

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 539**

51 Int. Cl.:

C07H 5/06 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.04.2007 PCT/IL2007/000463**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2007 WO07113841**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.04.2007 E 07736203 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2007783**

54 Título: **Aminoglucósidos novedosos y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos genéticos**

30 Prioridad:

03.04.2006 US 788070 P

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

14.11.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BAASOV, TIMOR;
BEN-YOSEF, TAMAR;
NUDELMAN, IGOR;
REBIBO-SABBAH, ANNIE;
SHALLOM-SHEZIFI, DALIA y
HAINRICHSON, MARIANA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 689 539 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 novedosos y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos genéticos

5 Campo y antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos para su uso en el tratamiento de trastornos genéticos.

10 Muchos trastornos genéticos humanos son el resultado de mutaciones sin sentido, en las que uno de los tres codones de parada (UAA, UAG o UGA) reemplaza a un codón que codifica aminoácidos, conduciendo a la terminación prematura de la traducción y, finalmente, a proteínas inactivas truncadas. Actualmente, se conocen cientos de mutaciones sin sentido de este tipo y se demostró que varias explican ciertos casos de enfermedades mortales, incluyendo la fibrosis quística (FQ), la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la ataxia-telangiectasia, el
15 síndrome de Hurler, la hemofilia A, la hemofilia B, Tay-Sachs y más [1, 2]. Para muchas de estas enfermedades no existe actualmente un tratamiento eficaz y aunque la terapia génica parece una solución posible potencial para los trastornos genéticos, todavía hay muchas dificultades importantes que deben resolverse antes de que esta técnica podría utilizarse en los seres humanos.

20 Durante los últimos años, se ha demostrado que los aminoglucósidos pueden tener valor terapéutico en el tratamiento de varias enfermedades genéticas debido a su capacidad para inducir que los ribosomas lean más allá de las mutaciones de los codones de parada, generando proteínas de longitud completa a partir de parte de las moléculas de ARNm [3-6].

25 Los aminoglucósidos son antibióticos muy potentes de amplio espectro que se usan habitualmente para el tratamiento de infecciones potencialmente mortales [7, 8]. Los antibióticos aminoglucósidos de 2-desoxiestreptamina (2-DOS), que se muestran en la Figura 1 de los antecedentes de la técnica [9], se dirigen selectivamente al ribosoma procarionta, y, al unirse al sitio A de descodificación del ARN ribosómico 16S, conducen a la inhibición de la traducción de proteínas y a la interferencia con la fidelidad de la traducción [7, 10-12]. Uno de los aminoglucósidos más estudiadas es la paromomicina (su sal de sulfato es conocida con su marca comercial Humatin), que es un fármaco antimicrobiano utilizado contra la amebiasis intestinal. Fue aprobado por la Drug Controller General de la India como un agente contra la leishmaniasis visceral (kala azar) en la India y se le concedió la categoría de "fármaco huérfano" en 2005 en los EE.UU. La paromomicina es conocida por inhibir la síntesis de proteínas mediante la unión al ARN ribosómico de la subunidad 16S.

35 Varios logros en la determinación de la estructura del ribosoma bacteriano [13-17], junto con la estructura cristalina y de RMN de los modelos de oligonucleótidos del sitio A bacteriano [18-22], han proporcionado información útil para la comprensión del mecanismo de descodificación en las células procariontas y la comprensión de cómo los aminoglucósidos ejercen su lectura errónea perjudicial del código genético. Durante la descodificación, una etapa crítica en la selección del aminoacil-ARNt se basa en la formación de una mini-hélice entre el codón del ARNm y el anti-codón del aminoacil-ARNt afín. En este proceso, la conformación del sitio A cambia de un estado "apagado", en la que las dos adeninas conservadas A1492 y A1493 están dobladas hacia atrás dentro de la hélice, a un estado "encendido", en la que A1492 y A1493 están dadas la vuelta hacia fuera del sitio A e interactúan con la mini-hélice del codón-anticodón afín [11, 15]. Este cambio conformacional es un interruptor molecular que decide sobre la
45 continuación de la traducción de una forma irreversible. La unión de los aminoglucósidos tales como la paromomicina y la gentamicina al sitio A bacteriano estabiliza la conformación "encendida" incluso en ausencia de complejo ARNt-ARNm afín. Por tanto, la afinidad del sitio A por un complejo ARNm-ARNt no afín aumenta tras la unión a aminoglucósidos, impidiendo que el ribosoma discrimine eficientemente entre los complejos afines y no afines.

50 La terminación de la síntesis de proteínas se señala por la presencia de un codón de parada en el ARNm y está mediada por proteínas de factor de liberación. La eficiencia de la terminación de la traducción es por lo general muy alta y en células intactas la incorporación errónea de un aminoácido en un codón de parada (supresión) normalmente se produce a una baja frecuencia de aproximadamente 10^{-4} . Se cree que la potenciación de la supresión de la terminación de los aminoglucósidos en eucariotas se produce por un mecanismo similar a la actividad de los aminoglucósidos para interferir con la fidelidad de la traducción durante la síntesis de proteínas, es decir, la unión de ciertos aminoglucósidos al sitio A ribosómico probablemente induce cambios conformacionales que estabilizan complejos ARNm-ARNt casi afines, en lugar de insertar el factor de liberación. Los aminoglucósidos suprimen los diversos codones de parada, en particular, con diferentes eficiencias (UGA > UAG > UAA), y la eficacia de la supresión depende adicionalmente de la identidad del cuarto nucleótido inmediatamente corriente abajo del codón de parada (C > T > A ≥ G), así como el contexto de secuencia local alrededor del codón de parada [6, 23].

El hecho de que los aminoglucósidos puedan suprimir mutaciones sin sentido prematuras en células de mamífero se demostró por primera vez por Burke y Mogg en 1985, quienes también observaron el potencial terapéutico de estos fármacos en el tratamiento de trastornos genéticos [3]. La primera enfermedad genética examinada fue la fibrosis quística (FQ), el trastorno autosómico recesivo más prevalente en la población caucásica, que afecta a 1 de cada
65

2500 recién nacidos. La FQ es causada por mutaciones en la proteína reguladora de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR, del inglés *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Actualmente, se han identificado más de 1000 mutaciones causantes de FQ diferentes en el gen CFTR y el 5-10 % de las mutaciones son codones de parada prematura. En los judíos Ashkenazi, la mutación W1282X y otras mutaciones sin sentido representan el 64 % de todos los alelos mutantes CFTR [5].

Los primeros experimentos de supresión mediada por aminoglucósidos de mutaciones de parada CFTR demostraron que las mutaciones de parada prematura encontradas en el gen CFTR podrían ser suprimidas por G-418 y gentamicina (véase, la Figura 1 de los antecedentes de la técnica), tal como se mide por la aparición de CFTR funcional de longitud completa en estirpes celulares de epitelio bronquial [24, 25]. Los experimentos de supresión de tejidos intestinales de ratones mutantes transgénicos CFTR -/- que llevaban un transgén CFTR-G542X humano mostraron que el tratamiento con gentamicina, y en menor medida tobramicina, ha dado como resultado la aparición de la proteína CFTR humana en las glándulas de ratones tratados [26]. Más importante aún, los estudios clínicos que utilizaron ensayos cruzados doble ciego, controlados con placebo y han demostrado que la gentamicina puede suprimir mutaciones de parada en los pacientes afectados y que el tratamiento con gentamicina mejoró la conductancia transmembrana través de la mucosa nasal en un grupo de 19 pacientes que llevaban mutaciones de parada CFTR [27]. Otros trastornos genéticos para los que el potencial terapéutico de los aminoglucósidos se ensayó en modelos *in vitro*, cultivos de estirpes celulares o modelos animales incluyen la DMD [28], el síndrome de Hurler [29], la diabetes insípida nefrogénica [30], la cistinosis nefropática [31], la retinitis pigmentosa [32] y la ataxia-telangiectasia [33].

Sin embargo, una de las principales limitaciones en el uso de los aminoglucósidos como productos farmacéuticos es su alta toxicidad para los mamíferos, que normalmente se expresa en los riñones (nefrotoxicidad) y en enfermedades asociadas a los oídos (ototoxicidad). Se supone que el origen de esta toxicidad es resultado de una combinación de diferentes factores y mecanismos tales como las interacciones con fosfolípidos, la inhibición de las fosfolipasas y la formación de radicales libres [34, 35]. Aunque se consideran selectivos para los ribosomas bacterianos, la mayoría de los aminoglucósidos también se unen al sitio A eucariota pero con afinidades más bajas que para el sitio A bacteriano [36]. La inhibición de la traducción en células de mamífero es también una de las posibles causas de la alta toxicidad de estos agentes. Otro factor que contribuye a su citotoxicidad es su unión al sitio A del ARNr 12S mitocondrial, cuya secuencia es muy similar al sitio A bacteriano [37].

