una descendencia se vea afectada.

De acuerdo con algunas realizaciones el trastorno genético implica un gen que tiene una mutación de truncamiento que conduce a una traducción incorrecta del mismo. La traducción incorrecta produce una reducción o abolición de la síntesis de una proteína esencial.

Los trastornos genéticos de este tipo a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística (CF), distrofia muscular de Duchenne (DMD), ataxia-telangiectasia, síndrome de Hurler, hemofilia A, hemofilia B, síndrome de Usher y Tay-Sachs.

Por consiguiente, se proporciona un uso de un compuesto que tiene la Fórmula general I como se presenta en el presente documento en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno genético.

En cualquiera de los métodos y usos que se describen en el presente documento, los compuestos que se describen en el presente documento se pueden usar ya sea *per se* o formar parte de una herramienta farmacéutica, que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Por lo tanto, además de acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende, como un principio activo, cualquiera de los nuevos compuestos que se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en el presente documento una "composición farmacéutica" se refiere a la preparación de los compuestos presentados en el presente documento, con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables y adecuados. La finalidad de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En lo sucesivo en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo o un diluyente que no produce una irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Los ejemplos, sin limitaciones, de vehículos son: propilenglicol, solución salina, emulsiones y mezclas de disolventes orgánicos con agua, así como vehículos sólidos (por ejemplo, en polvo) y gaseosos.

En el presente documento el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un compuesto. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulado, formación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

5 Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los compuestos presentados en el presente documento en preparaciones que se pueden usar por vía farmacéutica. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

10 De acuerdo con algunas realizaciones, la administración se realiza por vía oral. Para la administración oral, los compuestos presentados en el presente documento se pueden formularse fácilmente combinando los compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Los vehículos de este tipo permiten que los compuestos presentados en el presente documento se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, 15 cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para la ingesta oral por un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar usando un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, 20 en particular, cargas tales como azúcares lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilo pirrolidona reticulada, goma de agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico.

25 Las composiciones farmacéuticas, que se pueden usar por vía oral, incluyen cápsulas duras de ajuste a presión preparadas con gelatina así como cápsulas blandas selladas preparadas con gelatina y un agente plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras de ajuste a presión pueden contener los principios activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, agentes estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos presentados en el 30 presente documento se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden agregar agentes estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deberían presentarse en dosificaciones adecuadas para la vía de administración elegida.

35 Para inyección, los compuestos presentados en el presente documento se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o el tampón salino fisiológico con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol.

40 Para la administración transmucosal, en la formulación se usan agentes penetrantes. En la técnica se conocen generalmente agentes penetrantes de este tipo.

45 Los núcleos de gragea se proporcionan con revestimientos adecuados. Para esta finalidad, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinil pirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o revestimientos de grageas para 50 identificado o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos de aminoglucósido.

Para administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas para chupar formulados de manera convencional.

50 Para administración por inhalación, los compuestos presentados en el presente documento se administran convenientemente en forma de una presentación en pulverización de aerosol (que por lo general incluye vehículos en polvo, licuados y/o gaseosos) desde un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un agente propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para 55 suministrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en un inhalador o insuflador que contenga una mezcla en polvo de los compuestos presentados en el presente documento y una base en polvo adecuada tal como, pero no limitada a, lactosa o almidón.

60 Los compuestos presentados en el presente documento se pueden formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de múltiples dosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o 65 dispersantes.

5 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación de los compuestos en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los compuestos presentados en el presente documento se pueden preparar en forma de suspensiones y emulsiones apropiadas para inyección oleosas (por ejemplo, emulsiones de agua en aceite, aceite en agua o agua en aceite en aceite). Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosa pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetil celulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener agentes estabilizantes o agentes adecuados, que aumentan la solubilidad de los compuestos presentados en el presente documento para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

10 Como alternativa, los compuestos presentados en el presente documento pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

15 Los compuestos presentados en el presente documento también se pueden formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

20 Las mezclas químicas aquí descritas también pueden comprender sólidos adecuados de vehículos o excipientes en fase de gel. Los ejemplos de los vehículos o excipientes de este tipo incluyen, pero no se limitan a, carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

25 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para conseguir la finalidad pretendida. De forma más específica, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a una cantidad de compuestos presentados en el presente documento eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas del trastorno, o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

30 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada que se proporciona en el presente documento.

35 Para cualquier compuesto presentado en el presente documento usado en los métodos de las presentes realizaciones, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede calcular inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentraciones circulantes que incluya los niveles de supresión de mutación tal como se determina mediante ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración de los compuestos de ensayo que consigue una ultralectura sustancial de la mutación de truncamiento). Una información de este tipo se puede usar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

40 La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos presentados en el presente documento se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales de experimentación, por ejemplo, determinando la  $CE_{50}$  (la concentración de un compuesto en la que se observa un 50 % de su efecto máximo) y la  $DL_{50}$  (dosis letal que produce la muerte en un 50 % de los animales sometidos a ensayo) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos de estos ensayos de actividad y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos.

50 La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual a la vista de la afección del paciente. (Véase por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1 p.1).

55 La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar de forma individual para proporcionar niveles plasmáticos de los compuestos presentados en el presente documento que se han suficientes para mantener los efectos deseados, denominado concentración eficaz mínima (MEC). La MEC variará para cada preparación, pero se puede calcular a partir de datos *in vitro*; por ejemplo, la concentración de los compuestos necesaria para conseguir un 50-90 % de expresión del gen completo que tiene una mutación de truncamiento, es decir, ultralectura del codón de mutación. Las dosificaciones necesarias para conseguir la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Para determinar las concentraciones plasmáticas se pueden usar ensayos o bioensayos de HPLC.

60 Los intervalos de dosificación también se pueden determinar usando el valor de MEC. Las preparaciones se deberían administrar usando un régimen que mantuviera los niveles plasmáticos por encima de la MEC durante un 10-90 % del tiempo, preferentemente entre un 30-90 % y lo más preferentemente un 50-90 %.

65 Dependiendo de la gravedad y capacidad de respuesta de la afección crónica a tratar, la dosificación también puede ser una única administración periódica de una composición de liberación lenta descrita anteriormente en el presente

documento, con un periodo de tratamiento periódico que dura de varios días a varias semanas o hasta que se produce una mejora suficiente durante el tratamiento periódico o se consigue la disminución sustancial de la patología para el tratamiento periódico.

5 La cantidad de una composición a administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se está tratando, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico que prescribe, etc. Si se desea, las composiciones de la presente invención se pueden presentar en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (la U.S. Food and Drug Administration) que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como, 10 pero no limitado a, un envase de tipo blíster o un recipiente presurizado (para inhalación). El envase o dispositivo dispensador también puede ir acompañado de instrucciones para su administración. El envase o el dispositivo dispensador también puede ir acompañado de un aviso asociado al envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuyo aviso refleja la aprobación de la agencia de la forma de las composiciones. Para administración en seres humanos o veterinaria. Un aviso de este tipo, por ejemplo, puede tener un etiquetado aprobado por la U.S. Food and Drug Administration para fármacos con receta médica o un prospecto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de acuerdo con las presentes realizaciones, formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también se pueden preparar, se pueden colocar en un envase apropiado y se pueden etiquetar para el tratamiento de una afección o diagnóstico indicado, tal como se ha detallado anteriormente en el presente documento.

20 Por lo tanto, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica de forma impresa, en o sobre el material de envasado, para uso en el tratamiento de un trastorno genético, como se define en el presente documento.

25 En cualquiera de las composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento, los compuestos se pueden utilizar en combinación con otros agentes útiles en el tratamiento del trastorno genético.

Estando principalmente dirigido al tratamiento de trastornos genéticos, que son crónicos por definición, se espera que los compuestos presentados en el presente documento o las composiciones farmacéuticas que los contienen se administren durante toda la vida del sujeto que se está tratando. Por lo tanto, el modo de administración de las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos debería ser de un modo tal que fuera fácil y cómodo para su administración, preferentemente mediante autoadministración, y de un modo tal que tuviera el menor impacto en el bienestar y el periodo de vida del paciente.

35 La administración repetitiva y periódica de los compuestos presentados en el presente documento o las composiciones químicas que los contienen se puede realizar, por ejemplo, a diario, es decir una vez al día, más preferentemente la administración se realiza de forma semanal, es decir una vez a la semana, más preferentemente la administración se realiza de forma mensual, es decir una vez al mes, y de la manera más preferente la administración se realiza una vez cada varios meses (por ejemplo, cada 1,5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 40 meses, o incluso 6 meses).

Como se ha discutido anteriormente en el presente documento, algunas de las limitaciones para usar los aminoglucósidos conocidos en la actualidad como fármacos de ultralectura de mutación de truncamiento están asociadas con el hecho de que son principalmente agentes antibacterianos (usados como agentes antibióticos). El uso crónico de cualquier agente antibacteriano está altamente injustificado e incluso es potencialmente mortal ya que altera la flora microbiana intestinal que puede causar o empeorar otras afecciones médicas tales como empeoramiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, y puede producir la aparición de resistencia en algunas cepas patológicas de microorganismos.

50 En algunas realizaciones, los compuestos presentados en el presente documento no tienen sustancialmente actividad antibacteriana. Por "ninguna actividad antibacteriana" se hace referencia a que la concentración de inhibición mínima (MIC) de la misma para una cepa en particular es mucho más elevada que la concentración de un compuesto que se considera un antibiótico con respecto a esta cepa. Además, la MIC de estos compuestos es notablemente más elevada que la concentración requerida para ejercer actividad de supresión de mutación de truncamiento.

Dado que son sustancialmente no bactericidas, los compuestos presentados en el presente documento no ejercen los efectos adversos mencionados anteriormente y, por lo tanto, se pueden administrar por vías de absorción que pueden contener incluso microorganismos benignos y/o beneficiosos que no están dirigidos y por lo tanto su conservación puede ser incluso necesaria. Esta característica importante de los compuestos presentados en el presente documento hace que estos compuestos sean fármacos particularmente eficaces contra afecciones crónicas, ya que pueden se pueden administrar de forma repetitiva y durante toda la vida, sin producir efectos acumulativos y adversos relacionados con agentes antibacterianos, y además se pueden administrar por vía oral o por vía rectal, es decir a través del GI, que es una característica muy útil e importante para un fármaco dirigido al tratamiento de trastornos crónicos.

Como se ha discutido anteriormente en el presente documento, de acuerdo con algunas realizaciones, los compuestos presentados en el presente documento son selectivos hacia el sistema de traducción celular eucariota con respecto al de las células procariotas, es decir, los compuestos presentan una actividad más elevada en células eucariotas, tales como las de mamíferos (seres humanos) en comparación con su actividad en células procariotas, tales como las de las bacterias. Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, se supone que los compuestos presentados en el presente documento, que se sabe que actúan uniéndose al sitio A del ARN ribosómico 16S mientras que el ribosoma está implicado en la traducción de un gen, tienen una afinidad más elevada con el sitio A ribosómico eucariota, o de otro modo son selectivos con respecto al sitio A eucariota, con respecto al sitio A ribosómico procariota, así como al sitio A ribosómico mitocondrial que se asemeja a su homólogo procariota.

Como se usa en el presente documento el término "aproximadamente" se refiere a  $\pm 10\%$ .

Los términos "comprende", "comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados se refieren a "que incluye pero no se limita a".

La expresión "que consiste en" se refiere a "que incluye y se limita a".

La expresión "que consiste esencialmente en" se refiere a que la composición, método o estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes etapas y/o partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, método o estructura reivindicados.

Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "uno" y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto no indique claramente de otro modo. Por ejemplo, las expresiones "un compuesto" o "al menos un compuesto" pueden incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos. A lo largo de la presente solicitud, diversas realizaciones de la presente invención se pueden presentar en un formato de intervalos. Se debería entender que la descripción en formato de intervalos se produce simplemente por conveniencia y brevedad y no se debería interpretar como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debería considerar que la descripción de un intervalo presenta todos los posibles subintervalos desvelados de forma específica así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debería considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 presenta subintervalos desvelados de forma específica tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

Siempre que en el presente documento se indica un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número mencionado (fraccionario o integral) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número de indicado y un segundo indicado y "que varía/varía desde" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente en el presente documento y se entiende que incluyen el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

Como se usa en el presente documento el término "método" se refiere a formas, medios, técnicas y procedimientos para conseguir una tarea dada que incluyen, pero no se limitan a, las formas, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de formas, medios, técnicas y procedimientos por parte de los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se espera que durante la vigencia de una patente que venza a partir de la presente solicitud se desarrollen muchos aminoglucósidos pertinentes que tengan un grupo alquilo en la posición 5" y el alcance de este término pretende incluir todas esas nuevas tecnologías *a priori*.

Se observa que ciertas características de la invención, que, con fines de claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una única realización. Por el contrario, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o cuando sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no se deben considerar características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no sea eficaz con esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones encuentran apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

### Ejemplos

A continuación se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones mencionadas anteriormente ilustran algunas realizaciones de la invención de una manera no limitante.

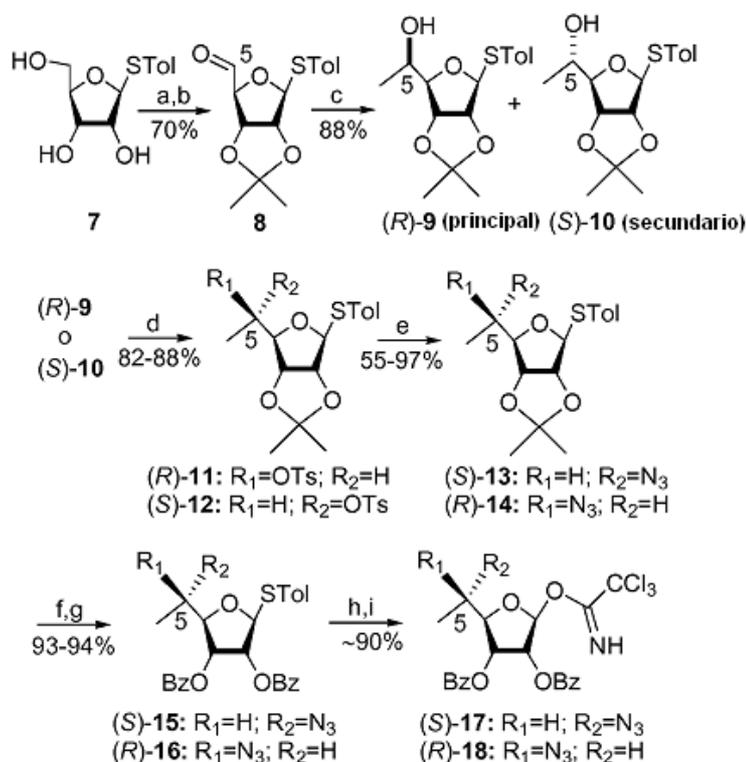
## EJEMPLO 1

## SÍNTESIS QUÍMICA

## 5 Procedimientos de síntesis

Los compuestos NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128 se sintetizaron de acuerdo con un procedimiento general que implica la construcción del Anillo III en forma de los compuestos individuales que poseen (S)-5-metilo y (R)-5-metilo con una estereoquímica ya establecida (Compuesto (S)-17 y Compuesto (R)-18), y usándolos como dadores para las reacciones de glicosilación. Estos valores fueron rápidamente accesibles a partir del tioglucósido conocido, Compuesto 7, tal como se ilustra en el Esquema 2 que sigue a continuación (en el que "a" representa 1,1-dimetoxipropano, CSA, acetona, temperatura ambiente; "b" representa peryodinano de Dess-Martin (DMP), DCM, temperatura ambiente; "c" representa MeMgBr, THF, -30 °C; "d" representa TsCl, Py, 4-DMAP, temperatura ambiente; "e" representa NaN<sub>3</sub>, HMPA, DMF, 70 °C; "f" representa ácido acético/agua (8:2), reflujo; "g" representa BzCl, Py, 4-DMAP, temperatura ambiente; "h" representa NBS, acetona/agua (8:2), -30 °C; e "i" representa CC13CN, DBU, DCM, 0 °C).

Esquema 2



20 La protección selectiva de los hidroxilos en C2 y C3 con isopropilidino (2,2-dimetoxi propano/acetona, CSA) fue seguida por la oxidación del alcohol primario restante usando peryodinano de Dess-Martin (DMP, diclorometano) para proporcionar el aldehído, Compuesto 8, con un rendimiento aislado de un 70 % para dos etapas. El tratamiento del Compuesto 8 con MeMgBr proporcionó el alcohol secundario correspondiente en forma de una mezcla de diastereómeros C5 (proporción de 4:1 ratio) con un rendimiento aislado de un 88 %. Esta mezcla se separó por cromatografía en columna ultrarrápida y el diastereómero principal se sometió por separado para la asignación de una estereoquímica absoluta en la posición C5 (véase a continuación). Este estudio establecía que los diastereómeros principal y secundarios presentan configuración (R) y (S), respectivamente (Compuestos (R)-9 y (S)-10).

30 Las siguientes etapas en el Esquema 2 se realizan por separado en cada diastereómero. La tosilación (TsCl, piridina, 4-DMAP) del alcohol secundario fue seguida por un desplazamiento S<sub>N</sub>2 de los tosilatos correspondientes (Compuestos (R)-11 y (S)-12) con NaN<sub>3</sub> (DMF, HMPA) para formar las azidas, Compuestos (S)-13 y (R)-14, con configuraciones invertidas. La hidrólisis del cetal de isopropilideno con ácido acético acuoso, seguido de benzoilación de los alcoholes secundarios resultantes, proporcionó los benzoatos, Compuestos (S)-15 y (R)-16. En estudios iniciales sobre el ensamblaje de los pseudotrisacáridos de referencia a modo de ejemplo, NB30 y NB54 han

demostrado que los aceptores de C5 deseados son menos reactivos en reacciones de glicosilación, y los dadores de tricloroacetimidato proporcionaban resultados satisfactorios.

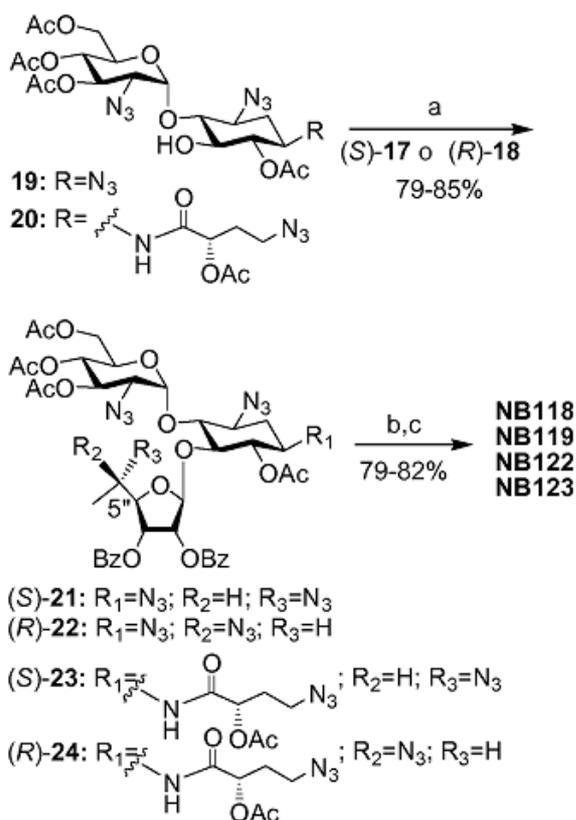
5 Se observa que la reacción de glicosilación usando dadores de tioglucósido tales como (S)-15 y (R)-16 (véase, el Esquema 2 mencionado anteriormente) como dadores, se puede proporcionar en presencia de diversos reactivos de glicosilación incluyendo N-yodosuccinimida (NIS) y ácido triflorometano sulfónico (HOTf); o NIS y triflato de plata (AgOTf).

10 Por lo tanto, los tioglucósidos, Compuestos (S)-15 y (R)-16, se convirtieron en los correspondientes tricloroacetimidatos, Compuestos (S)-17 y (R)-18, en dos etapas sucesivas; hidrólisis con NBS en acetona acuosa y tratamiento de los hemiacetales resultantes con  $\text{CCl}_3\text{CN}$  en presencia de DBU. Los Compuestos dadores (S)-17 y (R)-18 se usaron en reacciones de glicosilación sin purificación adicional.

15 La síntesis de los compuestos pseudotrisacáridos a modo de ejemplo, NB118, NB119, NB122 y NB123, se consiguió a partir de los correspondientes compuestos aceptores pseudodisacáridos protegidos de forma selectiva, Compuestos 19 y 20, como se ha informado anteriormente (WO 2007/113841), y los compuestos dadores, Compuestos (S)-17 y (R)-18, usando esencialmente las mismas transformaciones químicas, como se ilustra en el Esquema 3 que sigue a continuación (en el que "a" representa  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ , DCM, 4 Å MS,  $-20^\circ\text{C}$ ; "b" representa  $\text{MeNH}_2 \cdot \text{EtOH}$ , temperatura ambiente; y "c" representa  $\text{PMe}_3$ , NaOH, THF, temperatura ambiente).

20

Esquema 3



25

La glicosilación estimulada por ácido de Lewis ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}/\text{DCM}$ ) proporcionó los compuestos pseudotrisacáridos protegidos, Compuestos 21-24, con rendimientos aislados de un 79-85 %, exclusivamente como beta-anómeros en el enlace glucosídico recién generado. Dos etapas de desprotección secuencial: tratamiento con metilamina para retirar toda la protección de éster, y la reacción de Staudinger ( $\text{Me}_3\text{P}$ , THF/NaOH) para convertir azidas en las correspondientes aminas, proporcionaron a continuación los compuestos diana, NB118, NB119, NB122 y NB123, con rendimientos aislados de un 79-82 % para dos etapas.

30

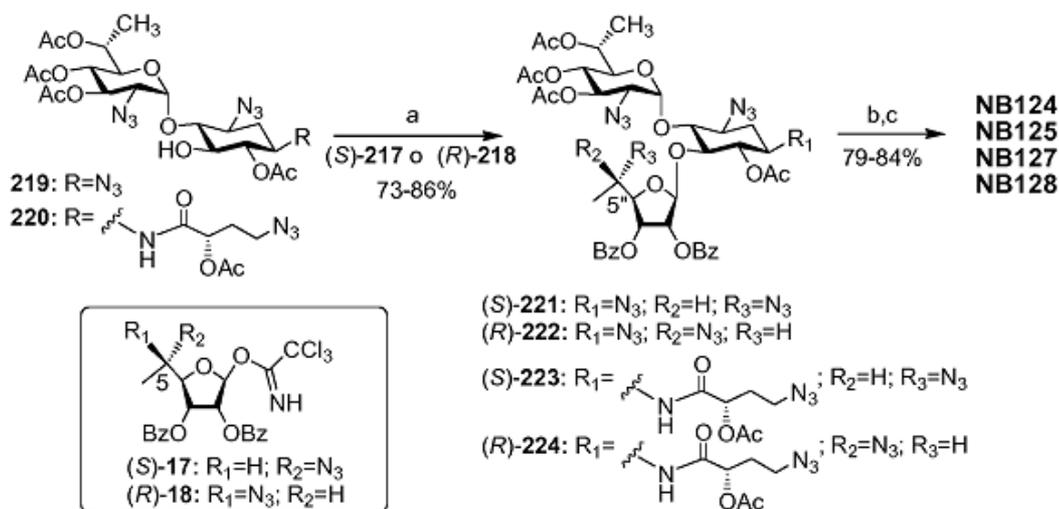
Las estructuras de todos los compuestos a modo de ejemplo, NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128, se confirmaron mediante una combinación de diversas técnicas de RMN 1D y 2D, incluyendo experimentos de HMQC y HMBC  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  2D, COSY 2D, y TOCSY selectivos de 1D, junto con análisis de espectros de masas (véase ESM).

La Figura 1A-C presenta el plan de síntesis de ésteres C5-diastereoméricos (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28, reactivos y condiciones, en los que "a" representa DCC, 4-DMAP, CSA, DCM, a temperatura ambiente (Figura 1A); espectros de RMN <sup>1</sup>H de (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28, en los que se resaltan las diferencias de desplazamiento químico ( $\delta$ ) entre protones en particular de (*R,X*)-27 y (*S,X*)-28 (Figura 1B); y asignación de la configuración absoluta en el carbono 5 (Indicado por X) del alcohol principal, Compuesto 9, con la regla de Sector (Figura 1C).