Muchos estudios han intentado entender y ofrecer formas de aliviar la toxicidad asociada a los aminoglucósidos [38], incluyendo el uso de antioxidantes para reducir los niveles de radicales libres [39, 40], así como el uso de poli-L-aspartato [41, 42] y daptomicina [43, 44] para reducir la capacidad de los aminoglucósidos para interactuar con los fosfolípidos. Recientemente se ha demostrado el papel de la megalina (un receptor endocítico de múltiples ligandos que es especialmente abundante en los túbulos proximales del riñón y en el oído interno) en la captación de aminoglucósidos [35]. La administración de agonistas que compiten por la unión de aminoglucósidos a la megalina también dio como resultado una reducción en la captación y la toxicidad de los aminoglucósidos [45]. Además, la alteración de la pauta de administración y/o la manera en que se administran los aminoglucósidos se ha investigado como medio para reducir la toxicidad [46, 47].

A pesar de los grandes esfuerzos para reducir la toxicidad de los aminoglucósidos, pocos resultados han madurado en prácticas y procedimientos clínicos convencionales para la administración de aminoglucósidos para suprimir mutaciones de parada, aparte de los cambios en la pauta de administración. Por ejemplo, el uso de dosis sub-tóxicas de gentamicina en los ensayos clínicos probablemente provocó la eficiencia de ultralectura reducida obtenida en los experimentos *in vivo* en comparación con los sistemas *in vitro* [48]. El aminoglucósido geneticina[®] (sulfato de G-418, véase, la Figura 1 de los antecedentes de la técnica) mostró la mejor actividad de supresión de la terminación en los sistemas de traducción-transcripción *in vitro* [6], sin embargo, su uso como agente terapéutico no es posible debido a que es letal incluso a concentraciones muy bajas. Por ejemplo, la DL₅₀ de G-418 contra células de fibroblastos humanos es de 0,04 mg/ml, en comparación con 2,5-5,0 mg/ml para la gentamicina, neomicina y kanamicina [49].

La sensibilidad aumentada de los ribosomas eucariotas para algunos fármacos aminoglucósidos, tales como G-418 y gentamicina, es interesante, pero hasta la fecha no se ha podido explicar racionalmente debido a la falta de suficientes datos estructurales de su interacción con ribosomas eucariotas. Puesto que G-418 es extremadamente tóxico incluso en concentraciones muy bajas, en la actualidad la gentamicina es el único aminoglucósido ensayado en diversos modelos animales y ensayos clínicos. Aunque algunos estudios han demostrado que debido a su toxicidad relativamente baja en células cultivadas, la amikacina [50] y la paromomicina [51] pueden representar alternativas a la gentamicina para la terapia de supresión de mutaciones de parada, no se notificado de ningún ensayo clínico con estos aminoglucósidos todavía.

Hasta la fecha, casi todos los experimentos de supresión se han realizado con aminoglucósidos clínicos disponibles en el mercado [6] y no se ha hecho ningún esfuerzo para optimizar su actividad como inductores de la ultralectura más allá de los codones de parada. Actualmente, solo un número limitado de aminoglucósidos, incluyendo la gentamicina, la amikacina y la tobramicina, están en uso clínico como antibióticos para la administración interna en seres humanos. Entre ellos, la tobramicina no tiene actividad de supresión de mutaciones de parada y la

gentamicina es el único aminoglucósido ensayado para determinar la actividad de supresión de mutaciones de parada en modelos animales y ensayos clínicos. Recientemente, se demostró que un conjunto de derivados de neamina promueve la ultralectura de la proteína SMN en fibroblastos derivados de enfermos de atrofia muscular espinal (AME); 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 de [52].

La solicitud de patente de Estados Unidos n.º 11/073.649, del presente cesionario, que se incorpora por referencia como si se expusiera en su totalidad en el presente documento, muestra una familia de aminoglucósidos, que tienen características estructurales comunes de la cadena principal que permiten que estos aminoglucósidos sean antibióticos muy potentes y eficaces, mientras que reducen o bloquean la resistencia a antibióticos hacia los mismos. Los derivados de aminoglucósidos que se muestran en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/073.649, se presentan como antibióticos eficaces contra infecciones bacterianas tales como el ántrax y también como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos genéticos, tales como la fibrosis quística.

Más específicamente, los compuestos que se enseñan en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/073.649 se diseñaron basándose en antibióticos aminoglucósidos conocidos que ejercen su actividad antibacteriana reconociendo y uniéndose selectivamente al sitio A de decodificación en la subunidad 16S del ARNr bacteriano. Por tanto, estos compuestos son análogos semisintéticos de aminoglucósidos disponibles en la actualidad, en los que una posición predeterminada del aminoglucósido se ha modificado con el fin de potenciar el reconocimiento del enlace fosfodiéster del ARNr y en paralelo los grupos Asp/Glu y Asn/Gln del sitio activo del factor letal (FL) y por tanto presentan un rendimiento antibacteriano potenciado. Estas modificaciones proporcionan adicionalmente los compuestos con resistencia a la catálisis enzimática y mejoran de este modo su biodisponibilidad y, por tanto, el rendimiento antibacteriano. Además, el impedimento estérico introducido en las estructuras diseñadas a través de la modificación química del aminoglucósido, convierte a estos compuestos en sustratos inferiores para la enzima que provoca resistencia más ampliamente representada, APH(3')-IIIa, impidiendo de este modo el desarrollo de resistencia a los mismos.

El diseño y la actividad bifuncional de estas estructuras también se describe por Mariana Hainrichson et al, en *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 13 (2005) 5797-5807.

Se demostró adicionalmente que los compuestos mostrados en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/073 649 bloquean un codón de parada prematura y, por tanto, son eficaces en el tratamiento de trastornos genéticos. Sin embargo, como se detalla a continuación en el presente documento, la actividad antibacteriana potenciada de estos compuestos puede ser indeseable cuando se usan para el tratamiento de trastornos genéticos. Se han propuesto y preparado otros aminoglucósidos modificados y antibióticos relacionados estructuralmente [53-61], sin embargo, la actividad terapéutica de la ultralectura más allá del codón de parada de los mismos no se ha descrito ni sugerido ni ensayado.

Las características deseadas de un fármaco de ultralectura eficaz serían la administración oral y poco o ningún efecto sobre bacterias. La actividad antimicrobiana del fármaco de ultralectura no es deseable al igual que cualquier uso innecesario de antibióticos, en particular con respecto a la biota gastrointestinal (GI), debido a los efectos secundarios provocados por la alteración del equilibrio de la biota GI y la aparición de resistencia. A este respecto, además de las limitaciones mencionadas anteriormente, la mayoría de los aminoglucósidos clínicos son selectivos en gran medida contra los ribosomas bacterianos y no ejercen ningún efecto significativo sobre los ribosomas citoplasmáticos de las células humanas.

En un esfuerzo por sortear las limitaciones anteriormente mencionadas, la compañía biofarmacéutica PTC Therapeutics (NY, EE.UU.) actualmente está intentando descubrir nuevos fármacos de supresión de mutaciones de parada mediante la exploración de grandes bibliotecas químicas para detectar la actividad de ultralectura sin sentido. Usando este enfoque, se descubrió un nuevo compuesto no aminoglucósido, PTC124 [62]. Aunque la estructura química exacta de este fármaco no se publicó hasta ahora, los hechos de que no tiene actividad antibacteriana y que no se ha notificado ninguna toxicidad, sugieren que su mecanismo de acción en el ribosoma es diferente que el de los aminoglucósidos. La FDA ha concedido las designaciones de evaluación rápida y de medicamento huérfano a PTC 124 para el tratamiento tanto de la FQ como de la DMD provocadas por mutaciones sin sentido y los resultados preliminares de los ensayos clínicos de fase II en los pacientes con FQ y DMD parecen prometedores [63].

J. F. Burke y A. E. Mogg, *Nucleic Acids Research* 1985, vol. 13, pages 6265-6272 informaron sobre la supresión de una mutación sin sentido en células de mamífero *in vivo* mediante los antibióticos aminoglucósidos G-418 y paromomicina

En resumen, los datos colectivos presentados anteriormente indican que la búsqueda sistemática de nuevos derivados de aminoglucósidos con actividad de supresión de la mutación de terminación mejorada, baja toxicidad para las células de mamíferos y poca o ninguna actividad antimicrobiana están obligados a aprovechar la vía de investigación de derivados de aminoglucósidos hasta el punto en que pueden utilizarse clínicamente.

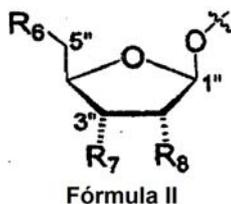
Existe por tanto una necesidad ampliamente reconocida, y sería altamente ventajoso tener, compuestos derivados de aminoglucósidos útiles en el tratamiento de enfermedades genéticas, desprovistos de las limitaciones anteriores.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos derivados de paromomicina, para su uso en el tratamiento de enfermedades genéticas, tales como la fibrosis quística, presentando una alta actividad de ultralectura de mutaciones de codones de parada prematura mientras que ejercen una baja toxicidad en células de mamífero y la baja actividad antimicrobiana.
- 10 De este modo, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un compuesto que tiene una Fórmula general II como se define en las reivindicaciones adjuntas, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.
- 15 También se desvela una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- También se desvela la composición farmacéutica envasada en un material de envasado e identificada con la impresión dentro o sobre el material de envasado, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.
- 20 También se desvela la composición farmacéutica formulada para la administración oral.
- También se desvela un método de tratamiento de un trastorno genético, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que tiene una Fórmula general I.
- 25 De acuerdo con características adicionales en las realizaciones preferidas de la invención que se describe a continuación, el compuesto se administra por vía oral.
- De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un uso de un compuesto que tiene una Fórmula general I en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno genético.
- 30 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención que se describe a continuación, el trastorno genético comprende una proteína que tiene una mutación de truncamiento.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas el trastorno genético se selecciona entre el grupo que consiste en la fibrosis quística (FQ), la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Hurler, la hemofilia A, la hemofilia B, el síndrome de Usher y el Tay-Sachs. Preferentemente, el trastorno genético se selecciona entre el grupo que consiste en la fibrosis quística (FQ), la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y el síndrome de Hurler.
- 35 De acuerdo con las características en las realizaciones preferidas de la invención descritas a continuación, X en la Fórmula I es oxígeno.
- 40 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₅ en la Fórmula I es hidroxilo.
- 45 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, Y en la Fórmula I es hidrógeno.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₁ es el resto monosacárido.
- 50 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, cada uno de R₂ y R₃ es hidroxilo.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₂ es el resto monosacárido.
- 55 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, cada uno de R₁ y R₃ es hidroxilo.
- 60 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₃ es el resto monosacárido.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, cada uno de R₁ y R₂ es hidroxilo.

65

El resto monosacárido representado por al menos uno de R₁, R₂ y R₃ tiene la Fórmula general II:



en la que:

- 5 la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*; y
 cada uno de R₆, R₇ y R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₇ y R₈ en la Fórmula II son cada uno hidroxilo.

- 10 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₆ en la Fórmula II es amina.

- 15 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₆ en la Fórmula II es hidroxilo.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto oligosacárido.

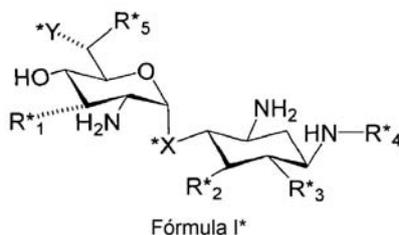
- 20 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₁ es un resto oligosacárido.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₂ es un resto oligosacárido.

- 25 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R₃ es un resto oligosacárido.

- 30 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto oligosacárido es un resto disacárido.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto disacárido tiene la Fórmula general I*:



35 en la que:

- la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;
 cada uno de R*₁, R*₂ y R*₃ es independientemente un haluro, hidroxilo, amina o está unido al compuesto que tiene la Fórmula general I, mientras que al menos uno de R*₁, R*₂ y R*₃ está unido al compuesto que tiene la Fórmula general I anterior;
 X* es oxígeno o azufre;
 R*₄ es hidrógeno o un resto (*S*)-4-amino-2-hidroxitbutirilo (AHB);
 R*₅ es hidroxilo o amina; y
 Y* es hidrógeno, alquilo o arilo.

- 45 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el resto oligosacárido comprende adicionalmente un enlazador.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R_4 e Y son cada uno hidrógeno.

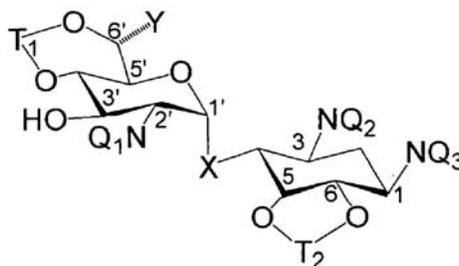
De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R_4 es AHB.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina e Y es alquilo.

De acuerdo con más características adicionales de las realizaciones preferidas descritas, cada uno de los compuestos que se presentan en el presente documento tiene actividad selectiva hacia las células eucarióticas por sobre las células procariontas. De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas cada uno de los compuestos que se presentan en el presente documento no tiene actividad antibacteriana.

También se desvela un proceso de preparación de un compuesto que tiene la Fórmula general I como se describe en el presente documento, en la que R_1 en la Fórmula I es un resto monosacárido y cada uno de R_2 y R_3 es hidroxilo, comprendiendo el proceso:

(a) acoplar un compuesto que tiene la Fórmula general III:



Fórmula III

en la que:

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

Y es hidrógeno, alquilo o arilo;

cada uno de T_1 - T_2 es independientemente un grupo protector hidroxilo;

cada uno de Q_1 y Q_2 es independientemente un grupo protector amina;

Q_3 se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, el resto AHB comprende al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina; y

X es oxígeno o azufre,

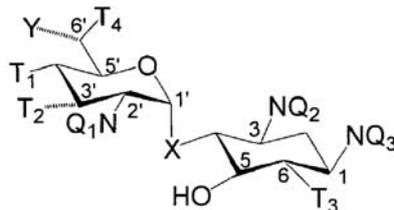
con un derivado de un monosacárido que tiene un grupo saliente unido en la posición 1" del mismo y al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amino; y

(b) eliminar cada uno de los grupos protectores hidroxilo y los grupos protectores amina, obteniendo de esta manera el compuesto.

De acuerdo con características adicionales descritas a continuación, cada uno de T_1 - T_2 es ciclohexanona dimetil cetil.

También se desvela un proceso de preparación de un compuesto que tiene la Fórmula general I como se describe en el presente documento, en la que R_2 en la Fórmula I es un resto monosacárido y cada uno de R_1 y R_3 es hidroxilo, comprendiendo el proceso:

(a) acoplar un compuesto que tiene la Fórmula general IV:



Fórmula IV

en la que:

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

Y es hidrógeno, alquilo o arilo;

cada uno de T₁-T₄ es independientemente un grupo protector hidroxilo;

cada uno de Q₁ y Q₂ es independientemente un grupo protector amina;

5 Q₃ se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, el resto AHB comprende al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina; y

X es oxígeno o azufre,

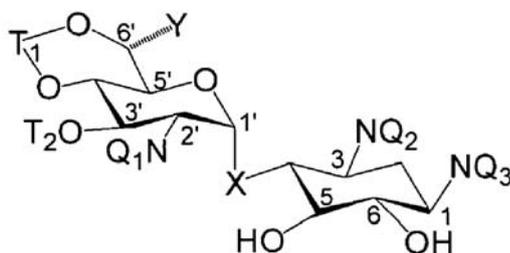
con un derivado de un monosacárido que tiene un grupo saliente unido en la posición 1" del mismo y al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amino; y

10 (b) eliminar cada uno de los grupos protectores hidroxilo y los grupos protectores amina, obteniendo de esta manera el compuesto.

De acuerdo con características adicionales descritas a continuación, cada uno de T₁-T₄ es O-acetilo.

15 También se desvela un proceso de preparación de un compuesto que tiene la Fórmula general I como se describe en el presente documento, en la que R₃ en la Fórmula I es un resto monosacárido y cada uno de R₁ y R₂ es hidroxilo, comprendiendo el proceso:

(a) acoplar un compuesto que tiene la Fórmula general V:



Fórmula V

20 en la que:

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

Y es hidrógeno, alquilo o arilo;

25 cada uno de T₁-T₂ es independientemente un grupo protector hidroxilo;

cada uno de Q₁ y Q₂ es independientemente un grupo protector amina;

Q₃ se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, el resto AHB comprende al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina; y

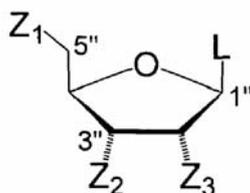
X es oxígeno o azufre,

30 con un derivado de un monosacárido que tiene un grupo saliente unido en la posición 1" del mismo y al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amino; y

(b) eliminar cada uno de los grupos protectores hidroxilo y los grupos protectores amina, obteniendo de esta manera el compuesto.

35 De acuerdo con características adicionales descritas a continuación, T₁ es 4-metoxi-1-metilbenceno y T₂ es O-benzoilo.

De acuerdo con más características adicionales, el monosacárido protegido tiene la Fórmula general VI:



Fórmula VI

40 en la que:

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

45 cada uno de Z₁, Z₂ y Z₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en el grupo protector hidroxilo y el grupo protector amina; y

L es el grupo saliente.

De acuerdo con características adicionales descritas a continuación, L en la Fórmula VI se selecciona entre el grupo que consiste en *p*-tolilsulfuro (*p*-tíolueno), tioetilo y tricloroacetimidato.

De acuerdo con más características adicionales cada uno de Z₁-Z₃ en la Fórmula VI es un grupo protector hidroxilo.

La presente invención aborda satisfactoriamente las deficiencias de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando compuestos aminoglucósidos que poseen características beneficiosas, tales como la supresión de la mutación de los codones de parada, la baja citotoxicidad y la baja actividad antimicrobiana, todas las cuales vuelven a estos compuestos muy superiores a otros compuestos aminoglucósidos conocidos en la técnica, como agentes terapéuticos para el tratamiento de la fibrosis quística y otros trastornos genéticos.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

La expresión "que comprende" significa que pueden añadirse otras etapas e ingredientes que no influyan en el resultado final. Este término abarca las expresiones "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o el método pueden incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o el método reivindicados.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el" o "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, las expresiones "un compuesto" o "al menos un compuesto" pueden incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo las mezclas de los mismos.

En toda la presente divulgación, diversos aspectos de la presente invención pueden presentarse en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible sobre el alcance de la invención. En consecuencia, debe considerarse que la descripción de un intervalo desvela específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, debe considerarse que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 desvela específicamente subintervalos 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 números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto es aplicable independientemente de la amplitud de la gama.