Para la asignación de la estereoquímica en los alcoholes en C5 de cadena lateral en los Compuestos 9 y 10 (véase, Esquema 2), el Compuesto del producto mayoritario 9 se acopló por separado (usando DCC, 4-DMAP, CSA) con ácido (*R*)-2-metoxi-2(1-naftil)propanoico (*R*)-MaNP y (*S*)-MaNP de estereoquímica absoluta conocida, para proporcionar los ésteres correspondientes, (*R,X*)-MaNP-27 y (*S,X*)-MaNP-28 (véase, Figura 1A), de acuerdo con el procedimiento informado anteriormente. La configuración absoluta en la posición C5 (indicado por X) a continuación se determinó usando el método de anisotropía de RMN <sup>1</sup>H (Figura 1B-C): la diferencia de desplazamiento químico [ $\Delta\delta = \delta(R, X) - \delta(S, X)$ ] para H-3 (-0,15) y H-4 (-0,30) era negativa, mientras que la de H-6 (+0,28) era positiva. Una disposición de las estructuras (*R,X*)-MaNP-27 y (*S,X*)-MaNP-28 de acuerdo con la regla de Sector (véase, Figura 1 C: OMaNP y H-5 se colocan en la parte anterior y posterior, respectivamente, mientras que la parte positiva de  $\Delta\delta$  está en el lado derecho del plano de MaNP y la parte negativa de  $\Delta\delta$  está en el lado izquierdo) confirmaba a continuación de la configuración R ( $X=R$ ) del C5 en el Compuesto 9.

Siguiendo procedimientos de síntesis y razonamientos de síntesis, se consiguió la síntesis de los pseudotrisacáridos NB124, NB125, NB127 y NB128 (Véase, Esquema 4 que sigue a continuación) a partir de los compuestos aceptores pseudodisacáridos correspondientes, Compuestos 219 y 220, protegidos de forma selectiva tal como se ha informado anteriormente (documento WO 2007/113841), y los Compuestos dadores (*S*)-17 y (*R*)-18, usando esencialmente las mismas transformaciones químicas como se ilustra en el Esquema 3 (en el que "a" representa BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, DCM, 4 Å MS, -20 °C; "b" representa MeNH<sub>2</sub>-EtOH, temperatura ambiente; y "c" representa PMe<sub>3</sub>, NaOH, THF, temperatura ambiente).

Esquema 4



#### Materiales y métodos

Todas las reacciones se realizaron en una atmósfera de argón con disolventes anhidros, a menos que se indique de otro modo.

Todos los agentes químicos, a menos que se indique de otro modo, se obtuvieron a partir de fuentes comerciales tales como Sigma-Aldrich, Fluka y similares.

Las reacciones se controlaron por TLC sobre Gel de Sílice 60 F<sub>254</sub> (0,25 mm, Merck), y las aplicaciones puntuales se visualizaron quemando con una solución de color amarillo que contenía (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·δH<sub>2</sub>O (120 gramos) y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Ce(NO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> (5 gramos) en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 % (800 ml).

La cromatografía en columna se realizó sobre un Gel de Sílice 60 (70-230 de malla).

Los espectros de RMN 1D y 2D se registraron de forma rutinaria en un espectrómetro de Bruker Avance™ 500 de Bruker.

Los análisis de los espectros de masas se obtuvieron con cualquiera de un espectrómetro de masas Daltonix Apex 3 de Bruker mediante ionización por electronebulización (ESI), o con un espectrómetro de masas TSQ-70B (Finnigan Mat).

En todos los ensayos biológicos, todos los aminoglucósidos sometidos a ensayo estaban en sus formas de sal de sulfato. Las concentraciones informadas se refieren a las de la forma de amina libre de cada aminoglucósido.

*Preparación de 4-Metilfenil 2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-β-D-ribofuranósido (Compuesto 8)*

Una mezcla de 4-metilfenil 1-tio-β-D-ribofuranósido (Compuesto 7, 25 gramos, 0,097 mol) y 1,1-dimetoxipropano (22,3 ml, 0,39 mol) en acetona (500 ml) se agitó a temperatura ambiente durante aproximadamente cinco minutos y a continuación se añadió una cantidad catalítica de CSA (1,0 gramos) y MgSO<sub>4</sub> (5,0 gramos). La evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para proporcionar el derivado de 2,3-isopropilideno deseado con un rendimiento de un 82 % (23,5 gramos).

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 3,73-3,85 (m, 2H, H-5), 4,37 (m, 1H, H-4), 4,74 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,5, J<sub>2</sub> = 6,0 Hz, H-2), 4,80 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 1,7, J<sub>2</sub> = 6,0 Hz, H-3), 5,52 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,37 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,35 (s, 3H, arilo-CH<sub>3</sub>), 7,16 (d, 2H, J = 8,0 Hz), 7,42 (d, 2H, J = 8,0 Hz).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 21,0 (CH<sub>3</sub>), 25,2 (CH<sub>3</sub>), 26,8 (CH<sub>3</sub>), 63,2 (C-5), 81,8 (C-3), 85,7 (C-2), 87,7 (C-4), 93,0 (C-1), 113,3 (C cuaternario), 129,2 (Ar), 129,9 (Ar), 132,3 (Ar), 138,0 (Ar).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>SNa ([M+Na]<sup>+</sup>) m/e 319,1; m/e medido 319,09.

El producto de la etapa mencionada anteriormente (22 gramos, 0,074 mol) se agitó en diclorometano (500 ml) a temperatura ambiente al que se añadió peryodinato de Dess-Martin (DMP, 34,6 gramos, 0,082 mol) y MgSO<sub>4</sub> (5,0 gramos). La evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se diluyó con éter y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 8 (18,0 gramos, rendimiento de un 85 %).

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 4,49 (s, 1H, H-4), 4,69 (d, 1H, J = 6,5 Hz, H-2), 5,21 (d, 1H, J = 6,0 Hz, H-3), 5,86 (s, 1H, H-1), 9,80 (s, 1H, H-5, CHO). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,37 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,52 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,36 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,19 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,41 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 21,0 (CH<sub>3</sub>), 25,1 (CH<sub>3</sub>), 26,2 (CH<sub>3</sub>), 87,1 (C-3), 84,5 (C-2), 89,9 (C-4), 92,6 (C-1), 113,3 (C cuaternario), 128,9 (Ar), 130,0 (Ar), 131,0 (Ar), 137,8 (Ar), 200,3 (CHO).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>S ([M+H]<sup>+</sup>) m/e 295,1; m/e medido 295,1.

*Preparación de 4-Metilfenil 6-desoxi-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-β-D-alofuranósido (Compuesto (R)-9) y 4-metilfenil 6-desoxi-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-α-L-talofuranósido (Compuesto (S)-10)*

El Compuesto aldehídico 8 (17 gramos, 0,057 mol) se agitó en THF (200 ml) a -30 °C durante 30 minutos a que se añadió la solución de MeMgBr (1,4 M en THF/Tolueno, 235 ml, 0,171 mol) gota a gota con jeringa. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a la misma temperatura y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización, la mezcla de reacción se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl saturado y se extrajo con acetato de etilo. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporó. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para proporcionar una proporción de 4:1 de dos diastereómeros en C5 con un rendimiento de un 88 %: el Compuesto del producto mayoritario (5R)-9 (13 gramos, R<sub>f</sub> = 0,38 en EtOAc/Hexano a 1:4) y el Compuesto del producto secundario (5S)-10 (3 gramos, R<sub>f</sub> = 0,48 en EtOAc/Hexano a 1:4). La configuración absoluta en la posición C5 se determinó usando un método de anisotropía de RMN <sup>1</sup>H como se describe a continuación.

Datos para el Compuesto (5R)-9:

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -191,4 (c = 1,02, CHCl<sub>3</sub>). RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,25 (d, 3H, J = 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,06 (m, 2H, H-4 y H-5), 4,68 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,8, J<sub>2</sub> = 6,3 Hz, H-2), 4,87 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H-3), 5,46 (d, 1H, J = 2,8 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,37 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,34 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,15 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,42 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 18,5 (C-6), 21,0 (CH<sub>3</sub>), 25,2 (CH<sub>3</sub>), 26,9 (CH<sub>3</sub>), 67,3 (C-5), 80,2 (C-3), 85,4 (C-2), 91,4 (C-4), 92,5 (C-1), 113,4 (C cuaternario), 129,2 (Ar), 129,8 (Ar), 132,3 (Ar), 137,9 (Ar).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>SNa ([M+Na]<sup>+</sup>) m/e 333,1; m/e medido 333,1.

## ES 2 655 916 T3

Datos para el Compuesto (5S)-10:

5  $[\alpha]_D^{20} = -199,7$  ( $c = 1,04$ ,  $\text{CHCl}_3$ ). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,27 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,90 (m, 1H, H-5), 4,08 (dd, 1H,  $J_1 = 1,3$ ,  $J_2 = 5,6$  Hz, H-4), 4,71 (dd, 1H,  $J_1 = 1,3$ ,  $J_2 = 6,0$  Hz, H-3), 4,76 (dd, 1H,  $J_1 = 2,1$ ,  $J_2 = 6,0$  Hz, H-2), 5,57 (d, 1H,  $J = 2,0$  Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  1,36 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 1,54 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 2,35 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 7,17 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,43 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar).  
10 RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  19,2 (C-6), 21,0 ( $\text{CH}_3$ ), 25,2 ( $\text{CH}_3$ ), 26,8 ( $\text{CH}_3$ ), 67,9 (C-5), 82,4 (C-3), 85,7 (C-2), 91,6 (C-4), 93,0 (C-1), 113,3 (C cuaternario), 129,4 (Ar), 129,9 (Ar), 131,9 (Ar), 137,9 (Ar).

MALDI TOFMS calculado para  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{SNa}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )  $m/e$  333,1;  $m/e$  medido 333,1.

15 *Preparación de ésteres del Compuesto (R,X)-27 y del Compuesto (S,X)-28 para la asignación de la configuración absoluta en C5*

Una mezcla de ácido (R)-2-metoxi-2(1-naftil)propanoico [(R)-MaNP] o (S)-MaNP (0,07 gramos, 0,0003 mol), 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,05 gramos, 0,0004 mol), ácido 10-canforsulfónico (CSA, 0,025 gramos), y 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 0,240 gramos, 0,0016 mol) se agitó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 ml) a 0 °C. El alcohol mayoritario 9 a partir de lo mencionado anteriormente (0,1 gramos, 0,0003 mol), se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml), se añadió lentamente a la mezcla agitada mencionada anteriormente, y la reacción se dejó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una solución de HCl al 1 %,  $\text{NaHCO}_3$  saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporó y se sometió a una cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para producir los ésteres deseados del Compuesto (R,X)-27 (0,135 gramos, 80 %) o del Compuesto (S,X)-28 (0,138 gramos, 80 %).  
20  
25

Datos para el Compuesto (R,X)-27:

30 RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{H}}$  1,23 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,54 (d, 1H,  $J = 6,1$  Hz, H-3), 3,72 (d, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-4), 4,18 (dd, 1H,  $J_1 = 2,3$ ,  $J_2 = 6,1$  Hz, H-2), 5,08 (m, 1H, H-5), 5,32 (d, 1H,  $J = 2,4$  Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  1,00 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 1,32 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 2,04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,32 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 3,14 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,11 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,28-7,31 (m, 2H, Ar), 7,48-7,56 (m, 3H, Ar), 7,65 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,85 (dd, 2H,  $J_1 = 4,7$ ,  $J_2 = 8,0$  Hz, Ar), 8,47 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar).  
35 RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  17,1 (C-6), 21,0 ( $\text{CH}_3$ ), 21,5 ( $\text{CH}_3$ ), 24,8 ( $\text{CH}_3$ ), 26,6 ( $\text{CH}_3$ ), 50,9 ( $\text{OCH}_3$ ), 70,5 (C-5), 81,2 (C-3), 81,3 (C cuaternario), 84,8 (C-2), 88,0 (C-4), 92,5 (C-1), 112,9 (C cuaternario), 124,7 (Ar), 125,0 (Ar), 125,7 (Ar), 125,8 (Ar), 126,6 (Ar), 128,8 (Ar), 129,5 (Ar), 129,7 (Ar), 130,3 (Ar), 131,2 (Ar), 131,3 (Ar), 134,0 (Ar), 134,6 (Ar), 137,2 (Ar), 173,1 (C=O).

40 MALDI TOFMS calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{SNa}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )  $m/e$  545,2;  $m/e$  medido 545,2.

Datos para el Compuesto (S,X)-28:

45 RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  0,95 (d, 3H,  $J = 6,3$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,84 (dd, 1H,  $J_1 = 1,5$ ,  $J_2 = 6,2$  Hz, H-3), 3,87 (dd, 1H,  $J_1 = 1,5$  y  $J_2 = 6,2$  Hz, H-4), 4,08 (dd, 1H,  $J_1 = 3,4$ ,  $J_2 = 6,1$  Hz, H-2), 5,06 (m, 1H, H-5), 5,27 (d, 1H,  $J = 3,4$  Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  1,14 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 1,41 (s, 3H, isopropilideno- $\text{CH}_3$ ), 2,09 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,33 (s, 3H, Ar- $\text{CH}_3$ ), 3,14 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7,12 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,35 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,49-7,67 (m, 3H, Ar), 7,69 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,88 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 8,41 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, Ar).  
50 RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  16,0 (C-6), 21,0 ( $\text{CH}_3$ ), 21,5 ( $\text{CH}_3$ ), 24,9 ( $\text{CH}_3$ ), 26,8 ( $\text{CH}_3$ ), 50,8 ( $\text{OCH}_3$ ), 71,4 (C-5), 81,0 (C-3), 81,5 (C cuaternario), 84,7 (C-2), 87,5 (C-4), 92,6 (C-1), 113,3 (C cuaternario), 124,7 (Ar), 125,2 (Ar), (Ar), 126,0 (Ar), 126,4 (Ar), 128,6 (Ar), 129,4 (Ar), 129,7 (Ar), 130,3 (Ar), 131,3 (Ar), 131,5 (Ar), 133,8 (Ar), 134,8 (Ar), 137,4 (Ar), 173,4 (C=O).

55 MALDI TOFMS calculado para  $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{O}_6\text{SNa}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )  $m/e$  545,2;  $m/e$  medido 545,2.

*Preparación de 4-Metilfenil 6-desoxi-5-O-tosil-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio- $\beta$ -D-alofuranósido (Compuesto (R)-11)*

60 A una solución agitada del Compuesto (R)-9 (13 gramos, 0,041 mol) en piridina (200 ml) a 0 °C, se añadieron cloruro de tosilo (15,6 gramos, 0,082 mol) y 4-DMAP (1 gramo). La temperatura de la reacción se elevó a temperatura ambiente y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (36 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con una solución acuosa de HCl al 1 %,  $\text{NaHCO}_3$  saturado, y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-11 (16,0 gramos) con un rendimiento de un 82 %.  
65

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,28 (d, 3H, J = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,99 (d, 1H, J = 8,6 Hz, H-4), 4,60 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,0, J<sub>2</sub> = 6,2 Hz, H-2), 4,67 (d, 1H, J = 6,2 Hz, H-3), 4,92 (m, 1H, H-5), 5,48 (d, 1H, J = 1,8 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,30 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,48 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,34 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2,45 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>) 7,13 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,30-7,38 (m, δ<sub>H</sub>, Ar), 7,87 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 18,0 (C-6), 21,0 (CH<sub>3</sub>), 21,6 (CH<sub>3</sub>), 25,0 (CH<sub>3</sub>), 26,6 (CH<sub>3</sub>), 77,1 (C-5), 81,2 (C-3), 85,0 (C-2), 87,9 (C-4), 92,3 (C-1), 113,6 (C cuaternario), 127,9 (Ar), 129,8 (2C, Ar), 129,9 (Ar), 131,0 (Ar), 133,8 (Ar), 137,4 (Ar), 144,8 (Ar).

10 MALDI TOFMS calculado para C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e 465,1; m/e medido 465,1.

*Preparación de 4-Metilfenil 6-desoxi-5-O-tosil-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-α-L-alofuranósido (Compuesto (S)-12)*

15 A una solución agitada del Compuesto (S)-10 (10 gramos, 0,032 mol) en piridina (200 ml) a 0 °C, se añadieron cloruro de tosilo (15,6 gramos, 0,082 mol) y 4-DMAP (1 gramo). La temperatura de la reacción se elevó a temperatura ambiente y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (36 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con una solución acuosa de HCl al 1 %, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-12 (14,0 gramos) con un rendimiento de un 88 %.

25 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,37 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 4,09 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,8, J<sub>2</sub> = 4,3 Hz, H-4), 4,48 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,8, J<sub>2</sub> = 6,2 Hz, H-3), 4,55 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,0, J<sub>2</sub> = 6,2 Hz, H-2), 4,82 (m, 1H, H-5), 5,25 (d, 1H, J = 4,0 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,30 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,35 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 2,43 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>) 7,12 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,32 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,38 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,87 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 17,0 (C-6), 21,0 (Ar-CH<sub>3</sub>), 21,6 (Ar-CH<sub>3</sub>), 25,3 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 27,2 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 78,3 (C-5), 81,2 (C-3), 84,6 (C-2), 86,7 (C-4), 92,2 (C-1), 114,1 (C cuaternario), 127,7 (Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 129,8 (Ar), 132,3 (Ar), 134,1 (Ar), 137,6 (Ar), 144,7 (Ar).

30 MALDI TOFMS calculado para C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) m/e: 487,1; m/e medido: 487,1

*Preparación de 4-Metilfenil 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-α-L-talofuranósido (Compuesto (S)-13)*

35 A una solución agitada del Compuesto (R)-11 (15 gramos, 0,032 mol) en DMF (250 ml) se añadieron NaN<sub>3</sub> (10 gramos, 0,15 mol) y HMPA (15 ml) a temperatura ambiente. La temperatura de la reacción se elevó a 70 °C y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (10 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con una solución acuosa de HCl al 1 %, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-13 (6 gramos) con un rendimiento de un 55 %.

45 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,35 (d, 3H, J = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,73 (m, 1H, H-5), 3,99 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,0, J<sub>2</sub> = 6,7 Hz, H-4), 4,56 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,0, J<sub>2</sub> = 6,5 Hz, H-3), 4,70 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,0, J<sub>2</sub> = 6,2 Hz, H-2), 5,39 (d, 1H, J = 3,2 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,36 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,36 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,15 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,46 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 15,5 (C-6), 21,1 (Ar-CH<sub>3</sub>), 25,4 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 27,1 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 58,2 (C-5), 81,9 (C-3), 85,1 (C-2), 88,9 (C-4), 91,9 (C-1), 114,2 (C cuaternario), 129,5 (Ar), 129,7 (Ar), 132,4 (Ar), 138,8 (Ar).

50 MALDI TOFMS calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>) m/e: 334,1; m/e medido: 334,1.

*Preparación de 4-Metilfenil 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-1-metiletiliden-1-tio-β-D-alofuranósido (Compuesto (R)-14)*

55 A una solución agitada del Compuesto (S)-12 (13 gramos, 0,028 mol) en DMF (250 ml) se añadieron NaN<sub>3</sub> (10 gramos, 0,15 mol) y HMPA (13 ml) a temperatura ambiente. La temperatura de la reacción se elevó a 70 °C y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (10 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó secuencialmente con una solución acuosa de HCl al 1 %, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-14 (9 gramos) con un rendimiento de un 97 %.

65 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,32 (d, 3H, J = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,81 (m, 1H, H-5), 3,89 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,1, J<sub>2</sub> = 8,3 Hz, H-4), 4,72 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,5, J<sub>2</sub> = 6,3 Hz, H-2), 4,77 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,1, J<sub>2</sub> = 6,3 Hz, H-3), 5,49 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,37 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 1,53 (s, 3H, isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 2,35 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,15 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,74 (d, 2H, J = 8,0 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 16,2 (C-6), 21,0 (Ar-CH<sub>3</sub>), 25,2 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 26,1 (isopropilideno-CH<sub>3</sub>), 58,1 (C-5), 81,9 (C-3), 85,1 (C-2), 89,1 (C-4), 92,2 (C-1), 113,8 (C cuaternario), 129,7 (Ar), 129,8 (Ar), 131,6 (Ar), 137,6 (Ar). MALDI TOFMS calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>) *m/e*: 334,1; *m/e* medido: 334,1.

5 *Preparación de 4-Metilfenil 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-1-tio-α-L-talofuranósido (Compuesto (S)-15)*

El Compuesto (S)-13 (6 gramos, 0,018 mol) se agitó en una mezcla de ácido acético-agua (100 ml, 8:2) a 70 °C durante una noche. La evolución de la reacción se controló por TLC, después de la finalización, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el producto desprotegido de isopropilideno deseado (5 gramos) con un rendimiento de un 96 %.

15 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,36 (d, 3H, *J* = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,61 (m, 1H, H-5), 3,82 (t, 1H, *J* = 4,8 Hz, H-4), 4,13 (m, 2H, H-3 y H-2), 5,18 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,35 (s, 3H, ArCH<sub>3</sub>), 7,15 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,45 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar).  
RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 15,2 (C-6), 21,0 (Ar-CH<sub>3</sub>), 58,2 (C-5), 72,0 (C-3), 74,9 (C-2), 86,5 (C-4), 90,5 (C-1), 128,8 (Ar), 129,7 (Ar), 133,0 (Ar), 138,1 (Ar).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>) *m/e*: 294,1; *m/e* medido: 294,08.

20 El producto de la etapa mencionada anteriormente se agitó en piridina (200 ml) a 0 °C al que se añadió BzCl (7,14 gramos, 0,051) y 4-DMAP (1 gramo) lentamente. La temperatura de la reacción se elevó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La evolución de la reacción se controló por TLC, después de la finalización, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución de HCl al 1 %, NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-15 (8,0 gramos) con un rendimiento de un 94 %.

30 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,38 (d, 3H, *J* = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,81 (m, 1H, H-5), 4,22 (m, 1H, H-4), 5,55 (m, 1H, H-1), 5,56-5,58 (m, 2H, H-2 y H-3). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,37 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,21 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,34-7,42 (m, δ<sub>H</sub>, Ar), 7,53-7,59 (m, δ<sub>H</sub>, Ar), 7,90 (dd, 2H, *J*<sub>1</sub> = 1,2, *J*<sub>2</sub> = 8,0 Hz, Ar), 7,99 (dd, 2H, *J*<sub>1</sub> = 1,2, *J*<sub>2</sub> = 8,0 Hz, Ar).  
RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 15,2 (C-6), 21,1 (Ar-CH<sub>3</sub>), 57,9 (C-5), 72,6 (C-3), 74,4 (C-2), 85,1 (C-4), 88,4 (C-1), 127,8 (Ar), 128,3 (2C, Ar), 128,9 (Ar), 129,0 (Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 129,8 (Ar), 133,4 (2C, Ar), 133,9 (Ar), 138,6 (Ar), 164,9 (C=O), 165,2 (C=O).

35 MALDI TOFMS calculado para C<sub>27</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>SNa ([M+Na]<sup>+</sup>) *m/e*: 526,2; *m/e* medido: 526,1.

*Preparación de 4-Metilfenil 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-1-tio-β-D-alofuranósido (Compuesto (R)-16)*

40 El Compuesto (R)-14 (8 gramos, 0,023 mol) se agitó en una mezcla de ácido acético-agua (100 ml, 8:2) a 70 °C durante una noche. La evolución de la reacción se controló por TLC, después de la finalización, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el producto desprotegido de isopropilideno deseado (6,5 gramos) con un rendimiento de un 92 %.

45 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,36 (d, 3H, *J* = 6,2 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,65 (m, 1H, H-5), 3,78 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 2,5, *J*<sub>2</sub> = 7,5 Hz, H-4), 4,09 (t, 1H, *J* = 5,0 Hz, H-2), 4,15 (t, 1H, *J* = 4,5 Hz, H-3), 5,18 (d, 1H, *J* = 5,0 Hz, H-1). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,36 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,15 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,44 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar).  
50 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 16,0 (C-6), 21,0 (Ar-CH<sub>3</sub>), 59,0 (C-5), 71,9 (C-3), 74,9 (C-2), 86,4 (C-4), 90,3 (C-1), 128,9 (Ar), 129,7 (Ar), 132,8 (Ar), 138,1 (Ar).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S ([M-H]<sup>-</sup>) *m/e*: 294,1; *m/e* medido: 294,08.

55 El producto de la etapa mencionada anteriormente se agitó en piridina (200 ml) a 0 °C al que se añadió BzCl (7,14 gramos, 0,051) y 4-DMAP (1 gramo) lentamente. La temperatura de la reacción se elevó a temperatura ambiente y se agitó durante una noche. La evolución de la reacción se controló por TLC, después de la finalización, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con una solución de HCl al 1 %, NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-16 (9,5 gramos) con un rendimiento de un 93 %.

65 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>H</sub> 1,42 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,74 (m, 1H, H-5), 4,24 (t, 1H, *J* = 4,7 Hz, H-4), 5,53 (d, 1H, *J* = 5,6 Hz, H-1), 5,50 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-2), 5,65 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-3). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,38 (s, 3H, Ar-CH<sub>3</sub>), 7,20 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,38 (t, δ<sub>H</sub>, *J* = 7,6 Hz, Ar), 7,51 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,55 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, Ar), 7,93-7,96 (m, δ<sub>H</sub>, Ar).

RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  15,5 (C-6), 21,1 (Ar- $\text{CH}_3$ ), 58,5 (C-5), 71,8 (C-3), 74,2 (C-2), 84,9 (C-4), 88,2 (C-1), 127,8 (Ar), 128,3 (2C, Ar), 128,9 (2C, Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 129,8 (Ar), 133,3 (2C, Ar), 133,8 (Ar), 138,6 (Ar), 164,9 (C=O), 165,0 (C=O).

5 MALDI TOFMS calculado para  $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{Sn}$  ( $[\text{M}+\text{Na}]^+$ )  $m/e$ : 526,2;  $m/e$  medido: 526,2.

*Preparación de L-Talofuranosa, 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-dibenzoato 1-(2,2,2-tricloroetanimidato) (Compuesto (S)-17)*

10 El Compuesto (S)-15 (8 gramos, 0,016 mol) se agitó en una mezcla de acetona-agua (100 ml, 9:1) a  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos al que se añadió N-bromosuccinimida (9,16 gramos, 0,051 mol) lentamente. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (3 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporó para obtener 6,3 gramos del hemiacetal correspondiente. El hemiacetal se agitó en una mezcla de diclorometano (40 ml) y tricloroacetoneitrilo (5 ml) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos al que se añadió una cantidad catalítica de DBU (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (3 horas), la mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró para obtener el Compuesto (S)-17 (9 gramos). El producto en bruto se usó directamente para la reacción de glicosilación sin purificación.

20 *Preparación de D-Alofuranosa, 5-azido-5,6-didesoxi-2,3-dibenzoato 1-(2,2,2-tricloroetanimidato) (Compuesto (R)-18)*

25 El Compuesto (R)-16 (9 gramos, 0,018 mol) se agitó en una mezcla de acetona-agua (100 ml, 9:1) a  $-30\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos al que se añadió N-bromosuccinimida (9,0 gramos, 0,050 mol) lentamente. La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (3 horas), la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporó para obtener 6,5 gramos del hemiacetal correspondiente. El hemiacetal se agitó en una mezcla de diclorometano (50 ml) y tricloroacetoneitrilo (6 ml) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos a que se añadió una cantidad catalítica de DBU (0,3 ml). La mezcla de reacción se agitó a la misma temperatura y la evolución se controló por TLC. Después de la finalización (3 horas), la mezcla de reacción se diluyó con DCM y se lavó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturado. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$  y se concentró para obtener el Compuesto (R)-18 (9 gramos). El producto en bruto se usó directamente para la reacción de glicosilación sin purificación.

35 *Preparación de 5-O-(5-Azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil- $\alpha$ -L-talofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',1,3-triazido paromamina (Compuesto (S)-21)*

40 Se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (15 ml) a tamices moleculares de  $4\text{ \AA}$  secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 19 (0,75 gramos, 0,0013 mol) y el Compuesto dador (S)-17 (2,1 gramos, 0,0039 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 min a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Se añadió una cantidad catalítica de  $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$  (0,1 ml) y la mezcla se agitó a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 60 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se evaporó y se sometió a cromatografía en columna ( $\text{EtOAc/Hexano}$ ) para obtener el Compuesto (S)-21 (1,0 gramos) con un rendimiento de un 80 %.

45 RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): "Anillo I"  $\delta_{\text{H}}$  3,65 (dd, 1H,  $J_1 = 4,2$ ,  $J_2 = 9,7$  Hz, H-2'), 4,20 (d, 1H,  $J = 11,1$  Hz, H-6'), 4,26 (dd, 1H,  $J_1 = 3,1$ ,  $J_2 = 12,6$  Hz, H-6'), 4,54 (m, 1H, H-5'), 5,08 (dd, 1H,  $J_1 = 9,3$ ,  $J_2 = 10,7$  Hz, H-4'), 5,41 (t, 1H,  $J = 9,9$  Hz, H-3'), 5,85 (d, 1H,  $J = 3,7$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_{\text{H}}$  1,64 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,42 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,49-3,56 (m, 2H, H-1 y H-3), 3,74 (t, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-4), 3,87 (t, 1H,  $J = 8,7$  Hz, H-5), 5,02 (d, 1H,  $J = 10,1$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_{\text{H}}$  1,27 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz,  $\text{CH}_3$ ), 3,72 (m, 1H, H-5"), 4,35 (t, 1H,  $J = 6,6$  Hz, H-4"), 5,43 (dd, 1H,  $J_1 = 5,1$ ,  $J_2 = 7,4$  Hz, H-3"), 5,62 (d, 1H,  $J = 3,8$  Hz, H-2"), 5,66 (s, 1H, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  2,04 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,23 (s, 3H, OAc), 7,35-7,43 (m,  $\delta_{\text{H}}$ , Ar), 7,53-7,60 (m, 2H, Ar), 7,89-7,95 (m,  $\delta_{\text{H}}$ , Ar).

55 RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta_{\text{C}}$  15,3 (C-6"), 20,5 (OAc), 20,6 (2C, OAc), 20,9 (OAc), 31,6 (C-1), 58,3, 58,5, 59,3, 61,7, 61,8, 68,0, 68,2, 70,9, 71,8, 73,6, 74,6, 78,1, 79,5, 84,4, 96,6 (C-1'), 107,6 (C-1"), 128,4 (Ar), 128,5 (2C, Ar), 128,7 (Ar), 129,6 (2C, Ar), 133,5 (Ar), 133,6 (Ar), 164,8 (C=O), 165,3 (C=O), 169,7 (C=O), 169,9 (C=O), 170,1 (C=O), 170,6 (C=O).

60 MALDI TOFMS calculado para  $\text{C}_{40}\text{H}_{43}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$  ( $[\text{M-H}]^-$ )  $m/e$ : 947,3;  $m/e$  medido: 947,28.

*Preparación de 5-O-(5-Azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil- $\beta$ -D-alofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',1,3-triazido paromamina (Compuesto (R)-22)*

65 Se añadió  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (15 ml) a tamices moleculares de  $4\text{ \AA}$  secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 19 (0,75 gramos, 0,0013 mol) y el Compuesto dador (R)-18 (2,1 gramos,

0,0039 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 60 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-22 (1,02 gramos) con un rendimiento de un 82 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 3,55 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,5 y J<sub>2</sub> = 10,7 Hz, H-2'), 4,17 (d, 1H, J = 13,1 Hz, H-6'), 4,30 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,2 y J<sub>2</sub> = 12,4 Hz, H-6'), 4,56 (m, 1H, H-5'), 5,08 (t, 1H, J = 9,7 Hz, H-4'), 5,43 (t, 1H, J = 9,9 Hz, H-3'), 5,83 (d, 1H, J = 3,9 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,64 (ddd, 1H, J<sub>1</sub>=J<sub>2</sub>=J<sub>3</sub>=125 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,42 (td, 1H, J<sub>1</sub>=4,5 y J<sub>2</sub>= 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,49-3,56 (m, 2H, H-1 y H-3), 3,74 (t, 1H, J = 10,0 Hz, H-4), 3,92 (t, 1H, J = 9,1 Hz, H-5), 5,03 (d, 1H, J = 9,9 Hz, H-6); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,41 (d, 3H, J = 6,9 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,76 (m, 1H, H-5"), 4,39 (t, 1H, J = 4,9 Hz, H-4"), 5,50 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 5,1 y J<sub>2</sub> = 7,0 Hz, H-3"), 5,60 (d, 1H, J = 4,9 Hz, H-2"), 5,68 (s, 1H, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,06 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,34 (s, 3H, OAc), 7,37-7,41 (m, δ<sub>H</sub>, Ar), 7,57 (m, 2H, Ar), 7,92 (d, δ<sub>H</sub>, J = 8,0 Hz Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 15,1 (C-6"), 20,5 (OAc), 20,6 (OAc), 20,7 (OAc), 20,8 (OAc), 31,7 (C-1), 58,2 (2C), 58,6, 61,7 (2C), 68,0, 68,1, 70,7, 71,4, 73,7, 74,6, 77,8, 79,2, 83,9, 96,6 (C-1'), 107,1 (C-1"), 128,4 (2C, Ar), 128,7 (Ar), 128,8 (Ar), 129,6 (2C, Ar), 133,4 (Ar), 133,5 (Ar), 164,9 (C=O), 165,4 (C=O), 169,7 (2C, C=O), 169,9 (C=O), 170,6 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>40</sub>H<sub>44</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) m/e: 971,3; m/e medido: 971,4.

*Preparación de 5-O-(5-Azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-α-L-talofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',3-diazido-1-N-[(S)-4-azido-2-O-acetil-butanoil]paromamina (Compuesto (S)-23)*

Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 20 (1,0 gramos, 0,0014 mol) y el Compuesto dador (S)-17 (2,2 gramos, 0,0042 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 60 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-23 (1,19 gramos) con un rendimiento de un 79 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 3,63 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,2, J<sub>2</sub> = 10,4 Hz, H-2'), 4,18 (d, 1H, J = 10,8 Hz, H-6'), 4,29 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,9, J<sub>2</sub> = 12,4 Hz, H-6'), 4,54 (m, 1H, H-5'), 5,09 (t, 1H, J = 10,2 Hz, H-4'), 5,42 (t, 1H, J = 10,2 Hz, H-3'), 5,84 (d, 1H, J = 3,9 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,50 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = J<sub>3</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,53 (td, 1H, J<sub>1</sub> = 4,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,60 (m, 1H, H-3), 3,74 (t, 1H, J = 9,5 Hz, H-4), 3,96 (t, 1H, J = 10,0 Hz, H-5), 4,06 (m, 1H, H-1), 4,93 (d, 1H, J = 9,9 Hz, H-6); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,33 (d, 3H, J = 6,9 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,70 (m, 1H, H-5"), 4,33 (t, 1H, J = 6,0 Hz, H-4"), 5,55 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,9, J<sub>2</sub> = 7,7 Hz, H-3"), 5,57 (m, 2H, H-2" y H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 2,04-2,10 (m, 2H, H-8 y H-8), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 6H, OAc), 2,26 (s, 3H, OAc), 2,35 (s, 3H, OAc), 3,37 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 6,0, J<sub>2</sub> = 7,5 Hz, H-9 y H-9), 5,20 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 1,5, J<sub>2</sub> = 8,5 Hz, H-7), 6,69 (d, 1H, J = 7,5 Hz, NH), 7,35 (t, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,43 (t, 2H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,53 (t, 1H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,55 (t, 1H, J = 8,0 Hz, Ar), 7,87 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 1,1, J<sub>2</sub> = 8,2 Hz, Ar), 7,95 (dd, 2H, J<sub>1</sub> = 1,2, J<sub>2</sub> = 8,2 Hz, Ar).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>C</sub> 15,4 (C-6"), 20,6 (4C, OAc), 20,9 (OAc), 31,9 (C-1), 47,0, 48,5, 58,4, 58,7, 61,7, 61,8, 68,0, 68,2, 70,8, 70,9, 71,4, 73,1, 74,7, 78,3, 79,7, 83,7, 96,7 (C-1'), 107,5 (C-1"), 128,4 (Ar), 128,5 (2C, Ar), 128,7 (Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 133,5 (Ar), 133,6 (Ar), 165,0 (C=O), 165,2 (C=O), 168,8 (C=O), 169,7 (2C, C=O), 169,8 (C=O), 170,6 (C=O), 172,5 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>46</sub>H<sub>54</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e: 1092,3; m/e medido: 1092,3.

*Preparación de 5-O-(5-Azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-β-D-alofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',3-diazido-1-N-[(S)-4-azido-2-O-acetil-butanoil]paromamina (Compuesto (R)-24)*

Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 20 (1,0 gramos, 0,0014 mol) y el Compuesto dador (R)-18 (2,2 gramos, 0,0042 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 60 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-24 (1,27 gramos) con un rendimiento de un 89 %.

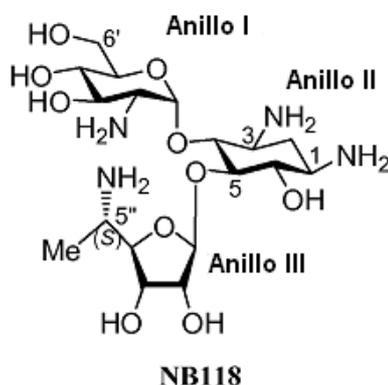
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 3,53 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,7, J<sub>2</sub> = 10,7 Hz, H-2'), 4,18 (d, 1H, J = 10,1 Hz, H-6'),

4,30 (dd, 1H,  $J_1 = 3,9$ ,  $J_2 = 12,3$  Hz, H-6'), 4,56 (m, 1H, H-5'), 5,09 (t, 1H,  $J = 10,2$  Hz, H-4'), 5,44 (t, 1H,  $J = 9,7$  Hz, H-3'), 5,84 (d, 1H,  $J = 3,9$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_H$  1,48 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,52 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,60 (m, 1H, H-3), 3,74 (t, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-4), 4,00-4,08 (m, 2H, H-5 y H-1), 4,93 (t, 1H,  $J = 9,9$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_H$  1,41 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,83 (m, 1H, H-5"), 4,37 (dd, 1H,  $J_1 = 4,1$ ,  $J_2 = 5,7$  Hz, H-4"), 5,60 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz, H-3"), 5,64 (d, 1H,  $J = 6,5$  Hz, H-2"), 5,70 (s, 1H, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_H$  2,04-2,10 (m, 2H, H-8 y H-8), 2,06 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,11 (s, 3H, OAc), 2,22 (s, 3H, OAc), 2,27 (s, 3H, OAc), 3,37 (dd, 2H,  $J_1 = 6,0$ ,  $J_2 = 7,5$  Hz, H-9 y H-9), 5,19 (dd, 1H,  $J_1 = 1,5$ ,  $J_2 = 8,5$  Hz, H-7), 6,69 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, NH), 7,35-7,43 (m,  $\delta_H$ , Ar), 7,53-7,59 (m, 2H, Ar), 7,87-7,92 (m,  $\delta_H$ , Ar).

10 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_C$  15,3 (C-6"), 20,5 (OAc), 20,5 (OAc), 20,6 (OAc), 20,7 (OAc), 20,8 (OAc), 30,4, 32,1, 47,0, 48,4, 58,2, 58,5, 61,6, 61,7, 68,0, 68,1, 70,7, 70,8, 70,9, 73,4, 74,7, 78,0, 79,5, 83,3, 96,8 (C-1'), 106,9 (C-1"), 128,4 (2C, Ar), 128,7 (2C, Ar), 129,5 (Ar), 129,6 (Ar), 133,5 (2C, Ar), 164,9 (C=O), 165,2 (C=O), 168,9 (C=O), 169,6 (C=O), 169,7 (C=O), 169,8 (C=O), 170,6 (C=O), 172,3 (C=O).

15 MALDI TOFMS calculado para C<sub>46</sub>H<sub>54</sub>N<sub>13</sub>O<sub>19</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) *m/e*: 1092,3; *m/e* medido: 1092,3.

Preparación de 5-O-(5-Amino-5,6-didesoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-paromamina (NB118)



20 El Compuesto (S)-21 producto de glicosilación (1,0 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB118.

35 El producto analíticamente puro se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB118 (0,405 gramos, con un rendimiento de un 82 %).

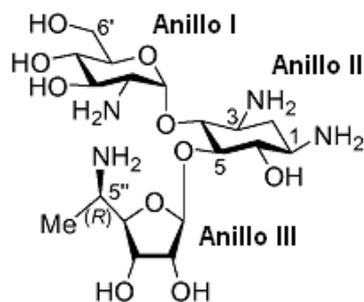
40 Para el almacenamiento y los ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.  $[\alpha]_D^{20} = +38,4$  (c = 0,2, MeOH).

45 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): "Anillo I"  $\delta_H$  2,64 (dd, 1H,  $J_1 = 3,7$ ,  $J_2 = 10,4$  Hz, H-2'), 3,27 (t, 1H,  $J = 9,7$  Hz, H-4') 3,52 (t, 1H,  $J = 10,8$  Hz, H-3'), 3,67 (dd, 1H,  $J_1 = 6,0$ ,  $J_2 = 11,8$  Hz, H-6'), 3,79 (m, 1H, H-5'), 3,87 (dd, 1H,  $J_1 = 2,0$ ,  $J_2 = 11,9$  Hz, H-6') 5,20 (d, 1H,  $J = 3,4$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_H$  1,20 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,97 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,64 (m, 1H, H-1), 2,78 (m, 1H, H-3), 3,21 (t, 1H,  $J = 9,3$  Hz, H-6), 3,38 (t, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-4), 3,50 (t, 1H,  $J = 9,2$ , H-5); "Anillo III"  $\delta_H$  1,18 (d, 3H,  $J = 6,2$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,96 (m, 1H, H-5"), 3,57 (t, 1H,  $J = 6,9$  Hz, H-4"), 4,02 (t, 1H,  $J = 5,5$  Hz, H-3"), 4,06 (dd, 1H,  $J_1 = 2,9$ ,  $J_2 = 5,4$  Hz, H-2"), 5,25 (d, 1H,  $J = 2,7$  Hz, H-1").

50 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): 8c 19,3 (C-6"), 37,5 (C-1), 50,6, 52,3, 52,6, 57,8, 62,7 (C-6'), 72,1, 72,2, 75,3, 75,4, 76,2, 78,6, 84,6, 87,4, 88,6, 102,0 (C-1'), 109,5 (C-1").

MALDI TOFMS calculado para  $C_{18}H_{37}N_4O_{10}$  ( $[M+H]^+$ )  $m/e$ : 469,2;  $m/e$  medido: 469,2.

Preparación de 5-O-(5-Amino-5,6-didesoxi- $\beta$ -D-alofuranosil)-paromamina (NB119)



NB119

5

El Compuesto (R)-22 producto de glicosilación (1,0 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se redisolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB119, también denominada NB119.

El producto analíticamente puro se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB119 (0,398 gramos, con un rendimiento de un 80 %).

Para el almacenamiento y los ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.  $[\alpha]_D^{20} = +37,0$  (c = 0,2, MeOH).

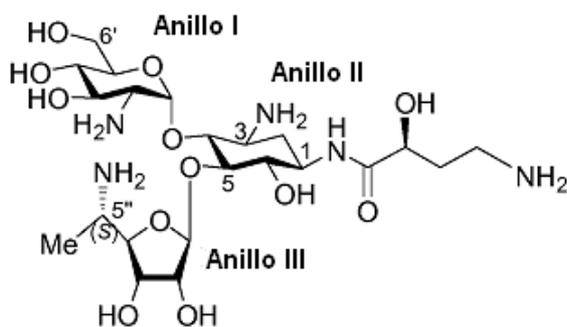
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): "Anillo I"  $\delta_H$  2,64 (dd, 1H,  $J_1 = 3,4$ ,  $J_2 = 10,2$  Hz, H-2'), 3,27 (t, 1H,  $J = 9,1$  Hz, H-4'), 3,52 (t, 1H,  $J = 8,9$  Hz, H-3'), 3,68 (t, 1H,  $J = 6,1$  Hz, H-6'), 3,79 (m, 1H, H-5'), 3,87 (dd, 1H,  $J_1 = 2,5$ ,  $J_2 = 12,2$  Hz, H-6'), 5,20 (d, 1H,  $J = 3,6$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_H$  1,21 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,97 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,64 (m, 1H, H-1), 2,78 (m, 1H, H-3), 3,18 (t, 1H,  $J = 9,1$  Hz, H-6), 3,37 (t, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-4), 3,46 (t, 1H,  $J = 9,2$  Hz, H-5); "Anillo III"  $\delta_H$  1,16 (d, 3H,  $J = 6,2$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,09 (m, 1H, H-5"), 3,70 (t, 1H,  $J = 5,3$  Hz, H-4"), 4,04 (dd, 1H,  $J_1 = 3,3$ ,  $J_2 = 5,3$  Hz, H-2"), 4,15 (t, 1H,  $J = 5,5$  Hz, H-3"), 5,21 (d, 1H,  $J = 2,7$  Hz, H-1").

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  18,8 (C-6"), 37,6 (C-1), 49,4, 52,1, 52,6, 57,8, 62,8 (C-6'), 70,8, 72,1, 75,2, 75,4, 76,1, 78,4, 84,7, 87,8, 88,2, 102,0 (C-1'), 109,5 (C-1").

MALDI TOFMS calculado para  $C_{18}H_{37}N_4O_{10}$  ( $[M+H]^+$ )  $m/e$ : 469,2;  $m/e$  medido: 469,2.

40

Preparación de 5-O-(5-Amino-5,6-didesoxi- $\alpha$ -L-talofuranosil)-1-N-[(S)-4-amino-2-hidroxi-butanoil]paromamina (NB122)



NB122

5

El Compuesto (S)-23 producto de glicosilación (1,1 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB122.

El producto analíticamente puro se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB122 (0,450 gramos, con un rendimiento de un 79 %).

Para el almacenamiento y los ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.  $[\alpha]_D^{20} = +35,4$  (c = 0,2, H<sub>2</sub>O).

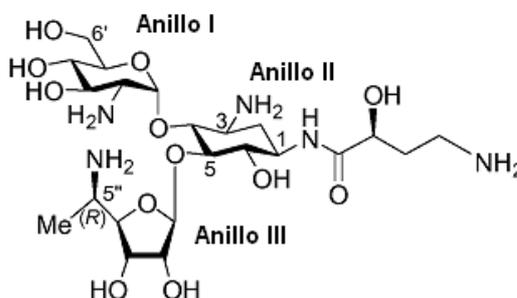
RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) "Anillo I"  $\delta_H$  2,65 (dd, 1H,  $J_1 = 3,7$  y  $J_2 = 10,3$  Hz, H-2'), 3,26 (t, 1H,  $J = 8,9$  Hz, H-4'), 3,54 (t, 1H,  $J = 9,2$  Hz, H-3'), 3,68 (dd, 1H,  $J_1 = 5,9$  y  $J_2 = 11,8$  Hz, H-6'), 3,80 (m, 1H, H-5'), 3,87 (dd, 1H,  $J_1 = 1,7$  y  $J_2 = 11,7$  Hz, H-6'), 5,21 (d, 1H,  $J = 3,3$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_H$  1,34 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,99 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$  y  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,84 (m, 1H, H-3), 3,40 (t, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-4), 3,50-3,59 (m, 2H, H-5 y H-6), 3,81 (m, 1H, H-1); "Anillo III"  $\delta_H$  1,17 (d, 3H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,95 (m, 1H, H-5''), 3,57 (t, 1H,  $J = 6,5$  Hz, H-4''), 4,01 (t, 1H,  $J = 5,7$  Hz, H-3''), 4,08 (dd, 1H,  $J_1 = 2,7$  y  $J_2 = 5,4$  Hz, H-2''), 5,26 (d, 1H,  $J = 2,5$  Hz, H-1''). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_H$  1,82 (m, 1H, H-8), 1,94 (m, 1H, H-8), 2,83 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz, H-9 y H-9), 4,14 (dd, 1H,  $J_1 = 4,1$  y  $J_2 = 7,6$  Hz, H-7).