Siempre que se indique un intervalo numérico en el presente documento, tiene por objeto incluir cualquier número citado (fraccionario o entero) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado, se usan en el presente documento indistintamente y tienen por objeto incluir el primer y el segundo número indicado y todos los números fraccionarios y enteros entre los mismos.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los pormenores que se muestran son a modo de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con el objeto de proporcionar la que se cree es la descripción más útil y fácilmente comprensible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, la descripción tomada junto con los dibujos hace evidente para los expertos en la materia cómo pueden realizarse las varias formas de la invención en la práctica.

En los dibujos:

La FIG. 1 presenta las estructuras químicas de los aminoglucósidos antibacterianos descritos en los antecedentes de la técnica; la FIG. 2 presenta las estructuras químicas y las vías de síntesis generales para la obtención de compuestos de ejemplo de acuerdo con las presentes realizaciones, que se basan en la estructura de la paromamina y fueron diseñados para ejercer la actividad de la ultralectura más allá de la mutación del codón de parada y presentan una toxicidad reducida en comparación con otros aminoglucósidos conocidos;

las FIGS. 3A-D presentan los resultados de los ensayos comparativos de supresión y traducción de la mutación *in vitro* medidos para un Compuesto de ejemplo 3 y paromomicina, mediante la expresión de una construcción indicadora basada en un plásmido que contiene una mutación de parada sin sentido TGA C entre un polipéptido de 25 kDa que codifica el marco de lectura abierto (ORF, del inglés *open reading frame*) y un polipéptido de 10 kDa que codifica el ORF, en presencia de los compuestos ensayados y [³⁵S]-metionina, muestran los productos de reacción separadas por SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio-electroforesis en gel de poliacrilamida) y cuantificados usando un PhosphorImager para el Compuesto 3 (Figura 3A) y paromomicina (Figura 3C), y muestran gráficas comparativas en las que los valores de supresión de la mutación (que se muestran como puntos negros) y los valores de traducción (que se muestran como puntos blancos), calculados como la proporción relativa de la proteína total en cada concentración de los compuestos ensayados sobre la proteína total expresada en ausencia de los mismos, medidos por triplicado para el Compuesto 3 (Figura 3B) y para la paromomicina (Figura 3D); y

la FIG. 4 presenta la supresión *ex vivo* de una mutación sin sentido presentada por un compuesto de ejemplo de acuerdo con las presentes realizaciones, el Compuesto 3, en comparación con la paromomicina y la gentamicina, usando el plásmido p2Luc que contiene una mutación sin sentido TGA C en un polienlazador entre los genes de luciferasa de renilla y de luciferasa de luciérnaga expresados en células COS-7, que muestra los niveles de supresión calculadas como promedios de tres experimentos independientes o más para cada compuesto ensayado a diferentes concentraciones.

20 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención se refiere a una nueva clase de aminoglucósidos para su uso el tratamiento de enfermedades genéticas. Específicamente, la presente invención es de una nueva clase de compuestos, derivados de la paromomicina, que exhiben una alta actividad de ultralectura de mutaciones de codones de parada prematura mientras que ejercen una baja toxicidad en células de mamífero. También se desvelan composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y usos de los mismos en el tratamiento de trastornos genéticos, tales como la fibrosis quística. También se desvelan procesos de preparación de estos compuestos.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a las figuras y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, ha de entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles que se exponen en la siguiente descripción o que se ejemplifican por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de practicarse o realizarse de diversas maneras. Además, ha de entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento tienen como propósito la descripción y no deben considerarse como limitantes.

Como se ha analizado anteriormente, durante la última década, se han diseñado y sintetizado muchos análogos de aminoglucósidos naturales para superar la rápida propagación de la resistencia a antibióticos para estos fármacos en las bacterias patógenas, por lo cual se ha demostrado que algunos de los aminoglucósidos antibióticos poseen actividad de supresión de la mutación del codón de parada. Sin embargo, casi todos los experimentos de supresión de la mutación del codón de parada para el uso potencial de estos aminoglucósidos en el tratamiento de enfermedades genéticas humanas se han realizado con aminoglucósidos disponibles en el mercado y casi no se hizo ningún esfuerzo para optimizar la actividad de estos aminoglucósidos como inductores de la ultralectura del codón de parada.

Hasta la fecha, todavía no hay respuesta clara a la pregunta de por qué algunos aminoglucósidos inducen la supresión de la terminación, mientras que otros no lo hacen. La comparación de la actividad de supresión *in vitro* de varios aminoglucósidos comerciales en el sistema de mamíferos ha demostrado que, en general, los aminoglucósidos con un grupo hidroxilo C6' en el anillo I, tal como en G-418 y la paromomicina (véase la Figura 1) son más eficaces que los que tienen amina en la misma posición [6, 51].

Al explorar adicionalmente el efecto de los aminoglucósidos sobre la supresión de la mutación del codón de parada, con el objetivo de encontrar análogos de aminoglucósidos que presenten una actividad mejorada de ultralectura del codón de parada así como una toxicidad reducida, los presentes inventores han previsto que sería beneficioso en este efecto separar los elementos de la estructura de aminoglucósido que inducen toxicidad de los que son necesarios para la actividad antibacteriana y/o de supresión de la mutación del codón de parada. A partir de los datos de toxicidad disponibles de los aminoglucósidos utilizados clínicamente y de algunas estructuras diseñadas (véase la Figura 1), se planteó la hipótesis de que los dos factores principales que influyen significativamente en la toxicidad de los aminoglucósidos son la reducción en el número de grupos amino (desaminación) y/o la eliminación de grupos hidroxilo de anillo (desoxigenación).

Se observó una reducción de la toxicidad del aminoglucósido como resultado de la desaminación (eliminación de los grupos amino), por ejemplo, en la paromomicina, que difiere de la neomicina en que tiene un grupo amino menos y es mucho menos tóxico que la neomicina (DL₅₀ de neomicina = 24, paromomicina = 160). Por tanto, esta diferencia de una carga (en términos de un grupo amina cargado positivamente a pH fisiológico) supone una gran diferencia en

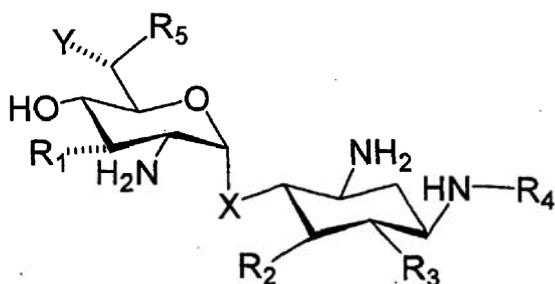
la toxicidad de los dos compuestos. De forma similar, la diferencia de una carga de la kanamicina B ($DL_{50} = 132$) con respecto a la kanamicina A ($DL_{50} = 280$) y la kanamicina C ($DL_{50} = 225$) volvió a las dos últimas menos tóxicas que la kanamicina B. Sin quedar limitado por ninguna teoría en particular, se ha supuesto que dicha reducción en la toxicidad de los aminoglucósidos tras la disminución de los grupos de amino cargados puede explicarse por la disminución de la interacción no específica con otros componentes celulares y por la reducción de la producción de radicales libres. Un factor adicional que se ha señalado que afecta a la toxicidad de los aminoglucósidos es la acilación de la amina-N1 del anillo 2-DOS con el grupo (S)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB), aunque se ha demostrado que el alcance de este efecto depende de la estructura del aminoglucósido (por ejemplo, DL_{50} de neamina = 125 frente a DL_{50} de N1-AHB-neamina = 260; y DL_{50} de kanamicina A = 280 frente a LD_{50} de amikacina = 300).

El aumento de la toxicidad de los aminoglucósidos como resultado de una desoxigenación (eliminación de los grupos hidroxilo) se observó, por ejemplo, en la eliminación de 3'-OH en la kanamicina B ($DL_{50} = 132$) para proporcionar tobramicina ($DL_{50} = 79$), que es mucho más tóxica que la kanamicina B parental. Sin quedar limitado por ninguna teoría en particular, este fenómeno puede explicarse por la reducción de la basicidad de la posición 2'-NH₂ adyacente al extremo 3'-OH. Se han proporcionado resultados que lo confirman por el desplazamiento del 5-OH con 5-flúor en la kanamicina B y sus derivados clínicos varios [64-66]. Por tanto, la toxicidad significativamente alta de los fármacos clínicos tales como la tobramicina (3'-desoxi), la gentamicina (3',4'-didesoxi), dibekacina (3',4'-didesoxi) y arbekacina (3',4'-didesoxi) podría atribuirse al aumento de la basicidad del grupo 2-NH₂ (anillo I) en estos fármacos originado principalmente por la falta de los átomos de C3'-oxígeno o C3',C4'-oxígeno.

Las manipulaciones estructurales que se introdujeron en los análogos de aminoglucósidos presentados en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 11/073.649 incluyen, entre otras, la adición de un anillo de azúcar rígido. La adición de un anillo de azúcar rígido al armazón de aminoglucósido influyó en la interacción de los mismos con las enzimas que provocan resistencia y, por tanto, contribuyó a la inhibición de la formación de un complejo ternario necesario para la catálisis enzimática y la posterior aparición de resistencia.

Al reducir la presente invención a la práctica, los presentes inventores diseñaron y prepararon satisfactoriamente y practicaron compuestos novedosos que presentan una actividad de supresión de la mutación eficiente y una toxicidad reducida. Estos compuestos se basan en un armazón de paromamina, obtenido a partir de paromomicina mediante la eliminación de dos restos de monosacáridos de la misma, al que se le introdujeron nuevas características estructurales. Las manipulaciones de las características estructurales de la paromomicina se seleccionaron cuidadosamente con el fin de reducir la toxicidad potencial y mejorar la actividad de ultralectura de la mutación.

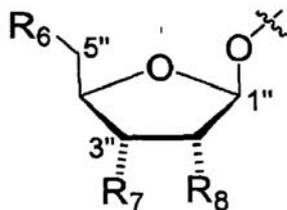
Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un compuesto representado por la Fórmula general I:



Fórmula I

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

- cada uno de R₁, R₂ y R₃ es independientemente un resto monosacárido, haluro, hidroxilo, amina o un resto oligosacárido,
- X es oxígeno o azufre;
- R₄ es (S)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB);
- R₅ es hidroxilo;
- Y es hidrógeno o alquilo; y
- la línea discontinua indica una configuración R o una configuración S,
- y en la que al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

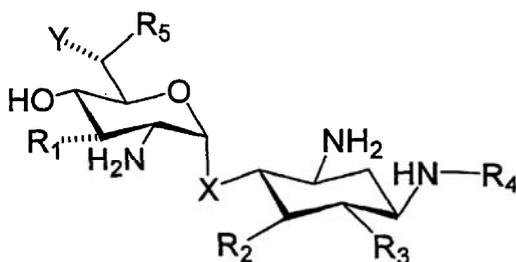
en la que:

5 la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*; y cada uno de R₆, R₇ y R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.

Preferentemente, X es oxígeno.

10 Preferentemente, X es alquilo.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un compuesto representado por la Fórmula general I:



Fórmula I

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

cada uno de R₁, R₂ y R₃ es independientemente un resto monosacárido, hidroxilo, amina o un resto oligosacárido,

X es oxígeno o azufre;

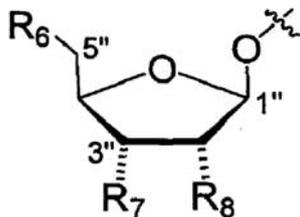
20 R₄ es hidrógeno;

R₅ es hidroxilo;

Y es hidrógeno;

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

y en la que al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

25 en la que:

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

30 cada uno de R₆, R₇ y R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina; para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.

Preferentemente, X es oxígeno.

Preferentemente, R₅ es hidroxilo.

Preferentemente, R4 es AHB.

El trastorno genético que se trata con los compuestos para su uso de acuerdo con los diversos aspectos, puede estar asociado a una mutación del codón de parada prematura.

5 El término "monosacárido", como se usa en el presente documento, y 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 puede descomponerse por hidrólisis. Los ejemplos más comunes de monosacáridos incluyen glucosa (dextrosa), fructosa, galactosa y ribosa. Los monosacáridos pueden clasificarse de acuerdo con el número de átomos de carbono del carbohidrato, es decir, 10 triosa, que tiene 3 átomos de carbono, tal como gliceraldehído y dihidroxiacetona; tetrosa, que tiene 4 átomos de carbono, tal como eritrosa, treosa y eritrolosa; 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- 15 desoxi-mano-octonato; nonosa, que tiene 9 átomos de carbono tal como sialosa; y decosa, que tiene 10 átomos de carbono. Los monosacáridos son los componentes básicos de los oligosacáridos como sacarosa (azúcar común) y otros polisacáridos (tal como celulosa y almidón).

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "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 ahora está unida covalentemente a otra entidad química.

25 Como se usa en el presente documento, el término "haluro" (también denominado en el presente documento como "halo"), describe un átomo de flúor, cloro, bromo o yodo, también denominado en el presente documento como fluoruro, cloruro, bromuro y yoduro.

El término "hidroxilo", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo -OH.

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

35 Como se usa en el presente documento, el término "alquilo" describe un hidrocarburo alifático que incluye grupos de cadena lineal y de cadena ramificada. Preferentemente, el grupo alquilo tiene de 1 a 20 átomos de carbono, y más preferentemente 1-10 átomos de carbono. Cuando se indica un intervalo numérico en el presente documento; por ejemplo, "1-10", implica que el grupo, en este caso el grupo alquilo, puede contener 1 átomo de carbono, 2 átomos de carbono, 3 átomos de carbono, etc., hasta, e incluyendo, 10 átomos de carbono. El alquilo puede estar sustituido o sin sustituir. Cuando está sustituido, el sustituyente puede ser, por ejemplo, un alquilo, un alqueno, un alquino, un cicloalquilo, un arilo, un heteroarilo, un haluro, un hidroxilo, un alcoxi y un hidroxialquilo según se definen estos 40 términos 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, este término incluye adicionalmente alqueno y alquino.

45 El término "alqueno" 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. El alqueno puede estar sustituido o sin sustituir por uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

50 El término "alquino", 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 alquino puede estar sustituido o sin sustituir por uno o más sustituyentes, como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

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

60 El término "heteroarilo" describe un grupo monocíclico o de anillos condensados (es decir, anillos que comparten un par adyacente de átomos) que tiene en el anillo o anillos uno o más átomos, tales como, por ejemplo, nitrógeno, oxígeno y azufre y, además, que tiene un sistema de electrones pi completamente conjugado. 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 por 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.

65 En el presente documento, la estructura de dos anillos presentada en la Fórmula I anterior recibe el nombre de estructura paromamina.

De acuerdo con realizaciones preferidas de la presente invención, X es oxígeno. Además, preferentemente, R₅ es hidroxilo.

Además, preferentemente, en aquellos aspectos en los que Y puede ser alquilo, Y es metilo.

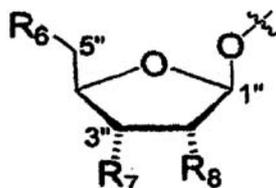
Como puede observarse en la Fórmula I anterior en el presente documento, hay varias posiciones sobre las cuales un resto monosacárido puede estar unido a la estructura paromamina. De acuerdo con realizaciones preferidas, hay tres posiciones, representadas como R₁, R₂ y R₃, que se prefieren para introducir un resto monosacárido en la estructura paromamina.

Preferentemente, únicamente se introduce un monosacárido en uno cualquiera de R₁, R₂ o R₃. En tales casos, preferentemente, las otras posiciones son hidroxilos.

Más preferentemente, el resto monosacárido se introduce en la posición R₁, y R₂ y R₃ son cada uno preferentemente hidroxilo.

De forma análoga, cuando se introduce un resto monosacárido en la posición R₂, R₁ y R₃ son cada uno preferentemente hidroxilo, y cuando se introduce un resto monosacárido en la posición R₃, R₁ y R₂ son cada uno preferentemente hidroxilo.

Al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

en la que cada uno de R₆, R₇ y R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina, y la línea discontinua indica una configuración R o una configuración S. La línea curvada indica la posición del resto monosacárido que se acopla al estructura paromamina.

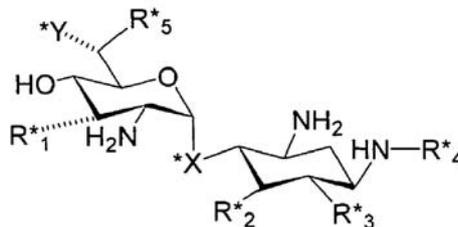
Preferentemente, R₇ y R₈ son cada uno hidroxilo.

Como se presenta y se demuestra en la sección de Ejemplos que se indica a continuación (véase, Tabla 18), se descubrió que el sustituyente en la posición R₆ afecta tanto a la actividad ininterrumpida de la mutación de truncamiento como a la actividad antimicrobiana del compuesto resultante. Por lo tanto, los compuestos que tienen un resto monosacárido representados por la Fórmula II anterior tienen un grupo amina o hidroxilo en la posición R₆, y preferentemente, una amina.

En una realización de la presente invención, la estructura paromamina presentada en la Fórmula I anterior comprende uno o más restos oligosacárido adicionales unidos a la misma, preferentemente en las posiciones R₁, R₂ y R₃. Por lo tanto, de acuerdo con realizaciones preferidas, al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto oligosacárido. Preferentemente, únicamente se introduce un resto oligosacáridos en uno cualquier de R₁, R₂ o R₃.

El término "oligosacárido", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que comprende dos o más unidades monosacárido, según se definen en el presente documento. Preferentemente, el oligosacárido comprende 2-6 monosacáridos, más preferentemente el oligosacárido comprende 2-4 monosacáridos, y mucho más preferentemente el oligosacárido es un resto disacárido, que tiene dos unidades monosacárido.

De acuerdo con realizaciones preferidas, el disacárido acoplado al compuesto que tiene la Fórmula general I, tiene Fórmula general I* como se indica a continuación:



Fórmula I*

en la que:

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

5 cada uno de R^*_1 , R^*_2 y R^*_3 es independientemente un haluro, hidroxilo, amina o está unidos al compuesto que tiene la Fórmula general I, mientras que al menos uno de R^*_1 , R^*_2 y R^*_3 está unido al compuesto que tiene la Fórmula general I.