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_C$  19,2 (C-6''), 35,9, 37,8, 38,9, 50,8, 50,9, 52,4, 57,8, 62,8, 71,7, 72,1, 72,3, 75,3, 75,4, 75,6, 76,3, 84,7, 86,9, 88,6, 101,9 (C-1'), 109,9 (C-1''), 177,1 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e: 570,3; m/e medido: 570,27.

40

Preparación de 5-O-(5-Amino-5,6-didesoxi-β-D-alofuranosil)-1-N-[(S)-4-amino-2-hidroxi-butanoil]paromamina (NB123)



NB123

5 El Compuesto (R)-24 producto de glicosilación (1,2 gramos, 0,0011 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB123.

20 El producto analíticamente puro se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB123 (0,510 gramos, con un rendimiento de un 82 %).

25 Para el almacenamiento y los ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +32,2 (c = 0,2, H<sub>2</sub>O).

30 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) "Anillo I" δ<sub>H</sub> 2,65 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,4, J<sub>2</sub> = 10,0 Hz, H-2'), 3,27 (t, 1H, J = 9,0 Hz, H-4'), 3,54 (t, 1H, J = 9,1 Hz, H-3'), 3,66 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 6,0, J<sub>2</sub> = 12,0 Hz, H-6'), 3,81 (m, 1H, H-5'), 3,88 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,0, J<sub>2</sub> = 12,0 Hz, H-6'), 5,21 (d, 1H, J = 3,5 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,33 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = J<sub>3</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,99 (td, 1H, J<sub>1</sub> = 4,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,85 (m, 1H, H-3), 3,39 (t, 1H, J = 9,0 Hz, H-4), 3,49-3,57 (m, 2H, H-5 y H-6), 3,82 (m, 1H, H-1); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,16 (d, 3H, J = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,09 (m, 1H, H-5"), 3,70 (t, 1H, J = 5,4 Hz, H-4"), 4,08 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,6, J<sub>2</sub> = 5,1 Hz, H-2"), 4,14 (t, 1H, J = 5,7 Hz, H-3"), 5,22 (d, 1H, J = 2,7 Hz, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,82 (m, 1H, H-8), 1,94 (m, 1H, H-8), 2,84 (t, 2H, J = 7,2 Hz, H-9 y H-9), 4,15 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 4,0, J<sub>2</sub> = 7,5 Hz, H-7).  
35 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 18,8 (C-6"), 35,9, 37,6, 38,9, 49,6, 40,8, 52,3, 57,8, 62,8, 71,0, 71,6, 72,1, 75,2, 75,3, 75,4, 76,2, 85,0, 87,1, 87,9, 101,9 (C-1'), 110,0 (C-1"), 177,0 (C=O).

40 MALDI TOFMS calculado para C<sub>22</sub>H<sub>44</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e: 570,3; m/e medido: 570,27.

Preparación de 6'-*(R)*-Metil 5-O-(5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-α-L-talofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',1,3-triazido paromamina (Compuesto (S)-221)

45 Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 219 (0,9 gramos, 0,0015 mol) y el Compuesto dador (S)-17 (2,0 gramos, 0,0037 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 120 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub> se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-221 (1,1 gramos) con un rendimiento de un 75 %.

50 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 1,27 (d, 3H, J = 6,0 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,58 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 5,5, J<sub>2</sub> = 10,5 Hz, H-2'), 4,45 (d, 1H, J = 10,7 Hz, H-5'), 4,96-5,02 (m, 2H, H-4' y H-6'), 5,42 (t, 1H, J = 9,6 Hz, H-3'), 5,95 (d, 1H,

$J = 3,7$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_{\text{H}}$  1,51 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,41 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,55 (m, 2H, H-1 y H-3), 3,76 (t, 1H,  $J = 9,4$  Hz, H-4), 3,88 (t, 1H,  $J = 9,0$  Hz, H-5), 5,03 (t, 1H,  $J = 9,1$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_{\text{H}}$  1,27 (d, 3H,  $J = 5,6$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,76 (m, 1H, H-5"), 4,35 (dd, 1H,  $J_1 = 6,9$ ,  $J_2 = 10,9$  Hz, H-4"), 5,45 (t, 1H,  $J = 5,5$  Hz, H-3"), 5,62 (m, 2H, H-2" y H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  2,08 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 6H, OAc), 2,38 (s, 3H, OAc), 7,37 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar), 7,41 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar), 7,53-7,60 (m, 2H, Ar), 7,89 (d, 2H,  $J = 8,0$  Hz, Ar), 7,93 (d, 2H,  $J = 8,2$  Hz, Ar).  
 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  13,3 (C-7'), 15,4 (C-6"), 20,6 (2C, OAc), 20,9 (OAc), 21,1 (OAc), 32,1 (C-2), 58,4, 58,8, 59,5, 61,7, 68,5, 69,0, 70,1, 70,8. 71,8, 73,6, 74,6, 77,3, 79,6, 84,4, 96,0 (C-1'), 107,6 (C-1"), 128,4 (Ar), 128,5 (Ar), 128,6 (Ar), 128,7 (Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 133,5 (Ar), 133,6 (Ar), 164,9 (C=O), 165,3 (C=O), 169,7 (C=O), 169,9 (C=O), 170,1 (C=O), 170,2 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub> Na ([M+Na]<sup>+</sup>)  $m/e$ : 985,3;  $m/e$  medido: 985,4.

Preparación de 6'-(R)-Metil-5-O-(5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-β-D-alofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',1,3-triazido paromamina (Compuesto (R)-222)

Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 219 (1,0 gramos, 0,0017 mol) y el Compuesto dador (R)-18 (2,2 gramos, 0,004 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 120 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-222 (1,2 gramos) con un rendimiento de un 75 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I"  $\delta_{\text{H}}$  1,28 (d, 3H,  $J = 6,7$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,46 (dd, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 10,4$  Hz, H-2'), 4,47 (d, 1H,  $J = 10,7$  Hz, H-5'), 4,96-5,02 (m, 2H, H-4' y H-6'), 5,44 (t, 1H,  $J = 9,6$  Hz, H-3'), 5,93 (d, 1H,  $J = 3,3$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_{\text{H}}$  1,50 (ddd, 1H,  $J_1=J_2=J_3=12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,41 (td, 1H,  $J_1=4,5$  y  $J_2=12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,56 (m, 2H, H-1 y H-3), 3,76 (t, 1H,  $J = 10,0$  Hz, H-4), 3,92 (t, 1H,  $J = 9,5$  Hz, H-5), 5,04 (t, 1H,  $J = 9,6$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_{\text{H}}$  1,42 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,78 (m, 1H, H-5"), 4,40 (t, 1H,  $J = 4,6$  Hz, H-4"), 5,50 (t, 1H,  $J = 5,0$  Hz, H-3"), 5,59 (t, 1H,  $J = 3,7$  Hz, H-2"), 5,64 (s, 1H, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  2,09 (s, 9H, OAc), 2,33 (s, 3H, OAc), 7,37-7,41 (m,  $\delta_{\text{H}}$ , Ar), 7,56 (m, 2H, Ar), 7,92 (d,  $\delta_{\text{H}}$ ,  $J = 8,0$  Hz Ar).  
 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  13,3 (C-7'), 15,0 (C-6"), 20,6 (OAc), 20,7 (OAc), 20,8 (OAc), 21,2 (OAc), 32,1 (C-2), 58,1, 58,2, 58,8, 61,5, 68,9, 70,2, 70,6, 71,4, 73,8, 74,6, 77,0, 77,1, 79,4, 83,9, 96,1 (C-1'), 107,0 (C-1"), 128,4 (2C, Ar), 128,7 (2C, Ar), 129,6 (2C, Ar), 133,5 (Ar), 133,6 (Ar), 164,9 (C=O), 165,4 (C=O), 169,8 (C=O), 169,9 (2C, C=O), 170,1 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>41</sub>H<sub>46</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>)  $m/e$ : 985,3;  $m/e$  medido: 985,4.

Preparación de 6'-(R)-Metil-5-O-(5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-α-L-talofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',3-diazido-1-N-[(S)-4-azido-2-O-acetil-butanoil]paromamina (Compuesto (S)-223)

Se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 220 (1,0 gramos, 0,0014 mol) y el Compuesto dador (S)-17 (2,5 gramos, 0,0046 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de BF<sub>3</sub>-Et<sub>2</sub>O y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 60 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con NaHCO<sub>3</sub> saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (S)-223 (1,1 gramos) con un rendimiento de un 73 %.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): "Anillo I"  $\delta_{\text{H}}$  1,27 (d, 3H,  $J = 5,2$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,54 (dd, 1H,  $J_1 = 4,3$ ,  $J_2 = 10,5$  Hz, H-2'), 4,45 (dd, 1H,  $J_1 = 1,8$ ,  $J_2 = 10,6$  Hz, H-5'), 4,96-5,02 (m, 2H, H-4' y H-6'), 5,43 (t, 1H,  $J = 9,4$  Hz, H-3'), 5,94 (d, 1H,  $J = 3,7$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_{\text{H}}$  1,44 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,52 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,60 (m, 1H, H-3), 3,66 (t, 1H,  $J = 4,5$  Hz, H-4), 3,99 (t, 1H,  $J = 6,4$  Hz, H-5), 4,05 (m, 1H, H-1), 4,94 (t, 1H,  $J = 9,2$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_{\text{H}}$  1,32 (d, 3H,  $J = 6,9$  Hz, CH<sub>3</sub>), 3,72 (m, 1H, H-5"), 4,32 (dd, 1H,  $J_1 = 5,85$ ,  $J_2 = 8,0$  Hz, H-4"), 5,55 (dd, 1H,  $J_1 = 4,7$ ,  $J_2 = 7,4$  Hz, H-3"), 5,65 (m, 2H, H-2" y H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  2,04-2,10 (m, 2H, H-8 y H-8), 2,11 (m, 9H, OAc), 2,22 (s, 3H, OAc), 2,30 (s, 3H, OAc), 3,37 (t, 2H,  $J = 6,8$  Hz, H-9 y H-9), 5,20 (t, 1H,  $J = 4,85$  Hz, H-7), 6,70 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, NH), 7,35 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, Ar), 7,43 (t, 2H,  $J = 7,8$  Hz, Ar), 7,53-7,61 (m, 2H, Ar), 7,86 (dd, 2H,  $J_1 = 1,1$ ,  $J_2 = 8,2$  Hz, Ar), 7,95 (dd, 2H,  $J_1 = 1,2$ ,  $J_2 = 8,2$  Hz, Ar).  
 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta_{\text{C}}$  13,5 (C-7'), 15,5 (C-6"), 20,6 (3C, OAc), 20,9 (OAc), 21,1 (OAc), 30,4, 32,2 (C-1), 47,0, 48,4, 58,6, 58,7, 61,6, 68,6, 69,0, 70,3, 70,8 (2C), 71,4, 73,1, 74,7, 77,5, 79,8, 83,6, 96,3 (C-1'), 107,4 (C-1"), 128,4 (Ar), 128,5 (Ar), 128,7 (2C, Ar), 129,6 (Ar), 129,7 (Ar), 133,5 (Ar), 133,6 (Ar), 165,0 (C=O), 165,2 (C=O), 168,8 (C=O), 169,7 (2C, C=O), 169,9 (C=O), 170,0 (C=O), 172,4 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para  $C_{47}H_{55}N_{13}O_{19} Na$  ( $[M+Na]^+$ )  $m/e$ : 1128,4;  $m/e$  medido: 1128,2.

Preparación de 6'-(R)-Metil-5-O-(5-azido-5,6-didesoxi-2,3-O-dibenzoil-β-D-alofuranosil)-3',4',6',6-tetra-O-acetil-2',3-diazido-1-N-[(S)-4-azido-2-O-acetil-butanoil]paromamina (Compuesto (R)-224)

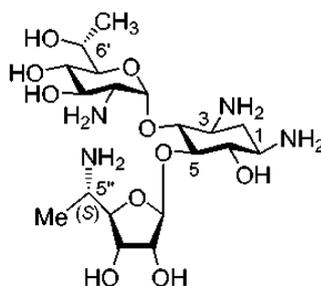
Se añadió  $CH_2Cl_2$  anhidro (15 ml) a tamices moleculares de 4 Å secados a la llama, en polvo (2,0 gramos), seguido de la adición del Compuesto aceptor 220 (1,0 gramos, 0,0014 mol) y el Compuesto dador (R)-18 (2,5 gramos, 0,0046 mol). La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se enfrió a -20 °C. Se añadió una cantidad catalítica de  $BF_3 \cdot Et_2O$  y la mezcla se agitó a -15 °C y la evolución de la reacción se controló por TLC, que indicaba la finalización después de 90 minutos. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó con  $NaHCO_3$  saturado y solución salina saturada. La fase orgánica combinada se secó sobre  $MgSO_4$ , se evaporó y se sometió a cromatografía en columna (EtOAc/Hexano) para obtener el Compuesto (R)-224 (1,15 gramos) con un rendimiento de un 76 %.

RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ): RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ): RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CDCl_3$ ): "Anillo I"  $\delta_H$  1,28 (d, 3H,  $J = 6,6$  Hz,  $CH_3$ ), 3,43 (dd, 1H,  $J_1 = 4,3$ ,  $J_2 = 10,6$  Hz, H-2'), 4,49 (dd, 1H,  $J_1 = 2,2$ ,  $J_2 = 10,7$  Hz, H-5'), 4,96-5,02 (m, 2H, H-4' y H-6'), 5,45 (t, 1H,  $J = 10,6$  Hz, H-3'), 5,92 (d, 1H,  $J = 3,7$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_H$  1,42 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 2,52 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$ ,  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 3,64 (m, 1H, H-3), 3,76 (t, 1H,  $J = 4,5$  Hz, H-4), 4,05 (m, 2H, H-1 y H-5), 4,93 (t, 1H,  $J = 10,0$  Hz, H-6); "Anillo III"  $\delta_H$  1,39 (d, 3H,  $J = 6,4$  Hz,  $CH_3$ ), 3,85 (m, 1H, H-5"), 4,36 (dd, 1H,  $J_1 = 4,3$ ,  $J_2 = 6,3$  Hz, H-4"), 5,63 (m, 2H, H-2" y H-3"), 5,67 (s, 1H, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_H$  2,04-2,10 (m, 2H, H-8 y H-8), 2,08 (s, 3H, OAc), 2,09 (s, 3H, OAc), 2,10 (s, 3H, OAc), 2,21 (s, 3H, OAc), 2,25 (s, 3H, OAc), 3,37 (t, 2H,  $J = 6,7$  Hz, H-9 y H-9), 5,18 (t, 1H,  $J = 5,0$  Hz, H-7), 6,66 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, NH), 7,38-7,42 (m,  $\delta_H$ , Ar), 7,53-7,59 (m, 2H, Ar), 7,89-7,92 (m,  $\delta_H$ , Ar).

RMN  $^{13}C$  (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta_C$  13,5 (C-7'), 15,2 (C-6"), 20,6 (3C, OAc), 20,8 (OAc), 21,1 (OAc), 30,4, 32,4 (C-1), 47,0, 48,4, 58,1, 58,7, 61,4, 68,6, 69,0, 70,3, 70,5, 70,8, 70,9, 73,4, 74,8, 77,2, 79,6, 83,3, 96,3 (C-1'), 106,9 (C-1"), 128,4 (2C, Ar), 128,7 (2C, Ar), 129,5 (Ar), 129,6 (Ar), 133,5 (2C, Ar), 164,9 (C=O), 165,2 (C=O), 168,8 (C=O), 169,7 (2C, C=O), 169,9 (C=O), 170,0 (C=O), 172,3 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para  $C_{47}H_{55}N_{13}O_{19} Na$  ( $[M+Na]^+$ )  $m/e$ : 1128,4;  $m/e$  medido: 1128,4.

Preparación de 6'-(R)-Metil-5-O-(5-amino-5,6-didesoxi-α-L-talofuranosil)-paromamina (NB124)



NB124

El Compuesto (S)-221 producto de glicosilación (1,0 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de  $MeNH_2$  (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió  $PMe_3$  (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [ $CH_2Cl_2$ /MeOH/ $H_2O$ /MeNH $_2$  (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml),  $CH_2Cl_2$  (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de  $MeNH_2$  al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB124.

El producto analíticamente se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de  $NH_4^+$ ). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/ $H_2O$  (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/ $H_2O$ / $NH_4OH$  (80:10:10) para proporcionar NB124 (0,400 gramos, rendimiento de un 79 %).

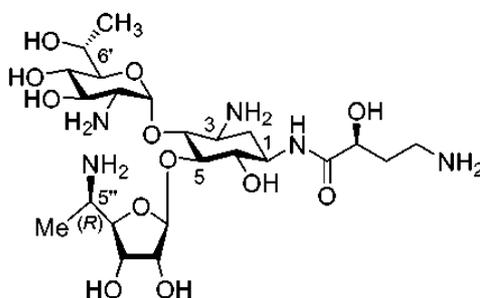
Para el almacenamiento y ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 1,21 (d, 3H, J = 5,8 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,61 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,5, J<sub>2</sub> = 10,0 Hz, H-2'), 3,22 (t, 1H, J = 10,0 Hz, H-4'), 3,51 (t, 1H, J = 8,9 Hz, H-3'), 3,81 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,0, J<sub>2</sub> = 10,0 Hz, H-5'), 4,12 (m, 1H, H-6'), 5,20 (d, 1H, J = 3,3 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,18 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = J<sub>3</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,98 (td, 1H, J<sub>1</sub> = 4,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,63 (m, 1H, H-1), 2,79 (m, 1H, H-3), 3,19 (t, 1H, J = 9,7 Hz, H-6), 3,38 (t, 1H, J = 9,3 Hz, H-4), 3,48 (t, 1H, J = 9,2 Hz, H-5); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,18 (d, 3H, J = 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,95 (m, 1H, H-5"), 3,57 (t, 1H, J = 6,4 Hz, H-4"), 4,03 (t, 1H, J = 5,6 Hz, H-3"), 4,07 (m, 1H, H-2"), 5,25 (d, 1H, J = 2,5 Hz, H-1").

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 16,9 (C-7'), 19,3 (C-6"), 37,5 (C-1), 50,6, 52,3, 52,6, 57,8, 67,8, 72,2, 73,6, 75,5, 76,2, 76,7, 78,6, 84,6, 87,3, 88,6, 101,9 (C-1'), 109,6 (C-1").

MALDI TOFMS calculado para C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e: 483,3; m/e medido: 483,2.

Preparación de 6'-*(R)*-Metil-5-O-(5-amino-5,6-didesoxi-β-D-alfufuranosil)-paromamina (NB125)



NB125

El Compuesto (*R*)-222 producto de glicosilación (1,0 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB125.

El producto analíticamente se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB125 (0,398 gramos, rendimiento de un 79 %).

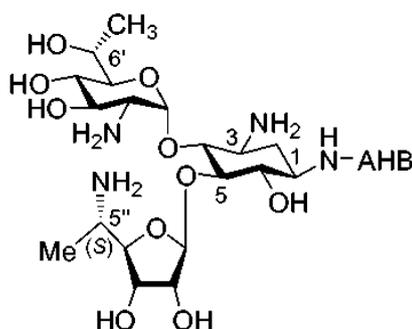
Para el almacenamiento y ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): "Anillo I" δ<sub>H</sub> 1,22 (d, 3H, J = 5,8 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,61 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 2,5, J<sub>2</sub> = 9,6 Hz, H-2'), 3,22 (t, 1H, J = 9,8 Hz, H-4'), 3,50 (t, 1H, J = 9,9 Hz, H-3'), 3,83 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 3,0, J<sub>2</sub> = 10,1 Hz, H-5'), 4,12 (m, 1H, H-6'), 5,20 (d, 1H, J = 3,3 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,21 (ddd, 1H, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = J<sub>3</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,98 (td, 1H, J<sub>1</sub> = 4,5, J<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,65 (m, 1H, H-1), 2,78 (m, 1H, H-3), 3,18 (t, 1H, J = 9,3 Hz, H-6), 3,38 (t, 1H, J = 9,1 Hz, H-4), 3,46 (t, 1H, J = 9,2 Hz, H-5); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,17 (d, 3H, J = 6,4 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,10 (m, 1H, H-5"), 3,71 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H-4"), 4,06 (t, 1H, J = 5,6 Hz, H-2"), 4,16 (t, 1H, J = 3,0 Hz, H-3"), 5,20 (d, 1H, J = 3,0 Hz, H-1").

RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 16,6 (C-7'), 18,7 (C-6"), 37,6 (C-1), 49,5, 52,2, 52,5, 57,8, 67,8, 70,8, 73,6, 75,4, 76,1, 76,7, 78,4, 84,7, 87,5, 88,0, 101,9 (C-1'), 109,6 (C-1").

MALDI TOFMS calculado para C<sub>19</sub>H<sub>39</sub>N<sub>4</sub>O<sub>10</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) m/e: 483,3; m/e medido: 483,2.

Preparación de 6'-(*R*)-Metil-5-O-(5-amino-5,6-didesoxi- $\alpha$ -*L*-talofuranosil)-1-N-[(*S*)-4-amino-2-hidroxi-butanoil] paromamina (NB127)



NB127

5

El Compuesto (S)-223 producto de glicosilación (1,05 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se redisolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la forma de la amina libre de NB127.

10

15

El producto analíticamente se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB127 (0,480 gramos, rendimiento de un 86 %).

20

Para el almacenamiento y ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.

25

RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) "Anillo I"  $\delta_{\text{H}}$  1,21 (d, 3H,  $J = 6,0$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,63 (dd, 1H,  $J_1 = 3,5$ ,  $J_2 = 10,0$  Hz, H-2'), 3,23 (t, 1H,  $J = 8,9$  Hz, H-4'), 3,52 (t, 1H,  $J = 9,9$  Hz, H-3'), 3,82 (dd, 1H,  $J_1 = 3,0$ ,  $J_2 = 10,0$  Hz, H-5'), 4,13 (m, 1H, H-6'), 5,22 (d, 1H,  $J = 3,3$  Hz, H-1'); "Anillo II"  $\delta_{\text{H}}$  1,34 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$  Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,99 (td, 1H,  $J_1 = 4,5$  y  $J_2 = 12,5$  Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,85 (m, 1H, H-3), 3,40 (t, 1H,  $J = 8,8$  Hz, H-4), 3,50-3,59 (m, 2H, H-5 y H-6), 3,83 (m, 1H, H-1); "Anillo III"  $\delta_{\text{H}}$  1,17 (d, 3H,  $J = 6,6$  Hz, CH<sub>3</sub>), 2,94 (m, 1H, H-5''), 3,56 (t, 1H,  $J = 7,1$  Hz, H-4''), 4,01 (t, 1H,  $J = 5,7$  Hz, H-3''), 4,09 (dd, 1H,  $J_1 = 2,7$  y  $J_2 = 5,4$  Hz, H-2''), 5,26 (d, 1H,  $J = 2,5$  Hz, H-1''). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación:  $\delta_{\text{H}}$  1,82 (m, 1H, H-8), 1,95 (m, 1H, H-8), 2,83 (t, 2H,  $J = 5,7$  Hz, H-9 y H-9), 4,13 (dd, 1H,  $J_1 = 4,2$  y  $J_2 = 7,6$  Hz, H-7).

30

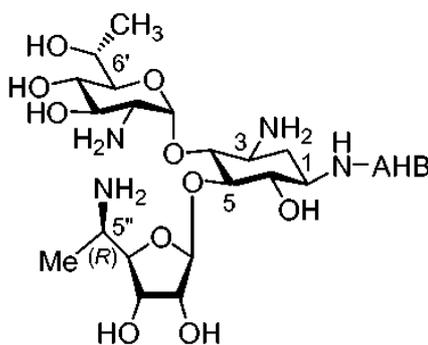
RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta_{\text{C}}$  16,6 (C-7'), 19,2 (C-6''), 35,9, 37,8, 39,0, 50,8, 50,9, 52,3, 57,8, 67,8, 71,7, 72,4, 73,6, 75,5, 75,6, 76,3, 76,8, 84,8, 86,7, 88,6, 101,9 (C-1''), 110,0 (C-1''), 177,1 (C=O).

35

MALDI TOFMS calculado para C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>)  $m/e$ : 606,3;  $m/e$  medido: 606,6.

40

Preparación de 6'-*(R)*-Metil-5-O-(5-amino-5,6-didesoxi-β-D-alofuranosil)-1-N-[(*S*)-4-amino-2-hidroxi-butanoil]paromamina (NB128)



NB128

5 El Compuesto (*R*)-224 producto de glicosilación (1,12 gramos, 0,001 mol) se trató con una solución de MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH, 50 ml) y la evolución de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH a 85:15), que indicaba la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (1 mM, 5,0 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadió PMe<sub>3</sub> (solución 1 M en THF, 5,0 ml, 5,0 mmol). La evolución de la reacción se controló por TLC [CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O/MeNH<sub>2</sub> (solución al 33 % en EtOH) a 10:15:6:15], que indicaba la finalización después de 1 hora. El producto se purificó por cromatografía en columna sobre una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (800 ml), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (800 ml), EtOH (200 ml), y MeOH (400 ml). A continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeNH<sub>2</sub> al 20 % (solución al 33 % en EtOH) en MeOH al 80 %. Las fracciones que contenían el producto se combinaron y se evaporaron a sequedad. El residuo se re-disolvió en un pequeño volumen de agua y se evaporó de nuevo (2-3 repeticiones) para proporcionar la amina libre en forma libre NB128.

20 El producto analíticamente se obtuvo pasando el producto mencionado anteriormente a través de una columna corta de Amberlite CG50 (forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). La columna se lavó primero con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O (3:2), a continuación el producto se eluyó con una mezcla de MeOH/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH (80:10:10) para proporcionar NB128 (0,500 gramos, rendimiento de un 84 %).

25 Para el almacenamiento y ensayos biológicos, el compuesto se convirtió en su forma de sal de sulfato: la base libre se disolvió en agua, el pH se ajustó a aproximadamente 7,0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,1 N) y se liofilizó.

30 RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) "Anillo I" δ<sub>H</sub> 1,22 (d, 3H, *J* = 6,3 Hz, CH<sub>3</sub>), 2,63 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 3,8, *J*<sub>2</sub> = 10,0 Hz, H-2'), 3,22 (t, 1H, *J* = 9,8 Hz, H-4'), 3,52 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 8,6, *J*<sub>2</sub> = 10,3 Hz, H-3'), 3,83 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 3,1, *J*<sub>2</sub> = 10,2 Hz, H-5'), 4,13 (m, 1H, H-6'), 5,23 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H-1'); "Anillo II" δ<sub>H</sub> 1,34 (ddd, 1H, *J*<sub>1</sub> = *J*<sub>2</sub> = *J*<sub>3</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>ax</sub>), 1,99 (td, 1H, *J*<sub>1</sub> = 4,5 y *J*<sub>2</sub> = 12,5 Hz, H-2<sub>equiv.</sub>), 2,85 (m, 1H, H-3), 3,39 (t, 1H, *J* = 8,8 Hz, H-4), 3,49-3,56 (m, 2H, H-5 y H-6), 3,82 (m, 1H, H-1); "Anillo III" δ<sub>H</sub> 1,16 (d, 3H, *J* = 6,7 Hz, CH<sub>3</sub>), 3,08 (m, 1H, H-5"), 3,69 (t, 1H, *J* = 5,5 Hz, H-4"), 4,07 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 2,1, *J*<sub>2</sub> = 5,2 Hz, H-2"), 4,14 (t, 1H, *J* = 5,7 Hz, H-3"), 5,21 (d, 1H, *J* = 3,7 Hz, H-1"). Los picos adicionales en el espectro se identificaron como sigue a continuación: δ<sub>H</sub> 1,82 (m, 1H, H-8), 1,95 (m, 1H, H-8), 2,84 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, H-9 y H-9), 4,13 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 3,9, *J*<sub>2</sub> = 7,5 Hz, H-7).

35 RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ<sub>C</sub> 16,6 (C-7'), 18,8 (C-6"), 36,0, 37,7, 38,9, 49,6, 50,8, 52,3, 57,8, 67,8, 71,0, 71,7, 73,6, 75,5 (2C), 76,2, 76,7, 85,0, 86,9, 87,9, 101,9 (C-1'), 110,0 (C-1"), 177,1 (C=O).

MALDI TOFMS calculado para C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>Na ([M+Na]<sup>+</sup>) *m/e*: 606,3; *m/e* medido: 606,6.

## 40 EJEMPLO 2

### ULTRALECTURA DE CODÓN DE FINALIZACIÓN

45 Como se ha presentado anteriormente en el presente documento, la eficacia de la ultralectura inducida por aminoglucósidos depende en gran medida de: (i) la identidad del codón de finalización (UGA > UAG > UAA), (ii) la identidad del primer nucleótido inmediatamente cadena abajo del codón de finalización (C > U > A ≥ G) e (iii) el contexto de la secuencia local alrededor del codón de finalización. Por lo tanto, en intentos para proporcionar una amplia comprensión de la relación de estructura-actividad de las estructuras diseñadas, se usó una diversidad de construcciones que contenían contextos de secuencias diferentes alrededor de los codones de finalización prematuros. Estas secuencias a modo de ejemplo se obtuvieron a partir de los genes de *PCDH15*, *CFTR*, *IDUA* y *Distrofina* que subyacen a USH1, CF, HS y DMD, respectivamente. Las mutaciones sin sentido prevalentes de estas



Los fragmentos se insertaron en marco en el policonector del plásmido p2Luc entre cualquiera de los sitios de restricción *BamHI* y *SacI* (p.R3X y p.R245X), o *Sall* y *SacI* (todo el resto).

5 Para los ensayos de ultralectura *in vitro*, los plásmidos obtenidos, con adición de los aminoglucósidos sometidos a ensayo se transcribieron y se tradujeron usando el Sistema de Transcripción/Traducción Acoplado Rápido de Lisado de Reticulocitos TNT. La actividad de luciferasa se determinó después de 90 minutos de incubación a 30 °C, usando el Sistema de Ensayo Indicador de Luciferasa Doble (Promega™).

10 Para los ensayos de ultralectura *ex vivo*, las construcciones que albergaban las mutaciones *R3X*, *R245X*, *Q70X* y *W1282X* se transfectaron a células HEK-293 con Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y la adición de los compuestos sometidos a ensayo se realizó 6 horas después de la transfección. Las células se cosecharon después de 16 horas de incubación con los aminoglucósidos sometidos a ensayo. La ultralectura del codón de finalización se calculó como se ha descrito anteriormente (véase, Grentzmann, G. *et al.*, RNA, 1998, 4, p. 479.)

15 *Resultados de la ultralectura*

Inicialmente, la influencia del grupo metilo en C5" quiral sobre el potencial de ultralectura se evaluó en los pseudotrisacáridos NB118 y NB119 usando un el sistema de ensayo indicador de luciferasa doble como se ha descrito anteriormente en el presente documento. En resumen, los fragmentos de ADN se clonaron entre los sitios de restricción *BamHI* y *SacI* del vector *p2luc* y las construcciones obtenidas se transcribieron y se tradujeron usando el sistema de transcripción/traducción acoplado rápido TNT. La cantidad de los productos traducidos se evaluó usando el sistema de ensayo indicador de luciferasa doble y se usó para calcular el nivel de supresión. Los resultados, que representan promedios de al menos tres experimentos independientes, se resumen en las Figuras 2A-F.

Las Figuras 2A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestra gráficos comparativos de los niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por NB30 (marcado con círculos vacíos), NB118 (marcado con triángulos de color negro), NB119 (marcado con triángulos vacíos) y el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 2A, R245X (USH1) en la Figura 2B, G542X (CF) en la Figura 2C, W1282X (CF) en la Figura 2D, Q70X (HS) en la Figura 2E, y en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3381X (DMD) se muestran en la Figura 2F.

Como se puede observar en las Figuras A-F 2, en todas las mutaciones sometidas a ensayo, la instalación del grupo (S)-5"-metilo, al igual que en NB118), en NB30 aumenta de forma radical su actividad de ultralectura *in vitro*, mientras que la del grupo (R)-5"-metilo, al igual que en NB119), es comparativamente más pequeña. Además, en todas las mutaciones sometidas a ensayo (excepto G542X, véase la Figura 2C), la actividad de ultralectura de NB118 era significativamente mejor que la del fármaco clínico gentamicina.

El mismo aumento de potencia, atribuido a la adición del grupo (S)-5"-metilo, se exploró en el caso del ejemplo de referencia NB54. Para evaluar el impacto de la estereoquímica en la posición C5", se sintetizaron ambos diastereómeros en C5", en particular NB122 y NB123. Se realizaron ensayos de supresión *in vitro* comparativos de los pseudotrisacáridos NB54, NB122, NB123, y el fármaco de control gentamicina en las mismas condiciones experimentales que se han descrito anteriormente en el presente documento para los compuestos ejemplos de referencia NB30, NB54 y NB118, y los datos observados (promedios de al menos tres experimentos independientes) se presentan en las Figuras 3A-F.

Las Figuras 3A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de los niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por NB54 (marcado con círculos de color negro), NB122 (marcado con triángulos de color negro), NB123 (marcado con triángulos vacíos) y gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 3A, R245X (USH1) en la Figura 3B, G542X (CF) en la Figura 3C, W1282X (CF) en la Figura 3D, Q70X (HS) en la Figura 3E, y en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3381X (DMD) se muestran en la Figura 3F.

Como se puede observar en las Figuras 3A-F, la eficacia de la ultralectura es sustancialmente diferente entre diferentes construcciones y compuestos sometidos a ensayo, sin dependencia evidente de la eficacia de la ultralectura en el tipo de modificación introducida en el de aminoglucósido. Sin embargo, en todas las mutaciones sometidas a ensayo (excepto R3X y Q70X, Figura 3A y Figura 3E), NB122 indujo el nivel de ultralectura más elevado, seguido de NB123, NB54, y gentamicina. La secuencia del tetracodón UGA C (R3X) mostraba la mejor *ultralectura* de traducción que UGA A y UGA G, con el tetracodón UAG C siendo menos eficaz, de acuerdo con observaciones iniciales.

Para evaluar adicionalmente el potencial de ultralectura de NB122 y NB123, su actividad se sometió a ensayo en células de mamífero en cultivo usando cuatro plásmidos indicadores de luciferasa doble diferentes que albergaban la mutación sin sentido *PCDH15-R3X* y *PCDH15-R245X* de USH1, la mutación sin sentido *IDUA-Q70X* de HS, y la mutación sin sentido *CFTR-W1282X* de CF. Estas construcciones indicadoras fueron las mismas que las presentadas anteriormente en el presente documento para el estudio *in vitro*, y presentan distintas ventajas para controlar las diferencias en los niveles de ARNm entre secuencias normales y secuencias que contienen mutaciones sin sentido con respecto a las del análisis de indicador individual o de proteína directa.

Las construcciones se transfirieron en una línea de células de riñón embrionario humano (HEK-293) y se incubaron con diversas concentraciones de NB122, NB123, NB54 y el fármaco de control gentamicina, y los resultados se presentan en las Figuras 4A-D.

Las Figuras 4A-D presentan la supresión *ex vivo* de las mutaciones sin sentido *PCDH15-R3X* (Figura 4A), *PCDH15-R245X* (Figura 4B), *IDUA-Q70X* (Figura 4C), y *CFTR-W1282X* (Figura 4D), realizada con el ejemplo de referencia NB54 (marcado con círculos de color negro), NB122 (marcado con triángulo de color negro), NB123 (marcado con triángulos vacíos) y el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro).

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, las construcciones del plásmido *p2luc* que albergan las mutaciones R3X, R245X, Q70X y W1282X se transfectaron a células HEK-293 usando lipofectamina 2000 y los compuestos sometidos a ensayo se añadieron 6 horas después de la transfección. Las lunas se cosecharon después de 16 horas de incubación y la actividad de luciferasa se determinó usando el sistema de ensayo indicador de luciferasa doble (Promega™). La ultralectura del codón de finalización se calculó como se ha descrito anteriormente como en los resultados son promedios de al menos tres experimentos independientes.

Como se puede observar en las Figuras 4A-D, en todas las mutaciones sometidas a ensayo, la eficacia observada de la ultralectura inducida por aminoglucósidos se encontraba en el orden de NB122 ≥ NB123 > NB54 > gentamicina. Esta tendencia para NB122 y NB123 era similar a la observada para la supresión de las mismas mutaciones de terminación *in vitro* (véase, Figuras 3A-F), aunque el espacio de la diferencia de potencia entre NB122 y NB123 era menor que el observado para la supresión de las mismas mutaciones en extractos sin células.

Las potencias de ultralectura significativamente más elevadas observadas tanto para NB122 como para NB123, con respecto a la del ejemplo de referencia NB54 en R3X y Q70X (véase, Figura 4A y Figura 4C), eran considerablemente diferentes a las de las mismas mutaciones *in vitro* (Figura 3A y Figura 3E). Estos datos pueden apuntar a una mejor permeabilidad celular tanto de NB122 como de NB123 con respecto a la del ejemplo de referencia NB54, debido a la presencia del grupo 5"-metilo.

Varias combinaciones de los puntos de farmacóforo mencionadas anteriormente en una molécula que incluía N1-AHB con el grupo (R)-6'-metilo dieron el compuesto conocido NB84 (ejemplo de referencia), y N1-AHB con los grupos (S)- y (R)-5"-metilo dieron los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, NB122 y NB123. Se ha mostrado que todos estos compuestos a modo de ejemplo presentan una actividad de ultralectura significativamente mejorada que las estructuras precursoras aunque la citotoxicidad de las nuevas estructuras resultantes no cambiaba de forma significativa. Uno de los objetivos del presente estudio era someter a ensayo combinaciones adicionales de los elementos mencionados anteriormente. Como tal la combinación del grupo (R)-6'-metilo con cualquiera del grupo (S)-5"-metilo o el grupo (R)-5"-metilo en una molécula. Con ese objeto, se prepararon y se sometieron al ensayo los compuestos a modo de ejemplo, NB124 y NB125. La combinación de los últimos dos grupos metilo quiral con el grupo N1-AHB dieron dos compuestos a modo de ejemplo, NB127 y NB128.

Al igual que en la serie previa, la influencia de dos grupos metilo quiral en el potencial de ultralectura se evaluó *in vitro* en los pseudotrisacáridos NB124 [(R)-6', (S)-5"] y NB125 [(R)-6', (R)-5"] usando un sistema de ensayo indicador de luciferasa doble como se ha descrito anteriormente en el presente documento, y los resultados se presentan en las Figuras 5A-B y las Figuras 6A-F.

Las Figuras 5A-D presentan representaciones comparativas de resultados de ensayos de supresión de mutación del codón de finalización prematuro *in vitro* del *CFTR-G542X* (Figura 5A y Figura 5C), *CFTR-W1282X* (Figura 5B y Figura 5D) realizados con compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), NB127 (marcado con triángulos de color negro), NB128 (marcado con triángulos vacíos), ejemplo de referencia NB74 (marcado con rombos vacíos) ejemplo de referencia NB84 (marcado con rombos de color negro), y los fármacos de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos).

Las Figuras 6A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de ultralectura del codón de finalización *in vitro* inducidos por NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), ejemplo de referencia NB74 (marcado con rombos vacíos) y el fármaco de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el

contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 6A, R245X (USH1) en la Figura 6B, G542X (CF) en la Figura 6C, W1282X (CF) en la Figura 6D, Q70X (HS) en la Figura 6E, y en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3381X (DMD) se muestran en la Figura 6F.

5 Como se puede observar en las Figuras 5A-B y en las Figuras 6A-F, la adición del grupo (S)-5"-metilo en la estructura del compuesto conocido NB74 (ejemplo de referencia) para proporcionar NB124 aumentar su actividad de ultralectura *in vitro de forma significativa*, mientras que la del grupo (R)-5"-metilo (en el compuesto NB125) es comparativamente menor. Además, en todas las mutaciones sometidas a ensayo la actividad de ultralectura de NB124 aumentaba de forma significativa en comparación con la del fármaco clínico de gentamicina. Por lo tanto, los dos grupos metilo (R)-6'-metilo y (S)-5"-metilo en el compuesto NB124 están funcionando de forma aditiva o de forma sinérgica para aumentar la actividad de ultralectura en comparación con NB30 (ejemplo de referencia), NB74 (ejemplo de referencia) y NB118. Las conversiones de cualquiera de NB30 en NB74 en NB124 (en particular la adición del primer grupo (R)-6'-metilo sobre NB30 para producir NB74 y la adición adicional del grupo (S)-5"-metilo sobre NB74 para producir NB124), o NB30 en NB118 en NB124 (en particular la adición del primer grupo (S)-5"-metilo sobre NB30 para producir NB118 y la adición adicional del grupo (R)-6'-metilo sobre NB118 para producir NB124), están incidiendo de forma aditiva para aumentar la actividad observada de las estructuras resultantes de una forma en etapas.

20 De modo interesante, también se observó un efecto aditivo similar cuando los dos grupos metilo mencionados anteriormente en NB124 y NB125 se combinaron con el grupo N1-AHB para producir los compuestos NB127 y NB128, respectivamente, como se presenta en las Figuras 5C-D y en las Figuras 7A-F.

25 Las Figuras 7A-F presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *in vitro* inducidos por NB84 (ejemplo de referencia; marcado con rumbos de color negro), NB127 (marcado con triángulos de color negro), NB128 (marcado con triángulos vacíos), G418 (marcado con rectángulos vacíos) y gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 7A, R245X (USH1) en la Figura 7B, G542X (CF) en la Figura 7C, W1282X (CF) en la Figura 7D, Q70X (HS) en la Figura 7E, y en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3381X (DMD) se muestran en la Figura 7F.

35 Como se puede observar en las Figuras 5C-D y en las Figuras 7A-F, NB127 que contiene el grupo (S)-5"-metilo es significativamente más potente que el NB128 que contiene el grupo (R)-5"-metilo. Además, tanto NB127, NB128 son inductores de ultralectura significativamente más potentes que los correspondientes homólogos que no poseen el resto AHB en la posición N1 (en particular NB124 y NB125) y el compuesto NB84 que contiene solamente el grupo (R)-6'-metilo y N1-AHB.

40 En el presente documento se observa que en varias competiciones de mutaciones sometidas a ensayo, tales como G542X, W1282X y Q70X, NB127 presentaba una actividad similar o superior a la de G418, y además que en todos los ensayos *in vitro* realizados hasta la fecha, se considera que G418 es el inductor de ultralectura más potente. La observación de que NB127 puede superar la actividad de G418, aunque puede presentar una toxicidad celular mucho menor que la de G418 (véase la Tabla 2) demuestra los beneficios proporcionados por los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

Los datos de actividad *in vitro* observados están apoyados adicionalmente por los ensayos de actividad comparativa *ex vivo* que se muestran en las Figuras 8-10.

50 Las Figuras 8A-D presentan representaciones comparativas de resultados de ensayos de supresión de mutación del codón de finalización prematuro *ex vivo* realizados para la construcción *CFTR-G542X* (Figura 8A y 8C), *CFTR-W1282X* (Figura 8B y 8D) producidos por NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), NB127 (marcado con triángulos de color negro), NB128 (marcado con triángulos vacíos), NB74 (ejemplo de referencia; marcado con rombos vacíos) NB84 (ejemplo de referencia; marcado con rumbos de color negro) y los fármacos de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos).

60 Las Figuras 9A-E presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *ex vivo* inducidos por NB124 (marcado con círculos de color negro), NB125 (marcado con círculos vacíos), NB74 (ejemplo de referencia; marcado con rumbos de color negro) y los fármacos de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 9A, R245X (USH1) en la Figura 9B, Q70X (HS) en la Figura 9C, W1282X (CF) en la Figura 9D y G542X (CF) en la Figura 9E.

65

Las Figuras 10A-E presentan los resultados del ensayo de ultralectura del codón de finalización que muestran gráficos comparativos de niveles de supresión del codón de finalización *ex vivo* inducidos por NB127 (marcado con rectángulos de color negro), NB128 (marcado con triángulos vacíos), NB84 (ejemplo de referencia; marcado con rumbos de color negro) y los fármacos de control gentamicina (marcado con rectángulos de color negro) y G418 (marcado con rectángulos vacíos) en una serie de construcciones en el contexto de mutación sin sentido que representan diversas enfermedades genéticas (entre paréntesis), en las que los resultados que pertenecen a la construcción de R3X (USH1) se muestran en la Figura 10A, R245X (USH1) en la Figura 10B, Q70X (HS) en la Figura 10C, W1282X (CF) en la Figura 10D y G542X (CF) en la Figura 10E.

Como se puede observar en las Figuras 8-10, en todas las mutaciones sometidas a ensayo, la eficacia observada de la ultralectura inducida por aminoglucósidos se encontraba en el orden de NB124 > NB125 > NB74 > gentamicina y NB127 ≥ NB128 > NB84 > gentamicina. Estas tendencias son similares a las observadas para la supresión de las mismas mutaciones de terminación *in vitro* (véase, Figuras 5-7), incluso aunque el espacio de la diferencia de potencia entre NB127 y NB128 era menor que el observado para la supresión de las mismas mutaciones en extractos sin células *in vitro*.

**EJEMPLO 3**

**TOXICIDAD CELULAR con respecto a ULTRALECTURA**

Para asegurar la viabilidad celular para cada uno de los compuestos sometidos al ensayo a las concentraciones sometidas a ensayo, la toxicidad celular se evaluó para cada compuesto midiendo el valor semimáximo de la concentración letal (valores de CL<sub>50</sub>) en células HEK-293 y HFF (fibroblastos de prepucio humano).

Los porcentajes de viabilidad celular se calcularon como la proporción entre los índices de células vivas en cultivos que crecen en presencia de los compuestos sometidos a ensayo, con respecto a cultivos que crecen con el protocolo idéntico pero sin el compuesto sometido a ensayo. Los resultados representan promedios de al menos tres experimentos independientes.

Las Figuras 11A-D presentan representaciones semilogarítmicas de inhibición de la traducción *in vitro* en sistemas procariotas (marcado con círculos de color negro) y eucariotas (marcado con círculos vacíos) medido para NB118 (Figura 11A), NB119 (Figura 11B), NB122 (Figura 11C) y NB123 (Figura 11D).

Las Figuras 12A-D presentan representaciones semilogarítmicas de los porcentajes de viabilidad celular *ex vivo* con respecto a concentración del compuesto sometido a ensayo en células HEK-293 (Figura 12A y Figura 12C) y en células de fibroblastos de prepucio humano (HFF) (Figura 12B y Figura 12D), para gentamicina (marcado con rectángulos vacíos), NB118 (marcado con círculos vacíos), NB119 (marcado con círculos de color negro), NB122 (marcado con triángulos vacíos), y NB123 (marcado con triángulo de color negro).

Los valores de la concentración letal semimáxima (CL<sub>50</sub>) se obtuvieron a partir del ajuste de las curvas de concentración-respuesta con respecto a los datos de al menos tres experimentos independientes, usando el software GraFit 5.

La inhibición de la traducción en procariotas y eucariotas se cuantificó en ensayos de transcripción/traducción acoplados usando detección de luciferasa activa, realizados como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Los valores de MIC se determinaron usando el método de doble microdilución, con dos concentraciones de partida diferentes de cada compuesto sometido a ensayo (384 µg/ml y 6.144 µg/ml). Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se obtuvieron resultados análogos en tres experimentos diferentes. En todos los ensayos biológicos, todos los aminoglucósidos sometidos a ensayo se encontraban en sus formas de sal de sulfato. Las concentraciones informadas se refieren a las de la forma de la amina libre de cada aminoglucósido.