X^* es oxígeno o azufre;

R^*_4 es hidrógeno o un resto (S)-4-amino-2-hidroxibutirilo (AHB);

R^*_5 es hidroxilo o amina; y

10 Y^* es hidrógeno, alquilo o arilo.

Por lo tanto, un "dímero" de este tipo incluye dos compuestos unidos entre sí en sus posiciones R_1 , R^*_1 , R_2 , R^*_2 , R_3 o R^*_3 correspondientes en cualquier combinación de los mismos, por ejemplo, un dímero unido R_1 - R^*_2 o R_2 - R^*_1 , un dímero unido R_1 - R^*_3 o R_3 - R^*_1 , un dímero unido R_3 - R^*_2 o R_2 - R^*_3 , un dímero unido R_1 - R^*_1 , un dímero unido R_2 - R^*_2 o un dímero unido R_3 - R^*_3 . Preferentemente, es un dímero unido R_1 - R^*_1 .

El enlace entre los dos restos puede ser a través de un enlazador, o un resto de unión. El término "enlazador", como se usa en el presente documento, se refiere a un resto químico que está unido al menos a otros dos restos químicos, por lo tanto, uniéndolos entre ellos. En el contexto de las presentes realizaciones, el enlazador es preferentemente un alquilo inferior que tiene 1-6 átomos de carbono y más preferentemente un metileno.

Como se ha analizado anteriormente en el presente documento, aunque incidir en el número de grupos amina en la estructura paromamina puede tener un efecto negativo en cuanto a toxicidad, un análogo paromamina, que tiene un grupo amina en la posición R_1 en una estereoquímica invertida en comparación con el grupo hidroxilo desplazado original, se preparó como se presenta en la sección de Ejemplos que se indica a continuación, en un intento por investigar el efecto de un amina adicional en una configuración invertida.

Como se demuestra en la sección de Ejemplos que se indica a continuación, el Compuesto 8, un compuesto ejemplar de acuerdo con las presentes realizaciones, que tiene una amina en la posición R_1 que reemplaza un hidroxilo y posee una configuración invertida, se preparó y mostró una actividad antimicrobiana 6-16 veces inferior (véase, Tabla 18 a continuación en el presente documento) en comparación con la paromomicina.

Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, R_1 es amina.

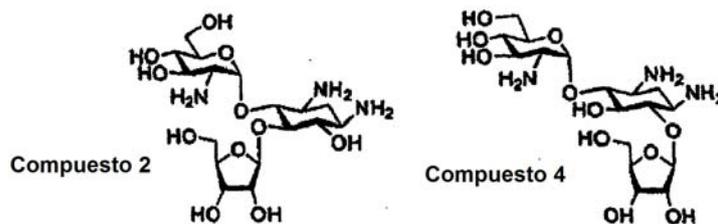
Los compuestos descritos anteriormente en el presente documento pueden agruparse adicionalmente en varios subconjuntos, de acuerdo con los sustituyentes en las posiciones R_4 , R_5 e Y .

Considerando R_4 , R_5 e Y , en un subconjunto cada uno de R_4 e Y es hidrógeno, y R_5 es hidroxilo, dando los compuestos mostrados en la figura 2. En los otros dos subconjuntos a este respecto R_4 es hidrógeno o AHB, y hay una amina en la posición R_5 y un metilo en la posición Y , y en cada uno de estos compuestos, la posición R_5 puede asumir la estereoconfiguración *R* o *S*.

Cada uno de los subconjuntos anteriores puede dividirse adicionalmente por su sustituyente R_4 , que es hidrógeno, o un resto AHB.

Los compuestos que tienen la Fórmula general I anterior, en la que Y es hidrógeno, R_4 es hidrógeno o un resto AHB y uno de R_1 - R_3 es un resto ribofuranosa, también se denominan en el presente documento como los Compuestos 3 y 37 (véase, Esquema 7 a continuación en el presente documento); los Compuestos que tienen la Fórmula general I anterior, en la que R_5 es hidroxilo, R_4 es hidrógeno o un resto AHB, uno de R_1 - R_3 es un resto ribofuranosa, e Y es metilo, también se denominan en el presente documento como los Compuestos 42 y 43 (véase, Esquema 8 a continuación en el presente documento); y los Compuestos que tienen la Fórmula general I anterior, en la que R_5 es amina, R_4 es hidrógeno o un resto AHB, Y es metilo y uno de R_1 - R_3 es un resto ribofuranosa, también se denominan en el presente documento como los Compuestos 48 y 49 (véase, Esquema 8 a continuación en el presente documento).

Anteriormente se han descrito los compuestos (3S,4R,5S,6S)-5-amino-6-((1R,2R,3R,4R)-4,6-diamino-2-((2S,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahidrofurano-2-iloxi)-3-hidroxiciclohexiloxi)-2-(hidroximetil)-tetrahidro-2H-piran-3,4-diol (denominado a continuación en el presente documento Compuesto 2) y (3S,4R,5S,6S)-5-amino-6-((1R,2S,3R,4R)-4,6-diamino-3-((2R,4R,5R)-3,4-dihidroxi-5-(hidroximetil)-tetrahidrofurano-2-iloxi)-2-hidroxiciclohexiloxi)-2-(hidroximetil)-tetrahidro-2H-piran-3,4-diol (denominado a continuación en el presente documento Compuesto 4).



5 Sin embargo, el Compuesto 2 y el Compuesto 4, no se describieron ni ensayaron en el contexto de su actividad terapéutica en general, y menos aún en el contexto del tratamiento de trastornos genéticos, y en el contexto de la supresión de mutaciones de codones de parada en particular, y, por lo tanto, no están excluidos de la presente invención.

10 Las presentes realizaciones incluyen adicionalmente cualquier enantiómero, profármaco, solvato, hidrato y/o sal farmacéuticamente aceptable de los compuestos descritos en el presente documento.

15 Como se usa en el presente documento, el término "enantiómero" se refiere a un estereoisómero de un compuesto que puede superponerse con respecto a su homólogo solo mediante una completa inversión/reflejo (imagen especular) del otro. Se dice que los enantiómeros tienen "lateralidad", puesto que se relacionan entre sí como la mano izquierda y derecha. Los enantiómeros tienen idénticas propiedades químicas y físicas excepto cuando están presentes en un entorno que, en sí mismo, tiene lateralidad, tal como todos los sistemas vivos.

20 El término "profármaco" se refiere a un agente que se convierte en el compuesto activo (el fármaco de origen activo) *in vivo*. Los profármacos son útiles generalmente para facilitar la administración del fármaco de origen. Por ejemplo, pueden estar biodisponibles mediante administración oral, mientras que el fármaco de origen no lo está. Un profármaco también puede tener mejor solubilidad en comparación con el fármaco de origen en composiciones farmacéuticas. Los profármacos también se utilizan a menudo para lograr una liberación sostenida del compuesto activo *in vivo*. Un ejemplo, sin limitación, de un profármaco sería un compuesto de la presente invención que tiene uno o más restos ácido carboxílico, que se administra como un éster (el "profármaco"). Tal profármaco se hidroliza *in vivo* para proporcionar, con ello, el compuesto libre (el fármaco de origen). El éster seleccionado puede afectar a las características de solubilidad y a la velocidad de hidrólisis del profármaco.

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

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

35 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a un especie cargada del precursor y su contraión, que se emplea generalmente para modificar las características de solubilidad del precursor y/o para reducir cualquier irritación significativa en un organismo provocada por el precursor, pero sin abrogar la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Un ejemplo, sin limitación, de una sal farmacéuticamente aceptable será un anión carboxilato y un catión, tal como, pero sin limitación, amonio, sodio, potasio y similares.

40 Adicionalmente, se desvelan procesos de preparación de los compuestos descritos en el presente documento.

45 Las rutas sintéticas descritas en el presente documento incluyen una reacción entre un aceptor y un donante, por lo que el término "aceptor" se usa en el presente documento para describir la estructura principal obtenida a partir de paromamina que tiene al menos un grupo hidroxilo disponible (desprotegido) preferentemente seleccionado selectivamente en las posiciones tales como C5, C6 y C3', que es reactivo durante una reacción de glucosidación, y puede aceptar un glucosilo, y el término "donante" se usa en el presente documento para describir el glucosilo.

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

55 Los donantes y aceptores están diseñados para formar los compuestos deseados. Lo siguiente describe realizaciones preferidas de este aspecto de la presente invención, presentando procesos ejemplares de preparación de subconjuntos ejemplares de los compuestos descritos en el presente documento.

Las síntesis de los compuestos de las presentes realizaciones generalmente incluyen (i) preparar un compuesto aceptor por protección selectiva de uno o más hidroxilos y amidas en las posiciones seleccionadas presentes en la

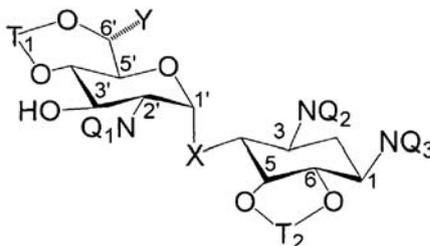
estructura paromamina, dejando una o dos posiciones sin proteger y, por lo tanto, libres para aceptar un compuesto donante (glucosilo) como se ha definido anteriormente en el presente documento; (ii) manipular una característica estructural del aceptor en la posición deseada mediante, por ejemplo, una reacción de acoplamiento con un compuesto donante protegido adecuadamente a la posición no protegida en el aceptor, o reemplazando un grupo hidroxilo con un grupo amina y opcionalmente invirtiendo la configuración de la amina; y (iii) eliminando todos los grupos protectores.