La Tabla 1 presenta ensayos comparativos de toxicidad celular, inhibición de traducción en eucariotas y procariotas, y actividad antibacteriana obtenidos para gentamicina, paromomicina, los ejemplos de referencia NB30 y NB54 mencionados anteriormente, y los compuestos NB118, NB119, NB122 y NB123 a modo de ejemplo.

*Tabla 1*

Actividad antibacteriana MIC (µM)		Inhibición de la traducción		Toxicidad celular CL <sub>50</sub> (mM)		Aminoglucósido
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>E. coli</i> R477/100	Sistema procariota CL <sub>50</sub> (nM)	Sistema procariota CL <sub>50</sub> (µM)	HFF	HEK-293	
< 0,75	6	28 ± 4	62 ± 9	3,2 ± 0,3	2,5 ± 0,3	Gentamicina
1,2	22	51 ± 5	57 ± 4	3,1 ± 0,4	4,1 ± 0,5	Paromomicina

Actividad antibacteriana MIC ( $\mu\text{M}$ )		Inhibición de la traducción		Toxicidad celular $\text{CL}_{50}$ (mM)		Aminoglucósido
<i>B. subtilis</i> ATCC66 33	<i>E. coli</i> R477/100	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ (nM)	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	HFF	HEK-293	
100	790	460 $\pm$ 50	31 $\pm$ 4	21,8 $\pm$ 0,9	21,4 $\pm$ 3,9	NB30
70	588	160 $\pm$ 20	24 $\pm$ 1	7,8 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,6	NB54
83	2659	1960 $\pm$ 20 6	16 $\pm$ 1,3	21,8 $\pm$ 0,5	23,5 $\pm$ 0,6	NB118
78	4989	2132 $\pm$ 47 8	28 $\pm$ 1,1	20,1 $\pm$ 0,6	19,8 $\pm$ 0,4	NB119
33	1067	2266 $\pm$ 19 6	5,2 $\pm$ 0,7	8,1 $\pm$ 1,4	10,1 $\pm$ 0,8	NB122
33	1057	811 $\pm$ 59	4,6 $\pm$ 0,6	19,3 $\pm$ 1,5	13,9 $\pm$ 1,3	NB123

La comparación de datos de toxicidad celular observados en la Tabla 1 con los datos de actividad de ultralectura en las Figuras 2-4, demuestra que la instalación del grupo (S)-5"-metilo sobre cualquiera de NB30 para dar NB118, o sobre NB54 para dar NB122, no influye de forma significativa en los valores de citotoxicidad  $\text{CL}_{50}$  de 21,4 y 23,5 mM para NB30 y NB118 respectivamente, y 6,1 y 10,1 mM para NB54 y NB122 respectivamente, respectivamente en HEK-293), mientras que aumenta en gran medida la actividad de supresión del codón de finalización observada (NB30 < NB118 y NB54 < NB122). La toxicidad celular similar observada en el caso de NB122 y NB54 en células HEK-293 y HFF (véase, Tabla 1), junto con una actividad de supresión sustancialmente elevada de NB122 con respecto a la de NB54 tanto *in vitro* como *ex vivo* en células cultivadas, indican que NB122 puede representar una elección más superior que NB54 en terapia de supresión.

Los datos comparativos de supresión *ex vivo* en la Figura 4 muestran solamente una pequeña preferencia de NB122 con respecto a los de NB123, mientras que los datos de toxicidad celular en la Tabla 1 indican un perfil de toxicidad celular de pequeño (células HEK-293) a significativamente mejor (células HFF) de NB123 con respecto al de NB122. Por lo tanto, se puede argumentar que el rendimiento *in vivo* del diastereómero NB123 podría ser incluso mejor que el de NB122. Además, un estudio muy recientes sobre la gentamicina demostraba que la inversión de una configuración absoluta en un átomo de carbono individual, del C<sub>2</sub> de la (S)-6'-gentamicina al C<sub>2</sub> de la (R)-6'-gentamicina, reduce de forma significativa la toxicidad celular y la nefrotoxicidad aparente del diastereómero (R) en comparación con la del diastereómero (S), tal como se determina en estudios de cultivo celular y en animales, aunque la eficacia bactericida no se ve afectada.

Basándose en estas observaciones, es evidente que los ensayos de toxicidad adicionales, incluyendo nefrotoxicidad y ototoxicidad, los inconvenientes principales de los aminoglucósidos conocidos, pueden resolver esta cuestión de forma satisfactoria y validar el beneficio observado de cualquiera de NB122 o NB123, con respecto al de NB54 y con respecto al de la gentamicina.

El impacto del grupo (S)-5"-metilo en las actividades de ultralectura elevadas de NB118 y NB122 se ve soportado adicionalmente por los datos de inhibición de la traducción en eucariotas observados (véase, Tabla 1). La eficacia con la que NB122 (valor de concentración inhibitoria semimáxima  $\text{Cl}_{50}$  = 5,2  $\mu\text{M}$ ) inhibe la traducción en eucariotas es superior a la de NB118 ( $\text{Cl}_{50}$  = 16,0  $\mu\text{M}$ ) y NB54 ( $\text{Cl}_{50}$  = 24,0  $\mu\text{M}$ ), una tendencia similar a la observada para la actividad de ultralectura, en particular NB122 > NB118 > NB54 (véase, Figuras 2-4). Además, la comparación de los valores de  $\text{Cl}_{50}$  de NB118 y NB122 con respecto a los de sus estructuras precursoras NB30 y NB54 (valores de  $\text{Cl}_{50}$  de 31 y 24  $\mu\text{M}$ , respectivamente), desvela que NB118 y NB122 son 1,9 veces y 4,6 veces más específicos para el ribosoma eucariota que sus precursores NB30 y NB54, lo que indica que el impacto observado del grupo (S)-5"-metilo en las actividades de ultralectura elevadas de NB118 y NB122 está asociado con su aumento de la especificidad con respecto al ribosoma eucariota.

La Tabla 2 presenta resultados comparativos de ensayos de toxicidad celular, inhibición de la traducción en eucariotas y procariotas, y actividad antibacteriana obtenidos para gentamicina, G418, los compuestos NB74 y NB84 informados anteriormente, y los compuestos a modo de ejemplo NB124, NB125, NB127 y NB128.

Tabla 2

Actividad antibacteriana MIC ( $\mu\text{M}$ )		Inhibición de la traducción		Toxicidad celular $\text{CL}_{50}$ (mM)		Aminoglucósido
<i>B. subtilis</i> ATCC66 33	<i>E. coli</i> R477/100	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ (nM)	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	HFF	HEK-293	
< 0,75	6	0,028 $\pm$ 0,004	62 $\pm$ 9	3,21 $\pm$ 0,31	2,65 $\pm$ 0,54	Gentamicina

Actividad antibacteriana MIC ( $\mu\text{M}$ )		Inhibición de la traducción		Toxicidad celular $\text{CL}_{50}$ (mM)		Aminoglucósido
<i>B. subtilis</i> ATCC66 33	<i>E. coli</i> R477/100	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ (nM)	Sistema procariota $\text{Cl}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	HFF	HEK-293	
< 1,25	9	0,009 $\pm$ 0,002	2 $\pm$ 0,3	1,59 $\pm$ 0,14	1,31 $\pm$ 0,06	G418
42	680	1,130 $\pm$ 0,120	17 $\pm$ 0,6	21,34 $\pm$ 1,72	22,17 $\pm$ 1,06	NB74
70	556	0,980 $\pm$ 0,070	2,8 $\pm$ 0,3	16,33 $\pm$ 0,47	5,77 $\pm$ 0,68	NB84
96	768	1,102 $\pm$ 0,185	1,49 $\pm$ 0,08	4,75 $\pm$ 0,33	5,40 $\pm$ 0,45	NB124
96	1536	1,862 $\pm$ 0,173	7,96 $\pm$ 0,27	7,59 $\pm$ 0,18	16,54 $\pm$ 3,10	NB125
192	384	1,753 $\pm$ 0,274	0,73 $\pm$ 0,07	6,48 $\pm$ 0,26	5,09 $\pm$ 0,27	NB127
96	384	1,752 $\pm$ 0,145	0,89 $\pm$ 0,07	2,78 $\pm$ 0,11	5,35 $\pm$ 0,31	NB128

Como se puede observar en la Tabla 2, la comparación de datos de toxicidad celular observados en la Tabla 2 con los datos de actividad de ultralectura presentados en las Figuras 8-10, demuestra que los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, tales como NB124, NB125, NB127 y NB128 presentan aproximadamente el mismo nivel de toxicidad celular en comparación con los compuestos desvelados previamente, con la excepción de la citotoxicidad de NB128 en fibroblastos de prepucio humano (HFF).

Además, al igual que los compuestos desvelados previamente, los nuevos compuestos NB124, NB125, NB127 y NB128 no presentan una actividad antibacteriana significativa tanto en *E. coli* como en *B. subtilis* (véase, Tabla 2 mencionada anteriormente). Estos datos están apoyados adicionalmente por su inhibición radicalmente reducida de síntesis de proteínas procariotas (Tabla 2) en comparación con los antibióticos aminoglucosídicos convencionales y por lo tanto están de acuerdo con una tendencia general de que los aminoglucósidos con una reducción de la inhibición de la traducción en procariotas también es menos citotoxicidad debido probablemente a una reducción de la inhibición de la síntesis de proteínas mitocondriales.

#### EJEMPLO 4

##### ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Los resultados de ensayos de actividad antimicrobiana obtenidos para algunos compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con realizaciones de la presente invención se presentan en las Tablas 1 y 2 presentadas anteriormente en el presente documento.

Previamente se ha mostrado que los compuestos tales como NB30, NB54, NB74 y NB84 (ejemplos de referencia) son inhibidores de la traducción en procariota as aproximadamente 10 veces más débiles que la gentamicina y la paromomicina, y además casi no presentan actividad bactericida frente a bacterias tanto Gram-negativa como Gram-positivas. Los presentes experimentos determinan si los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, tales como NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128, retienen propiedades similares.

Por lo tanto, los compuestos a modo de ejemplo NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128 se investigaron como agentes antibacterianos frente a bacterias tanto Gram-negativa (*Escherichia coli*) como Gram-positivas (*Bacillus subtilis*), junto con sus actividades anti-traducción en procariotas (véase, Tabla 1 y Tabla 2).

Como se puede observar en la Tabla 1 y Tabla 2, los valores de  $\text{Cl}_{50}$  medidos muestran que la eficacia con la que los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, inhiben el ribosoma procariota es significativamente menor que el de paromomicina y gentamicina, de acuerdo con los datos antibacterianos observados de este conjunto de compuestos; mientras que la gentamicina y la paromomicina presentan actividades anti bacterianas significativas frente a *E. coli* y *B. subtilis*, y los compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención carecen de actividad anti bacteriana considerable.

Los datos observados con NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128 son similares a los observados para los ejemplos de referencia NB30, NB54, NB74 y NB84 y además apoyan la correlación informada previamente en aminoglucósidos entre la actividad anti-traducción en procariotas y los valores de MIC, en particular, una disminución de la inhibición de la traducción en procariotas of está asociada con la disminución de la actividad antibacteriana.

Además, la incapacidad continua observada de los ejemplos de referencia NB30, NB54, NB74 y NB84, así como de NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128, para mostrar una actividad antibacterianos significativa en conjunto con su disminución de la especificidad en el ribosoma procariota, sugieren que mediante la reducción de la especificidad con respecto al ribosoma procariota, y de ese modo alejando su actividad antibacterianos, su acción sobre la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales eucariotas Se puede reducir, y de ese modo reducir de forma significativa sus efectos tóxicos en los seres humanos. Esta visión está apoyada por el hecho de que la maquinaria de síntesis de proteínas mitocondriales de mamífero es muy similar a la maquinaria procariota y a que la toxicidad inducida por aminoglucósidos puede, al menos en parte, estar conectada con la disfunción mediada por fármacos del ribosoma mitocondrial.

El aumento significativo observado de la actividad anti-traducción en eucariotas (que realmente solo mide la Inhibición de la síntesis de proteínas citoplasmáticas y no la de la síntesis de proteínas mitocondriales) junto con la reducción significativa de la citotoxicidad de los compuestos NB118, NB119, NB122, NB123, NB124, NB125, NB127 y NB128 (en comparación con la de gentamicina y paromomicina) apoya adicionalmente esta opinión.

**EJEMPLO 5**

**SELECTIVIDAD EN EUCARIOTAS con respecto a PROCARIOTAS**

Como se ha discutido anteriormente en el presente documento, para constituir un candidato a fármaco que merezca la pena que se pueda usar para tratar enfermedades genéticas causadas por mutaciones prematuras del codón de finalización, un aminoglucósido no debería ser tóxico e interactuar con ribosoma citoplasmáticos eucariotas. La cualidad de la no toxicidad se puede verificar por la falta de actividad antimicrobiana, lo que significa que el fármaco inhibirá la traducción procariota en menor medida y por lo tanto probablemente no inhibirá la traducción mitocondrial. La presencia de esta combinación beneficiosa de cualidades deseadas en un aminoglucósido tal como los compuestos presentados en el presente documento se puede demostrar mediante una actividad selectiva en eucariotas con respecto a procariotas.

También se puede decir que una selectividad notable de un compuesto aminoglucosídico hacia la inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la inhibición de la traducción en procariotas se puede usar para predecir su eficacia y seguridad como candidato a fármaco para tratar trastornos genéticos asociados con mutaciones prematuras del codón de finalización.

La Tabla 3 combina y compara los resultados obtenidos para una serie de aminoglucósidos conocidos a modo de ejemplo y los aminoglucósidos a modo de ejemplo desvelados en la actualidad en ensayos de inhibición de la traducción realizados con sistemas ribosómicos eucariotas y procariotas. Cada compuesto también se indica por el tipo de punto de farmacóforo que presenta el compuesto de los cinco puntos de farmacóforo presentados en el Esquema 1 presentado anteriormente en el presente documento. En la Tabla 3, los puntos de farmacóforo se indican con "i" para el grupo hidroxilo en la posición 6'; "ii" para el grupo AHB en la posición N1; "iii" para el tercer resto sacárido "Anillo III"; "iv" para un metilo en la posición 6'; y "v" para el metilo en la posición 5".

Tabla 3

Puntos de farmacóforo					Inhibición de la traducción			Selectividad en Procariotas con respecto a Eucariotas
					Aminoglucósido	Cl <sub>50</sub> <sup>Euc</sup> (µM)	Cl <sub>50</sub> <sup>Pro</sup> (µM)	
i	ii	iii	iv	v				
		X	X		Gentamicina	62 ± 9	0,028 ± 0,004	2,214
X		X			Paromomicina	57 ± 4	0,051 ± 0,005	1,118
X		X	X		G418	2,0 ± 0,3	0,009 ± 0,002	225
X		X			NB30	31 ± 4	0,46 ± 0,05	68
	X	X			NB54	24 ± 1	0,16 ± 0,02	151
X		X	X		NB74	17 ± 0,6	1,130 ± 0,120	15
X	X	X	X		NB84	2,8 ± 0,3	0,980 ± 0,070	2,9
		X		X	NB118	15,5 ± 1,3	1,960 ± 0,206	7,9
		X		X	NB119	28 ± 1,1	2,132 ± 0,478	13
	X	X		X	NB122	5,2 ± 0,7	2,266 ± 0,196	2,3
	X	X		X	NB123	4,6 ± 0,6	0,811 ± 0,059	5,7
X		X	X	X	NB124	1,49 ± 0,08	1,102 ± 0,185	1,3

Puntos de farmacóforo					Aminoglucósido	Inhibición de la traducción		Selectividad en Procariotas con respecto a Eucariotas
						$CI_{50}^{Euc}$ ( $\mu M$ )	$CI_{50}^{Pro}$ ( $\mu M$ )	$CI_{50}^{Euc}/CI_{50}^{Pro}$
i	ii	iii	iv	v				
X		X	X	X	NB125	$7,96 \pm 0,27$	$1,862 \pm 0,173$	4,3
X	X	X	X	X	NB127	$0,73 \pm 0,07$	$1,753 \pm 0,274$	0,4
X	X	X	X	X	NB128	$0,89 \pm 0,07$	$1,752 \pm 0,145$	0,5

En todos los experimentos biológicos realizados, todos los aminoglucósidos sometidos a ensayo se encontraban en sus formas de sal de sulfato. Los grupos que se presentan en la Tabla 3 se refieren a la forma de la amina libre de cada aminoglucósido. La inhibición de la traducción en procariotas y eucariotas se cuantificó en ensayos de transcripción/traducción acoplados tal como se ha descrito anteriormente. Los valores de la concentración semimáxima ( $CI_{50}$ ) se obtuvieron a partir del ajuste de las curvas de respuesta a la concentración con respecto a los datos de al menos tres experimentos independientes, usando el software GraFit 5. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y se obtuvieron resultados análogos en tres experimentos diferentes.

- 5 Como se puede observar en la Tabla 3, se observa una disminución notable en la proporción  $CI_{50}^{Euc}/CI_{50}^{Pro}$  (inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la inhibición de la traducción en procariotas), disminuyendo desde un valor promedio de aproximadamente 115 (promedio de la proporción de los ejemplos de referencia NB30, NB54, NB74 y NB84), con respecto a un valor promedio de aproximadamente 7 (promedio de la relación de NB118, NB119, NB122 y NB123) para añadir el punto "v" del farmacóforo desvelado en la actualidad, con respecto a un valor promedio de aproximadamente 1,6 (promedio de la proporción de NB124, NB125, NB127 y NB128) para añadir el punto "v" del farmacóforo desvelado en la actualidad y el punto "iv" del farmacóforo desvelado anteriormente.

En la Tabla 3 se puede observar claramente que los compuestos aminoglucosídicos a modo de ejemplo, de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, que presentan los cinco puntos de farmacóforos, independientemente de la configuración estereoquímica en la posición 5", también presentan los puntos de selectividad en eucariotas con respecto a procariotas más elevados, es particular estos compuestos se clasifican en un lugar destacado en el listado de posibles candidatos a fármaco para el tratamiento de trastornos genéticos en seres humanos.

De hecho, aunque se preparan y someten a ensayo los compuestos a modo de ejemplo, NB124, NB125, NB127 y NB128, se ha encontrado que el aumento de la inhibición de la síntesis de proteína citoplásmica procariota las asociado con un aumento de la actividad de ultralectura. Los datos en la Tabla 3 muestran que el desarrollo sistemático de un farmacóforo integral podría aumentar de forma gradual la especificidad de los compuestos recientemente desarrollados para el ribosoma citoplasmático y disminuir su especificidad para el ribosoma procariota, hasta NB127 y NB128 en los que los se implementan los cinco puntos del farmacóforo, presentan una selectividad inversa para los sistemas de traducción en eucariotas con respecto a procariotas (ribosomas).

En el presente documento se indican dos observaciones:

1) aunque los antibióticos aminoglucosídicos convencionales tales como gentamicina y paromomicina son 2,214 veces y 1,118 veces más selectivos para el ribosoma procariota con respecto al eucariota, esta selectividad en G418 se reduce a solo 225 veces, debido a su inhibición de la traducción en eucariotas comparativamente mayor. Esta fuerte inhibición ( $CI_{50}^{Euc} = 2 \mu M$ ) de la traducción en eucariotas se consideró una razón principal de la citotoxicidad radicalmente elevada de G418, así como la razón principal de su actividad de ultralectura muy potente. Los resultados presentados en la Tabla 3 sugieren que aunque la inhibición de la traducción en eucariotas elevada es de hecho compatible con su fuerte actividad de ultralectura, la inhibición de la traducción en eucariotas no es el único suceso tóxico de G418 sino que el otro u otros efectos de G418 en células eucariotas están correlacionados con su toxicidad.

De acuerdo con los datos presentados en la Tabla 3, varios compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, exhiben una potencia de inhibición similar o mayor de la traducción en eucariotas, incluyendo NB124, NB127 y NB128, mientras que son significativamente menos citotóxicos que G418.

2) al representar los valores de  $CI_{50}^{Euc}$  frente a la actividad de ultralectura *in vitro* de todos los aminoglucósidos convencionales y sometidos a ensayo, se observó una estrecha correlación entre estos dos parámetros, es decir, un aumento de la inhibición está asociado con un aumento de la actividad de ultralectura, como se ilustra en la Figura 13A-B).

Las Figuras 13A-B presentan representaciones en diagramas de dispersión para identificar la posible correlación entre actividad de ultralectura e inhibición de la traducción de proteínas *in vitro* en sistemas eucariotas como se observa para una serie de compuestos conocidos y compuestos a modo de ejemplo de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, en los que el aumento de la inhibición de la síntesis de proteínas (valores

más bajos de  $CI_{50}$ ) está asociado con el aumento de la actividad de ultralectura, mientras que la Figura 13A es una representación semilogarítmica de la inhibición de la traducción en eucariotas con respecto a la actividad de ultralectura *in vitro* a una concentración de 1,4  $\mu$ M de los aminoglucósidos sometidos a ensayo (se muestra en el eje X) usando seis mutaciones sin sentido diferentes (*W1282X*, *Q70X*, *R3X*, *R245X*, *G542X* y *R3381X*) y la Figura 1B es una representación lineal de los mismos datos presentados en la FIG 13A.

Se observa que dado que la actividad de ultralectura es dependiente de la dosis y que también se ve afectada por diversos factores, incluyendo la identidad del codón de finalización, la cuarta base en la secuencia cadena abajo desde la competencia de finalización y la de la secuencia hasta aproximadamente el codón de finalización, los datos presentados en la Figura 13 se recogieron mientras se usaba una concentración (1,4  $\mu$ M) en la que todos los compuestos se sometieron a ensayo y series de diferentes construcciones diferentes de 4 modelos de enfermedad diferentes. Por lo tanto, el aumento de la especificidad y la selectividad con respecto al ribosoma procarionota conduce a un aumento posterior de la actividad biológica deseada del compuesto y con una toxicidad reducida.

Otra observación realizada por los presentes inventores implica un compuesto informado previamente, ejemplo de referencia NB33, que es esencialmente un dímero de paromamina en el que dos restos de paromamina están conectados en oxígenos en la posición 3' a través de puente de metileno. NB33 es altamente específico para el ribosoma eucariota e inhibe la síntesis de proteínas con un valor de  $CI_{50}^{Euc}$  de 1,1 mM, casi dos veces tanto como G418 ( $CI_{50}^{Euc}$  de 2,0 mM). Sin embargo, NB33 casi no tiene actividad de ultralectura, lo que indica que su mecanismo de inhibición es diferente al de los aminoglucósidos conocidos y los compuestos de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, que presentan actividad de ultralectura. Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que un simple aumento de la potencia de inhibición del aminoglucósido no necesariamente va acompañado de una mayor actividad de ultralectura. Una correlación de este tipo se debería tener en cuenta para los compuestos aminoglucosídicos que inhiben el proceso de traducción con un mismo mecanismo, en particular la fidelidad del proceso de corrección de errores. De hecho, un estudio reciente sobre la interacción de NB33 con el modelo de oligonucleótido de ARNr de sitio A humano demostró que NB33 se une y estabiliza el sitio A en una conformación no descodificante y, como tal, bloquea la etapa de translocación de ribosomas.

Aunque la invención se ha descrito en conjunto con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia. Por consiguiente, se pretende incluir todas las alternativas, modificaciones y variaciones de este tipo que entren dentro del espíritu y amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Technion Research & Development Foundation Ltd.  
 Baasov, Timor  
 Atia-Glikin, Dana  
 Kandasamy, Jeyakumar  
 Belakhov, Valery

<120> AMINOGLUCÓSIDOS Y USOS DE LOS MISMOS PARA TRATAR TRASTORNOS GENÉTICOS

<130> 51817

<150> US 61/414,956  
 <151> 18-11-2010

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1  
 gatcccagaa gatgtttcga cagttttatc tctggacaga gct 43

<210> 2  
 <211> 33  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 5  
 <400> 2  
 ctgtcagaga taaaactgtc gaaacatctt ctg 33  
 <210> 3  
 <211> 43  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 15  
 <400> 3  
 gatcccagaa gatgtttga cagttttatc tctggacaga gct 43  
 20  
 <210> 4  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 30  
 <400> 4  
 ctgtcagaga taaaactgtc aaaacatctt ctg 33  
 35  
 <210> 5  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 5  
 gatccaaaat ctgaatgaga ggcgaaccac caccaccacc ctcgagct 48  
 45  
 <210> 6  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 6  
 cgaggggtgt ggtggtgtt gcctctcat tcagatttg 40  
 55  
 <210> 7  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 7  
 gatccaaaat ctgaatgaga ggtgaaccac caccaccacc ctcgagct 48  
 65  
 <210> 8  
 <211> 40  
 <212> ADN

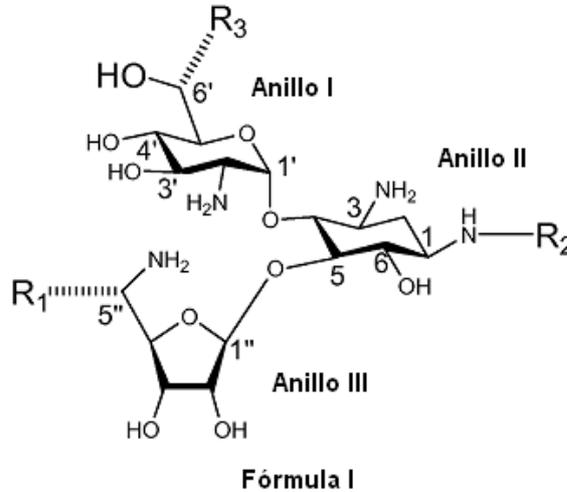
<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 5  
 <400> 8  
 cgagggtggt ggtggtggt cacctctcat tcagatttg 40  
 <210> 9  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 15  
 <400> 9  
 tcgaccaata tagtcttgg agaaggtgga atcgagct 38  
 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 25  
 <400> 10  
 cgattccacc ttctcgaaga actatattgg 30  
 <210> 11  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 35  
 <400> 11  
 tcgaccaata tagtcttgg agaaggtgga atcgagct 38  
 <210> 12  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 45  
 <400> 12  
 cgattccacc ttctcaaaga actatattgg 30  
 <210> 13  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 55  
 <400> 13  
 tcgacaact tgcaacagtg gaggaaagcc tttgagct 38  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 5  
 <400> 14  
 caaaggcttt cctccactgt tgcaaagtg 30  
 <210> 15  
 10 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 15  
 tcgacaactt tgcaacagtg aaggaaagcc tttgagct 38  
 20 <210> 16  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 16  
 30 caaaggcttt cctcactgt tgcaaagtg 30  
 <210> 17  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 17  
 40 tcgacaaaaa acaaatttg cacaaaagg tatgagct 38  
 <210> 18  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 50 <400> 18  
 catacctttt ggtgcaaaat ttgttttg 30  
 <210> 19  
 <211> 38  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 60 <400> 19  
 tcgacaaaaa acaaatttg aacaaaagg tatgagct 38  
 <210> 20  
 65 <211> 30  
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 5  
 <400> 20  
 cataacctttt ggttcaaaat ttgttttttg 30  
 <210> 21  
 10 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 21  
 tcgaccctca gctgggacca gcagctcaac ctcgagct 38  
 20 <210> 22  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 22  
 30 cgaggttgag ctgctgttcc cagctgagg 29  
 <210> 23  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 <400> 23  
 40 tcgaccctca gctgggacta gcagctcaac ctcgagct 38  
 <210> 24  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 45 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario  
 50 <400> 24  
 cgaggttgag ctgctagtcc cagctgagg 29

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula general I:



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que:

10  $R_1$  es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;  
 $R_2$  es hidrógeno o (S)-4-amino-2-hidroxibutirilo (AHB);  
 $R_3$  se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono; y una configuración estereoquímica de cada una de la posición 6' y la posición 5'' es independientemente una configuración R o una configuración S.

15

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que  $R_1$  es dicho alquilo.

3. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que  $R_2$  y  $R_3$  son cada uno hidrógeno.

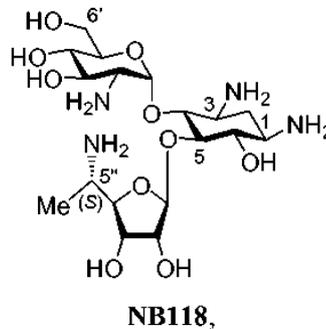
20 4. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que  $R_2$  es AHB y  $R_3$  es hidrógeno.

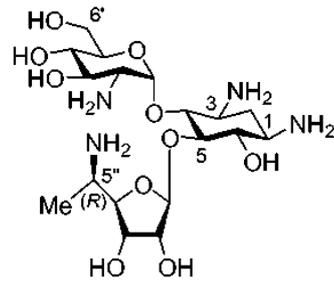
5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que  $R_2$  es hidrógeno y  $R_3$  es dicho alquilo.

6. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que  $R_2$  es AHB y  $R_3$  es dicho alquilo.

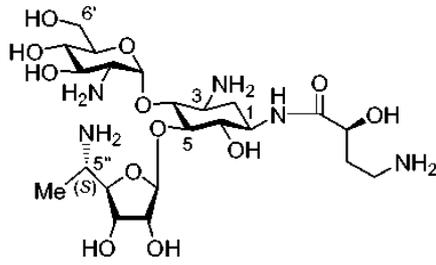
25

7. El compuesto de la reivindicación 1, que se selecciona entre el grupo que consiste en:

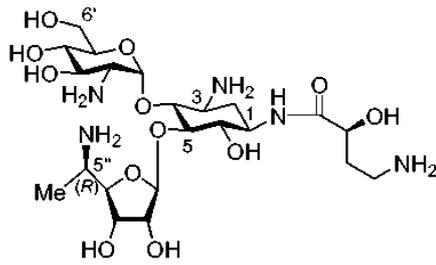




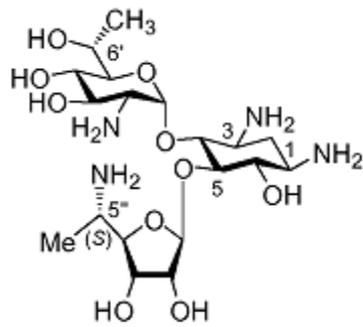
**NB119,**



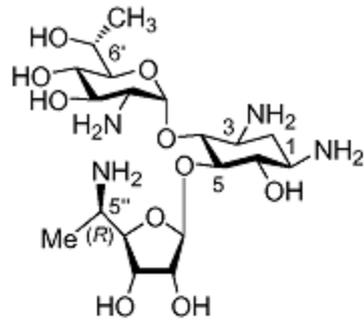
**NB122,**



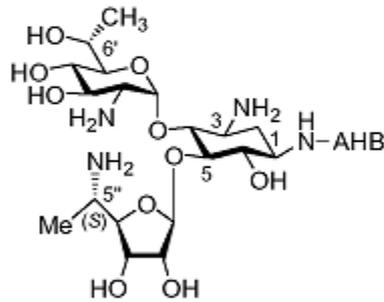
**NB123,**



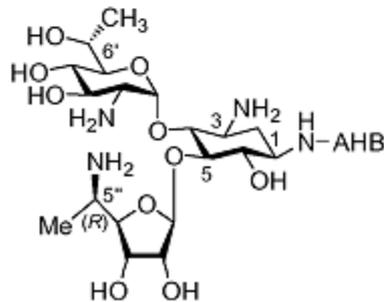
**NB124,**



**NB125,**



**NB127, y**



**NB128.**

8. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por una proporción de inhibición de traducción  $CI_{50}$  en eucariotas con respecto a inhibición de traducción  $CI_{50}$  en procariontas inferior a 15.

9. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por una MIC en bacterias Gram-negativas superior a 200  $\mu$ M y una MIC en bacterias Gram-positivas superior a 20  $\mu$ M.

10. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que se envasa en un material de envasado y que se identifica de forma impresa, en o sobre dicho material de envasado, para uso en el tratamiento de un trastorno genético.

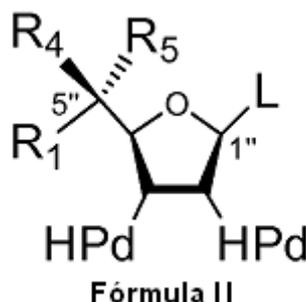
12. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para uso en el tratamiento de un trastorno genético.

13. La composición o compuesto para uso de la reivindicación 11 o 12, en las que dicho trastorno genético está asociado a una mutación prematura del codón de finalización y/o a un fenotipo de truncamiento de proteína.

14. La composición o compuesto para uso de cualquiera de las reivindicaciones 11-13, en las que dicho trastorno genético se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis quística (CF), distrofia muscular de Duchenne (DMD), ataxia-telangiectasia, síndrome de Hurler, hemofilia A, hemofilia B, síndrome de Usher y Tay-Sachs.

5 15. Un proceso para preparar el compuesto de la reivindicación 1, proceso que comprende:

(a) proporcionar un compuesto dador que tiene la Fórmula general II:



10 en la que:

R<sub>1</sub> es un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;

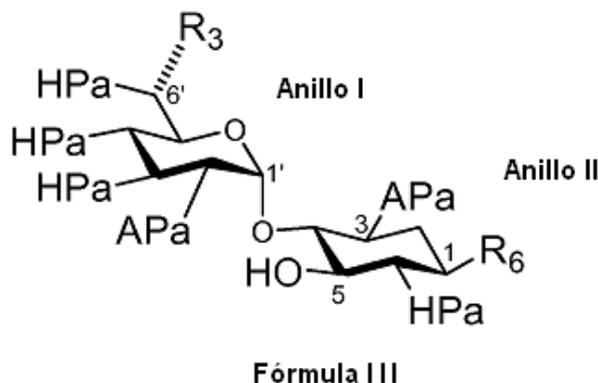
R<sub>4</sub> es hidrógeno o un grupo protector de amino dador;

15 R<sub>5</sub> es un grupo protector de amino dador si R<sub>4</sub> es hidrógeno o hidrógeno si R<sub>4</sub> es un grupo protector de amino dador;

cada uno de HPd es un grupo protector de hidroxilo dador; y

L es un grupo saliente;

20 (b) acoplar dicho compuesto dador con un compuesto aceptor que tiene la fórmula general III



25 en la que:

la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;

R<sub>3</sub> se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno y un alquilo que tiene 1-4 átomos de carbono;

R<sub>6</sub> es un grupo protector de amino aceptor o (*S*)-4-azido-2-*O*-acetil-1-butilo;

30 HPa es un grupo protector de hidroxilo aceptor; y

APa es un grupo protector de amino aceptor; y

(c) retirar cada uno de dicho grupo protector de amino y dicho grupo protector de hidroxilo, obteniendo de ese modo el compuesto.

FIG. 1

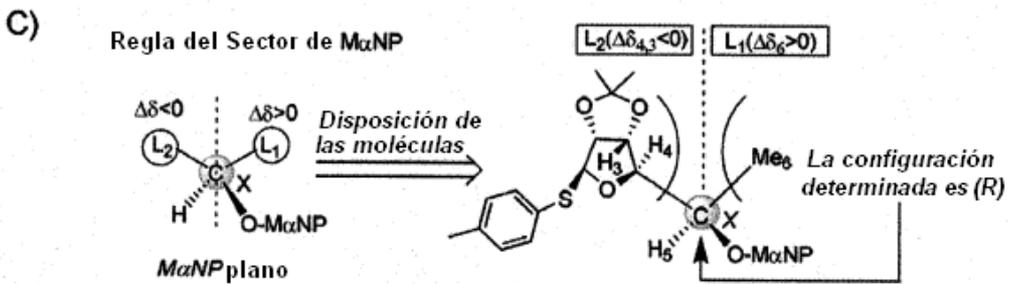
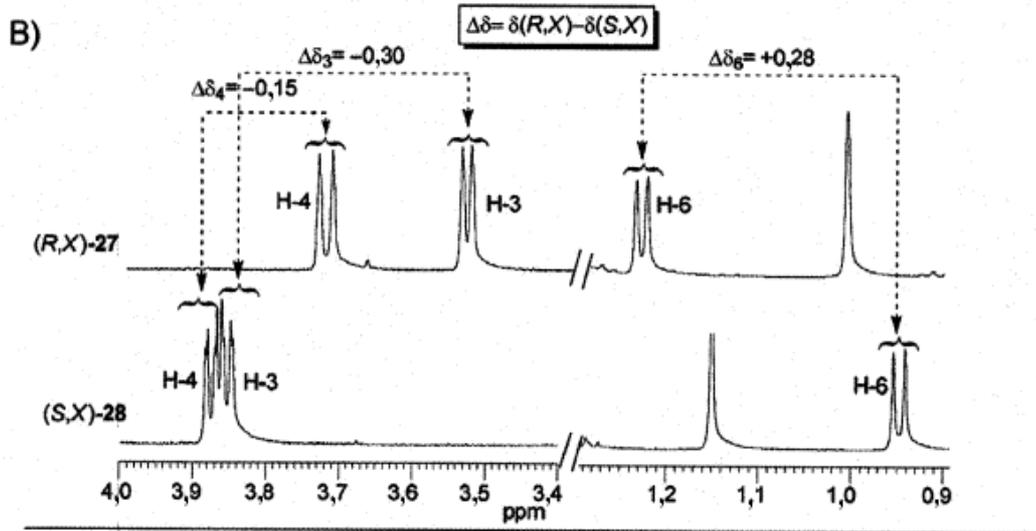
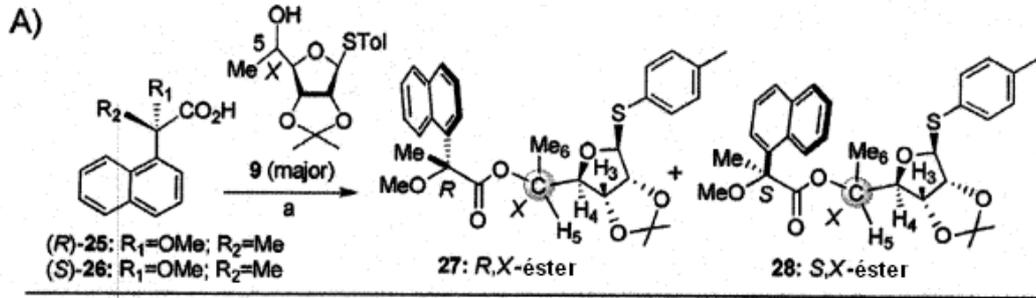