La expresión "grupo protector", como se usa en el presente documento, se refiere a un sustituyente que se emplea comúnmente para bloquear o proteger una funcionalidad particular haciendo reaccionar al mismo tiempo otros grupos funcionales en el compuesto. Por ejemplo, un "grupo protector amina" es un sustituyente unido a un grupo amina que bloquea o protege la funcionalidad amina en el compuesto. Los grupos protectores amina 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 hidroxilo" se refiere a un sustituyente de un grupo hidroxilo que bloquea o protege la funcionalidad hidroxilo. Los grupos protectores adecuados incluyen ciclohexanona dimetil cetal (que forma un 1,3-dioxano con dos grupos hidroxilo adyacentes), 4-metoxi-1-metilbenceno (que forma un 1,3-dioxano con dos grupos hidroxilo adyacentes), O-acetilo, O-cloroacetilo, O-benzoílo 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, Nueva York, 1991.

De acuerdo con las realizaciones preferidas presentadas a continuación en el presente documento, los grupos protectores amina incluyen un grupo azida y/o un grupo N-ftalimida, y los grupos protectores hidroxilo incluyen O-acetilo, O-cloroacetilo y/o O-benzoílo.

En una realización, se proporciona un proceso de preparación de un subconjunto ejemplar de los compuestos que tienen la Fórmula general I como se presenta en el presente documento, en la que un monosacárido está unido a la posición R_1 y cada uno de R_2 y R_3 es hidroxilo. El proceso, de acuerdo con esta realización, se realiza preparando un compuesto aceptor adecuadamente protegido y un compuesto donante adecuadamente protegido, acoplando estos dos compuestos entre sí, y posteriormente eliminando todos los grupos protectores del compuesto resultante.

El aceptor, de acuerdo con esta realización, tiene la Fórmula general III:



Fórmula III

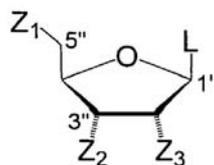
que es una versión de paromamina que tiene grupos protectores en posiciones específicas, en la que:

- la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;
- Y es hidrógeno, alquilo o arilo;
- cada uno de T_1 - T_2 es independientemente un grupo protector hidroxilo;
- cada uno de Q_1 y Q_2 es independientemente un grupo protector amina;
- Q_3 se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, en el que los grupos amina e hidroxilo están protegidos; y
- X es oxígeno o azufre, preferentemente oxígeno.

Los grupos protectores se seleccionan de tal forma que se unen y se eliminan fácilmente en condiciones adecuadas, y de acuerdo con la reactividad diferencial de los diversos grupos amina e hidroxilo de paromamina, de tal forma que el grupo hidroxilo en la posición R_1 del mismo se deja desprotegido y libre de la reacción de acoplamiento.

De acuerdo con realizaciones preferidas, cada uno de T_1 - T_2 es un grupo protector ciclohexanona dimetil cetal, que forma un 1,3-dioxano con dos grupos hidroxilo adyacentes en el caso de T_1 , y que forma un 1,3-dioxolano en el caso de T_2 .

El compuesto donante es un monosacárido protegido que tiene un grupo saliente en la posición 1" del mismo. Dichos monosacáridos protegidos pueden representarse colectivamente por la Fórmula general VI:



Fórmula VI

en la que cada uno de Z_1 , Z_2 y Z_3 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina, L es el grupo saliente, y la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "grupo saliente" describe un átomo, grupo o resto químico inestable que experimenta fácilmente desprendimiento de una molécula orgánica durante una reacción química, mientras que el desprendimiento se facilita por la estabilidad relativa del átomo, grupo o resto saliente del mismo. Típicamente, cualquier grupo que sea la base conjugada de un ácido fuerte puede actuar como un grupo saliente.

10 Por ejemplo, los ejemplos representativos de grupos salientes adecuados de acuerdo con las presentes realizaciones incluyen, sin limitación, haluro, acetato, tosilato, triflato, sulfonato, azida, hidroxilo, tiohidroxilo, alcoxi, cianato, tiocianato, nitro y ciano.

El término "acetato" se refiere un anión de ácido acético.

15 El término "tosilato" se refiere un anión de ácido tolueno-4-sulfónico.

El término "triflato" se refiere un anión de ácido trifluoro-metanosulfónico.

20 El término "azida" se refiere a un N_3^- .

Los términos "hidroxilo" y "tiohidroxilo" se refieren a los aniones OH^- y SH^- respectivamente.

25 Los términos "cianato" y "tiocianato" se refieren a los aniones $[O=C=N]^-$ y $[S=C=N]^-$ respectivamente.

El término "nitro" se refiere a NO_2^- .

El término "ciano" se refiere a $[C\equiv N]^-$.

30 Preferentemente, L es *p*-tolilsulfuro (*p*-tiotolueno), tioetilo y tricloroacetimidato, y adicionalmente, preferentemente cada uno de Z_1 - Z_3 es un grupo protector hidroxilo.

Por lo tanto, el proceso se realiza:

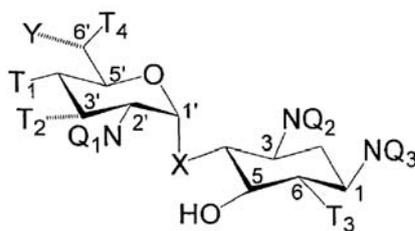
- 35 (a) acoplado el compuesto aceptor que se ha mencionado anteriormente al compuesto donante que se ha mencionado anteriormente; y
(b) posteriormente eliminando cada uno de los grupos protectores.

40 Los compuestos ejemplares que se prepararon de acuerdo con esta realización incluyen el Compuesto 6 y el Compuesto 7, como se presenta en la sección de Ejemplos que se indica a continuación.

45 Este proceso rudimentario se usa para preparar otros subconjuntos ejemplares de los compuestos de acuerdo con las presentes realizaciones, tras la utilización de un aceptor que está diseñado para interactuar con un donante en una posición deseada.

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, se proporciona un proceso de preparación de un subconjunto ejemplar de los compuestos que tienen la Fórmula general I como se presenta en el presente documento, en la que un monosacárido está unido a la posición R_2 y cada uno de R_1 y R_3 es hidroxilo. Tal proceso se realiza:

- 50 (a) acoplado un compuesto que tiene la Fórmula general IV:



Fórmula IV

en la que:

- 5 la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;
 Y es hidrógeno, alquilo o arilo;
 cada uno de T₁-T₄ es independientemente un grupo protector hidroxilo;
 cada uno de Q₁ y Q₂ es independientemente un grupo protector amina;
 Q₃ se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, el resto AHB
 10 comprende al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina; y
 X es oxígeno o azufre,
 con un derivado de un monosacárido que tiene un grupo saliente unido en la posición 1" del mismo y al
 menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amino; y

- 15 (b) eliminando cada uno de los grupos protectores hidroxilo y los grupos protectores amina, para obtener así el compuesto.

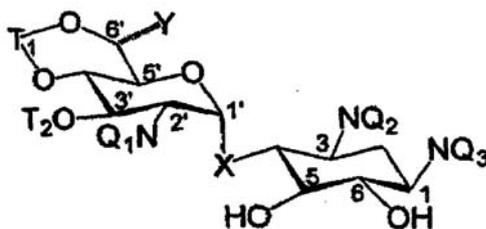
Preferentemente, cada uno de T₁-T₄ es O-acetilo.

- 20 Como en la realización que se ha presentado previamente, el derivado de un monosacárido es un monosacárido protegido que tiene la Fórmula general VI, como se ha presentado anteriormente en el presente documento.

Los compuestos ejemplares que se prepararon de acuerdo con esta realización incluyen el Compuesto 2 y el Compuesto 3, como se presenta en la sección de Ejemplos que se indica a continuación.

- 25 De acuerdo con otra realización más, se proporciona un proceso de preparación de un subconjunto ejemplar de los compuestos que tienen la Fórmula general I como se presenta en el presente documento, en la que un monosacárido está unido a la posición R₃ y cada uno de R₁ y R₂ es hidroxilo. Tal proceso se realiza:

- (a) acoplando un compuesto que tiene la Fórmula general V:



Fórmula V

- 30 en la que:

- la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*;
 Y es hidrógeno, alquilo o arilo;
 35 cada uno de T₁-T₂ es independientemente un grupo protector hidroxilo;
 cada uno de Q₁ y Q₂ es independientemente un grupo protector amina;
 Q₃ se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo protector amina y un resto AHB, el resto AHB
 comprende al menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amina; y
 X es oxígeno o azufre,
 40 con un derivado de un monosacárido que tiene un grupo saliente unido en la posición 1" del mismo y al
 menos uno de un grupo protector hidroxilo y un grupo protector amino; y

- (b) eliminando cada uno de los grupos protectores hidroxilo y los grupos protectores amina, para obtener de esta
 45 manera el compuesto.