FIG. 2

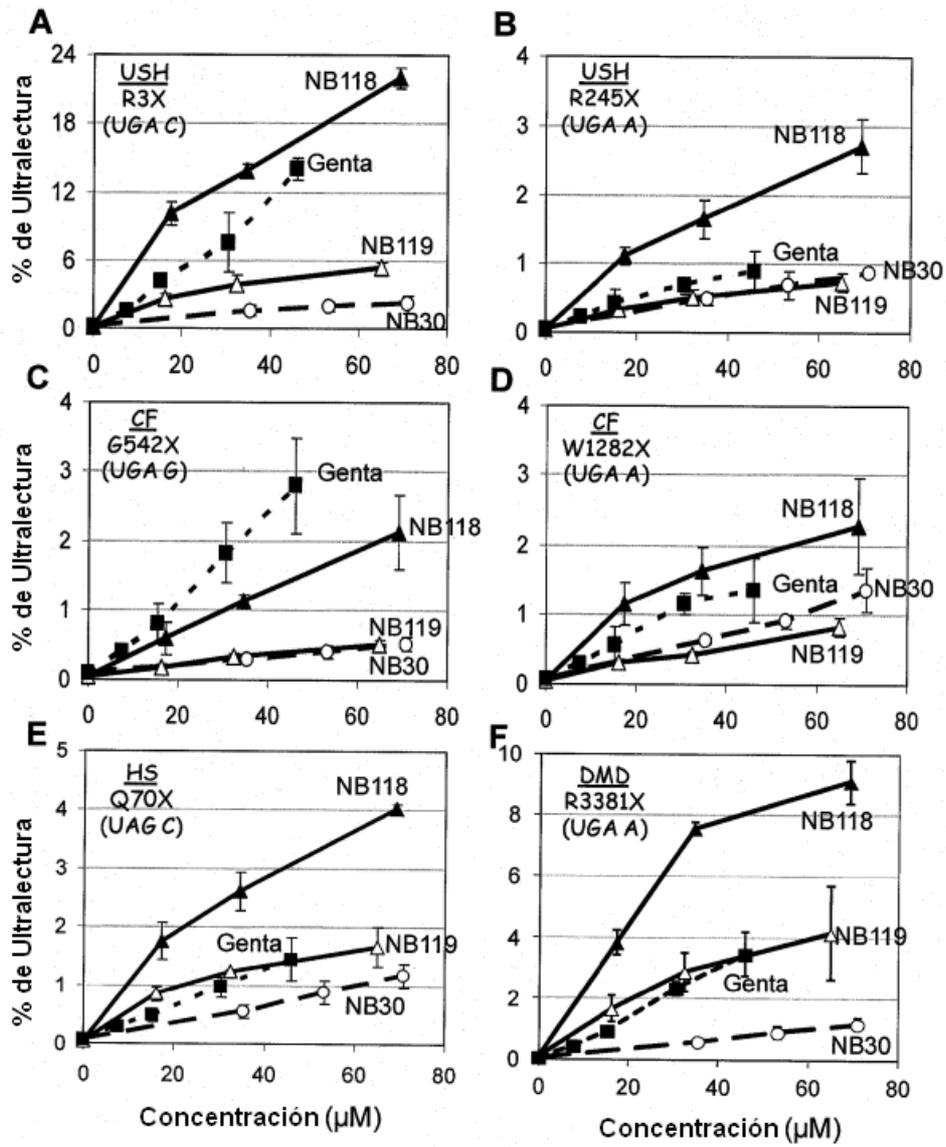


FIG. 3

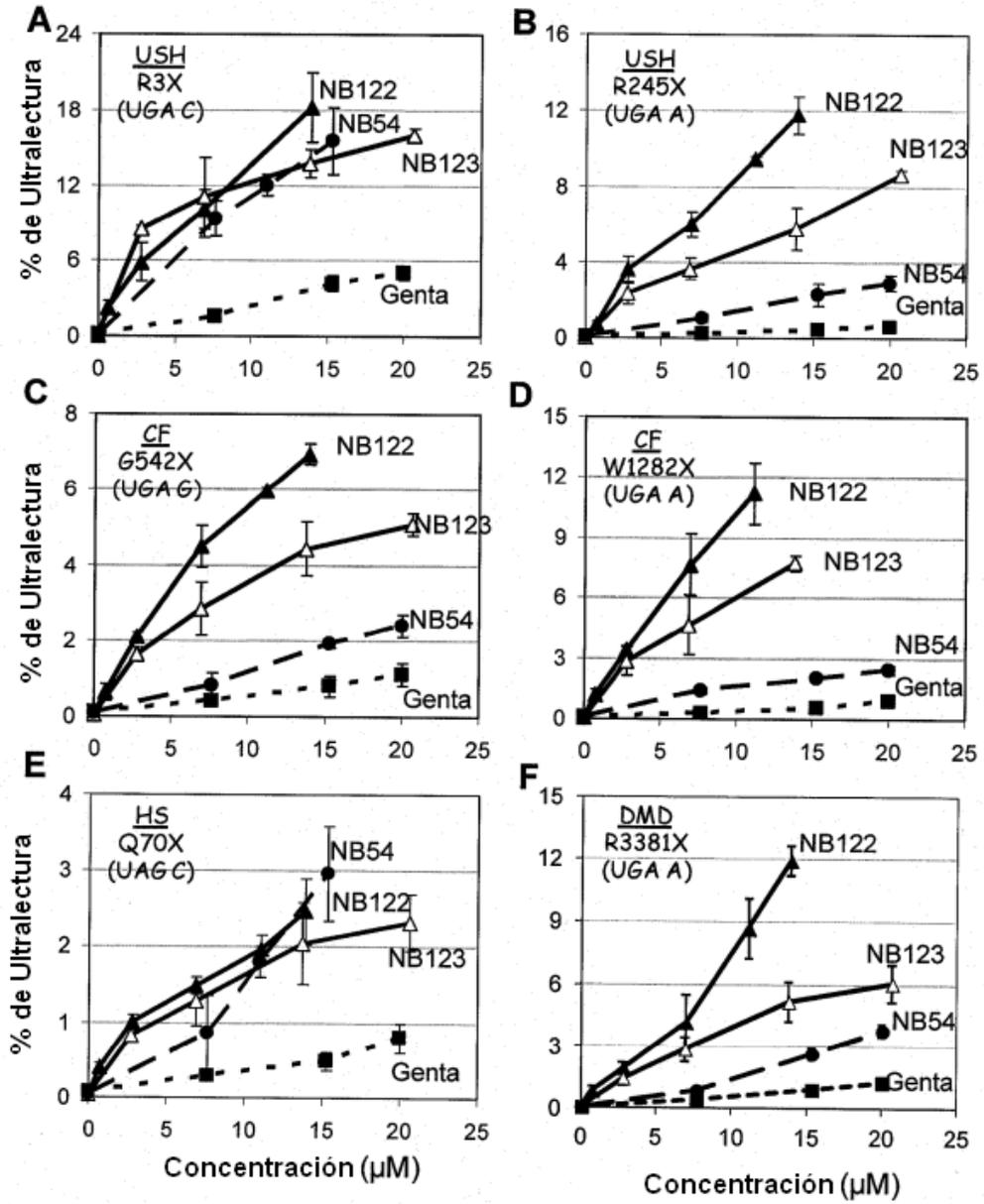


FIG. 4

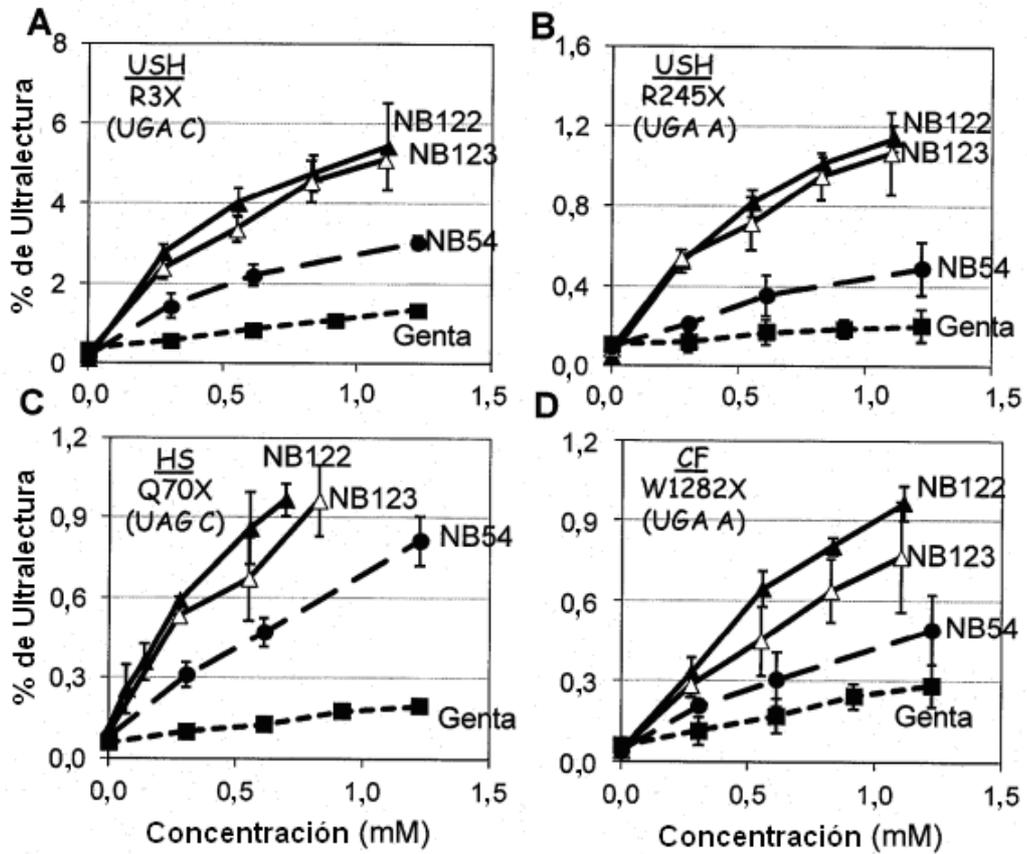


FIG. 5

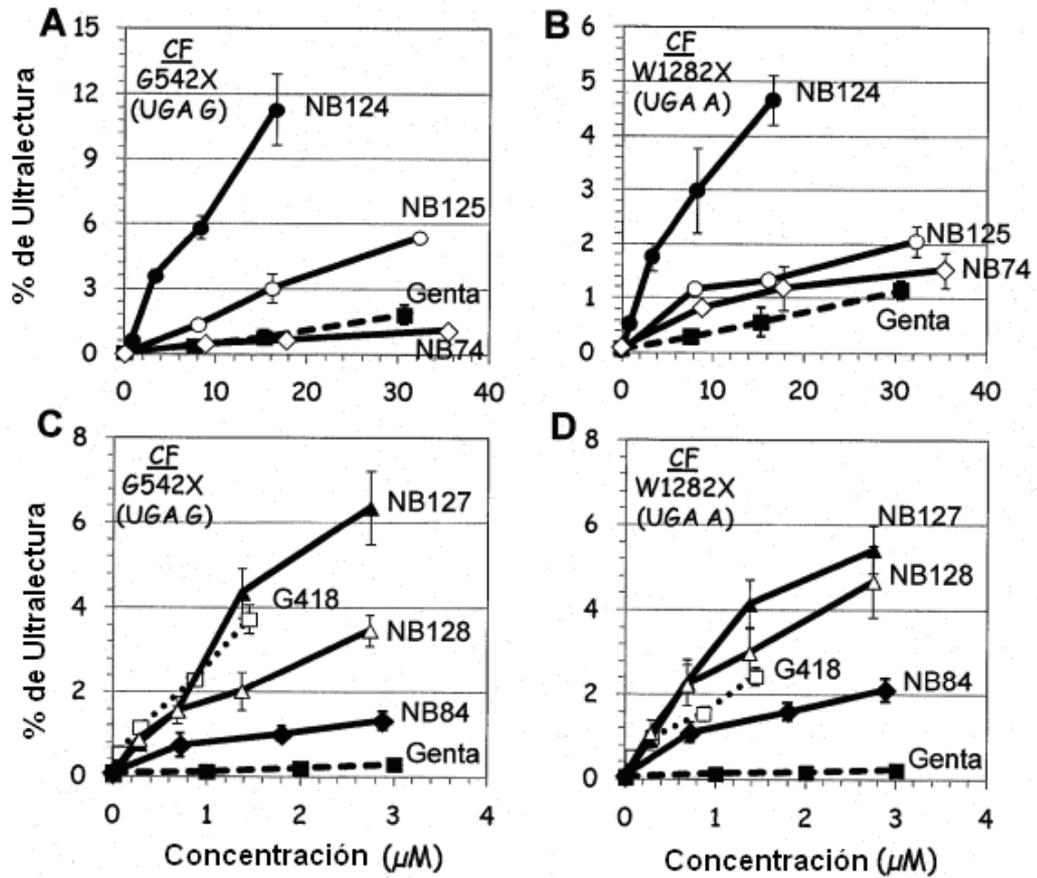


FIG. 6

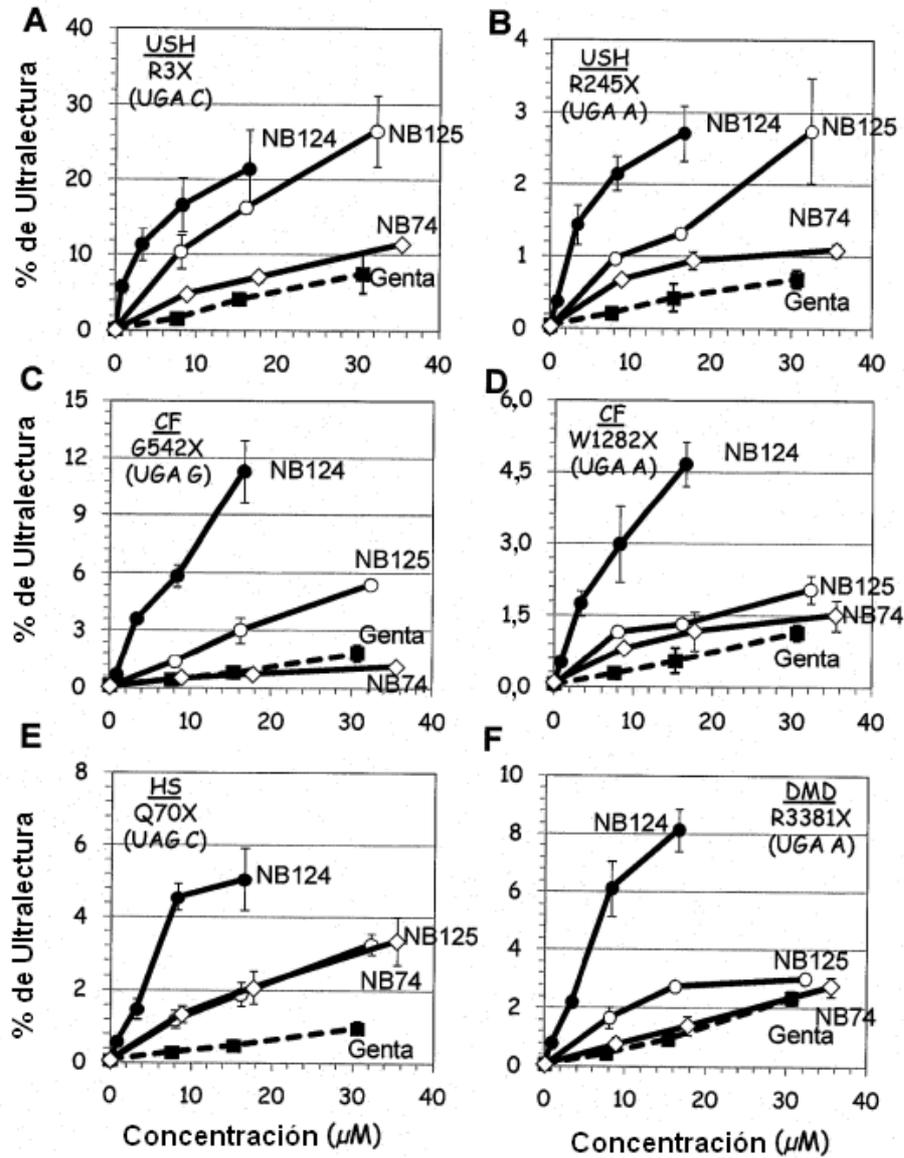


FIG. 7

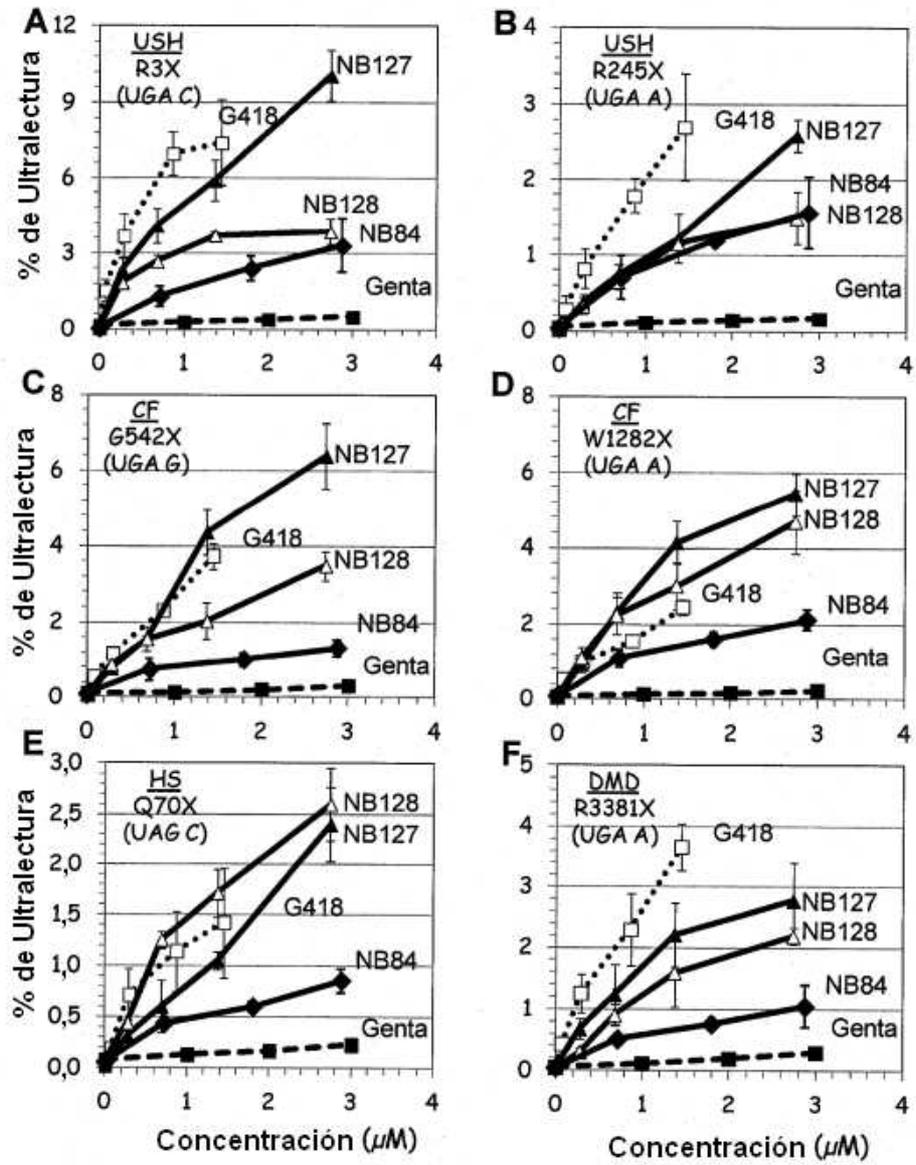


FIG. 8

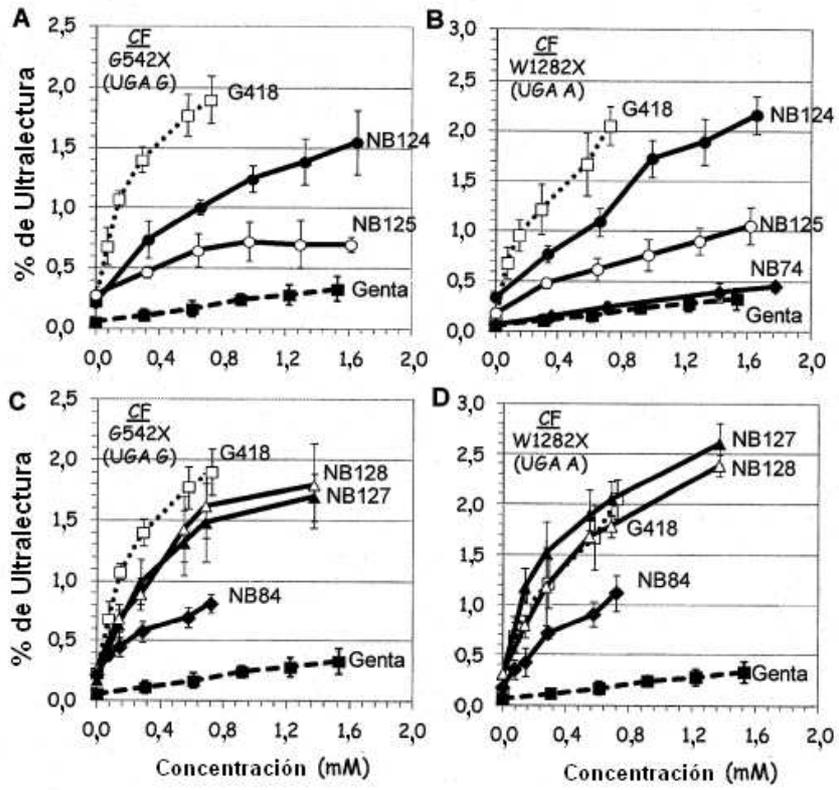


FIG. 9

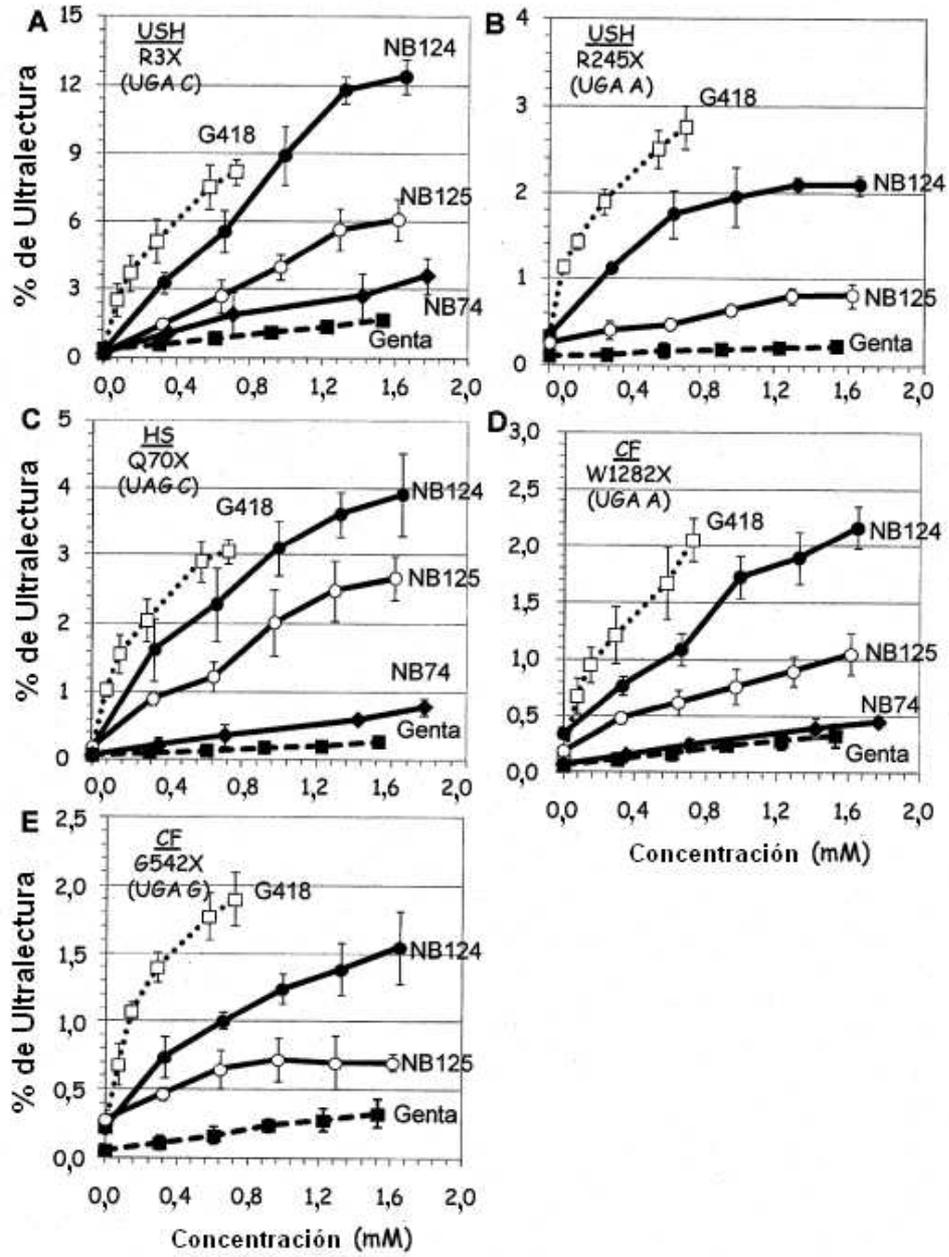


FIG. 10

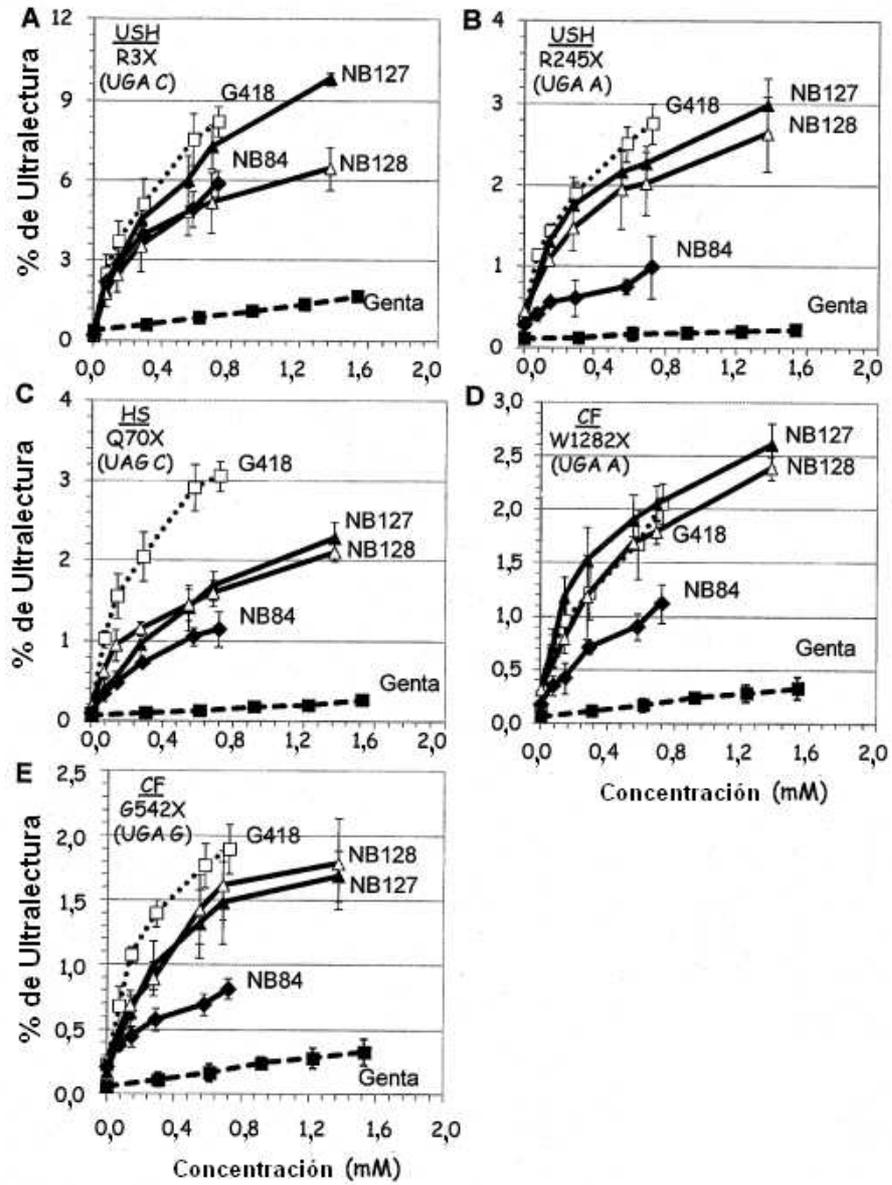


FIG. 11

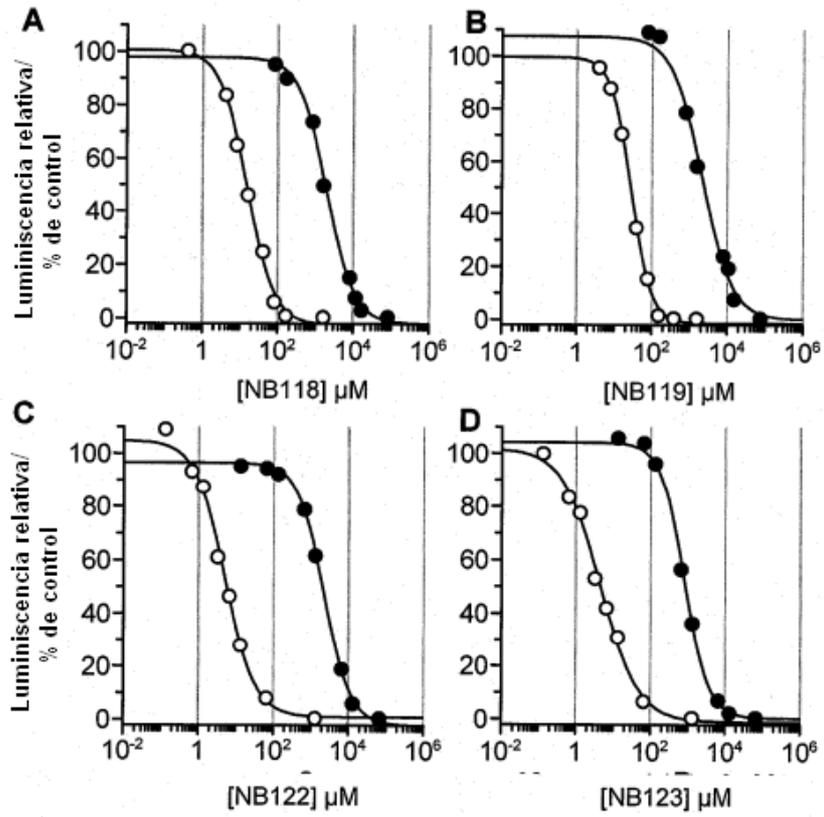


FIG. 12

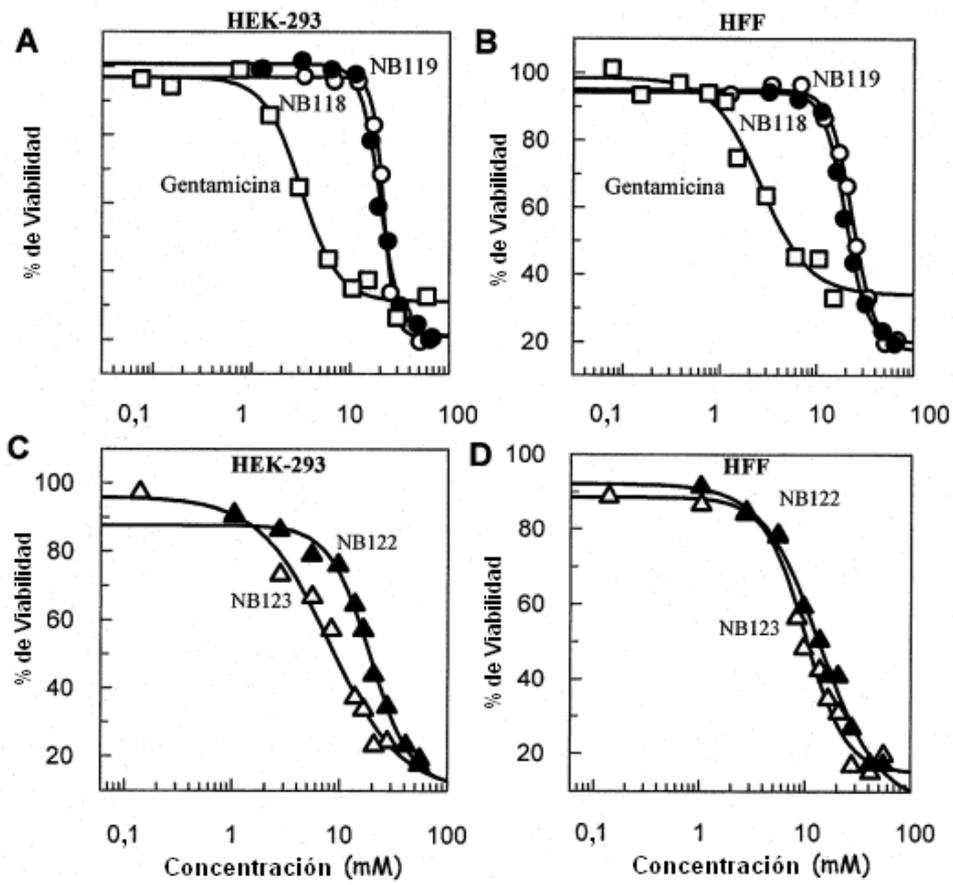


FIG. 13

A