Preferentemente, T₁ es 4-metoxi-1-metilbenceno y T₂ es O-benzoílo.

Los compuestos ejemplares que se prepararon de acuerdo con esta realización incluyen el Compuesto 4 y el Compuesto 5, como se presenta en la sección de Ejemplos que se indica a continuación.

5 En otras realizaciones, los aceptores que se han presentado anteriormente en el presente documento se utilizan en la preparación de otros subconjuntos de compuestos que tienen la Fórmula general I.

10 Como se demuestra en la sección de Ejemplos a continuación, los compuestos que se presentan en el presente documento se han diseñado de manera que posean, y de hecho se ha demostrado que lo hacen, una actividad de supresión de la mutación de truncamiento, es decir, la capacidad de inducir la ultralectura de una mutación de codón de parada. 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, de trastornos que se caracterizan por una mutación de truncamiento.

15 Por tanto, también se desvela un método de tratamiento de un trastorno genético. El método, de acuerdo con este aspecto de la presente invención, se efectúa mediante la administración a un sujeto que lo necesite de una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los compuestos que se presentan en el presente documento que tienen una Fórmula general I.

20 Como se usan en el presente documento, los términos "tratar" y "tratamiento" incluyen anular, inhibir sustancialmente, retardar o 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.

25 Como se usa en el presente documento, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" describe una cantidad del polímero que se administra que aliviará en cierto grado uno o más de los síntomas de la afección que se trata.

30 La frase "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 con frecuencia se heredan de los padres y que puede aparecer de forma inesperada cuando dos portadores sanos de un gen recesivo defectuoso se reproducen o cuando el gen defectuoso es dominante. Los trastornos genéticos pueden aparecer en diferentes patrones de herencia que incluyen el patrón dominante autosómico en el que solo se necesita una copia mutada del gen para afectar a la descendencia, y el patrón autosómico recesivo en el que dos copias del gen deben estar mutadas para afectar a la descendencia.

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

40 Los ejemplos de dichos trastornos genéticos incluyen, pero no se limitan a, la fibrosis quística (FQ), la distrofia muscular de Duchenne (DMD), la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Hurler, la hemofilia A, la hemofilia B, el síndrome de Usher y el Tay-Sachs.

45 En consecuencia, se proporciona un uso de un compuesto que tiene la Fórmula general I como se presenta en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno genético.

50 En cualquiera de los métodos y usos que se describen en el presente documento, los compuestos descritos en el presente documento pueden usarse ya sea en sí o formando una parte de una composición farmacéutica, que comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Por tanto, también se desvela una composición farmacéutica que comprende, como principio activo, cualquiera de los compuestos novedosos que se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Al estar dirigidos principalmente al tratamiento de trastornos genéticos, que son crónicos por definición, se espera que los compuestos que se presentan en el presente documento o las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos se administren durante toda la vida del sujeto que se trata. Por tanto, el modo de administración de las composiciones farmacéuticas que contienen los compuestos debe ser de manera que sea fácil y cómodo para la administración, preferentemente para la auto-administración, y de manera que ocasionalmente las menores pérdidas en el bienestar y el curso de la vida del paciente.

65 La administración repetitiva y periódica de los compuestos que se presentan en el presente documento o las composiciones farmacéuticas que contienen los mismos puede efectuarse, por ejemplo, diariamente, es decir, una vez al día, más preferentemente la administración se efectúa semanalmente, es decir, una vez a la semana, más preferentemente, la administración se efectúa mensualmente, es decir, una vez al mes y más preferentemente la administración se efectúa una vez cada varios meses (por ejemplo, cada 1,5 meses, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o incluso 6 meses).

70 Como se ha analizado anteriormente en el presente documento, algunas de las limitaciones para el uso de los aminoglucósidos conocidos en la actualidad como fármacos de ultralectura de mutaciones de truncamiento se

5 asocian al hecho de que son principalmente antibacterianos (se usan como agentes antibióticos). El uso crónico de cualquier agente antibacteriano es altamente injustificado e incluso peligroso para la vida ya que altera la flora microbiana intestinal, lo que puede provocar o empeorar otras afecciones médicas tales como la exacerbación de la enfermedad inflamatoria intestinal [67] y puede provocar la aparición de resistencia en algunas cepas patológicas de microorganismos [68-71].

10 Los compuestos que se presentan en el presente documento preferentemente no tienen ninguna actividad antibacteriana. Por "actividad antibacteriana" se quiere decir que la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los mismos para una cepa en particular es mucho mayor que la concentración de un compuesto que se considera un antibiótico con respecto a esta cepa. Además, preferentemente, la CIM de estos compuestos es mucho mayor que la concentración necesaria para ejercer la actividad de supresión de la mutación de truncamiento.

15 Al ser preferentemente no bactericidas, los compuestos que se presentan en el presente documento no sufren la limitación mencionada anteriormente y, por tanto, pueden administrarse a través de vías de absorción que pueden contener microorganismos benignos y/o beneficiosos que no son dianas y, por tanto, su conservación puede ser necesaria. Este rasgo importante de los compuestos que se presentan en el presente documento hace que estos compuestos sean fármacos particularmente eficaces contra las afecciones crónicas, ya que pueden administrarse repetidamente y durante toda la vida, sin causar ningún efecto adverso ni acumulativo y, adicionalmente, pueden administrarse por vía oral o rectal, es decir, a través del tracto GI, que es una característica muy útil e importante para un fármaco dirigido al tratamiento de trastornos crónicos.

20 De acuerdo con realizaciones preferidas, los compuestos que se presentan en el presente documento son selectivos hacia las células eucariotas frente a las células procariotas, es decir, los compuestos presentan una actividad mayor en las células eucariotas, tales como las de mamíferos (seres humanos) en comparación con su actividad en las células procariotas, tales como las de las bacterias. Sin quedar ligado por ninguna teoría en particular, se supone que los compuestos que se presentan en el presente documento, que se sabe que actúan mediante la unión al sitio A de los ARN ribosómicos 16S mientras el ribosoma está implicado en la traducción de un gen, tienen una mayor afinidad por el sitio A ribosómico eucariota o, de otra forma, son selectivos hacia el sitio A eucariota, en comparación con el sitio A ribosómico procariota.

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

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

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

40 Las técnicas para la formulación y la administración de fármacos pueden encontrarse en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*" Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en el presente documento por referencia.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden fabricarse mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

50 Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el procesamiento de los compuestos que se presentan en el presente documento en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

55 De acuerdo con realizaciones preferidas, la vía más preferida de administración es la vía oral. Para la administración oral, los compuestos que se presentan en el presente documento pueden formularse fácilmente combinando los compuestos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los compuestos que se presentan en el presente documento sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente.

5 Las preparaciones farmacológicas para su uso oral pueden hacerse usando un excipiente sólido, moliendo opcionalmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo la 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, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa de sodio; y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos tal como alginato de sodio.

10 Las composiciones farmacéuticas, que pueden usarse por vía oral, incluyen las cápsulas duras hechas de gelatina, así como las cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con una carga tal como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos que se presentan en el presente documento pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

20 Para la inyección, los compuestos que se presentan en el presente documento pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica con o sin disolventes orgánicos tales como propilenglicol, polietilenglicol.

25 Para la administración a través de las mucosas, se usan penetrantes en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

30 Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, pueden usarse soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Pueden añadirse colorantes o pigmentos a los comprimidos o a los recubrimientos de las grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos de aminoglucósidos activos.

35 Para la administración bucal, las composiciones pueden tomar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

40 Para la administración por inhalación, los compuestos que se presentan en el presente documento se administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol (que incluye normalmente vehículos en polvo, licuados y/o gaseosos) desde un envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo 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.

45 Los compuestos que se presentan en el presente documento pueden formularse para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis 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 dispersantes.

50 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación de compuestos en forma hidrosoluble. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos que se presentan en el presente documento pueden prepararse en forma de suspensiones y emulsiones para inyección oleosas apropiadas (por ejemplo, emulsiones agua-en-aceite, aceite-en-agua o agua-en-aceite en aceite). Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como el aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los compuestos que se presentan en el presente documento para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

60 Como alternativa, los compuestos que se presentan en el presente documento pueden estar en forma de polvo para su constitución con un adecuado vehículo, por ejemplo, agua estéril apirógena, antes de su uso.

65

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

5 Las composiciones farmacéuticas que se describen en el presente documento también pueden comprender vehículos o excipientes sólidos de fase de gel adecuados. Los ejemplos de dichos vehículos o excipientes incluyen, pero no se limitan a, carbonato de calcio, diversos azúcares, almidones, derivados de celulosa, gelatina y polímeros tales como polietilenglicoles.

10 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 el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de los compuestos que se presentan en el presente documento eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas del trastorno o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

15 La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de la capacidad de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en la presente memoria.

20 Para cualesquier compuestos que se presentan en el presente documento utilizados en los métodos de las presentes realizaciones, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de actividad en animales. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluya los niveles de supresión de mutación según se determinan mediante ensayos de actividad (por ejemplo, la concentración de los compuestos de ensayo que consigue una ultralectura sustancial de la mutación de truncamiento). Dicha información puede usarse para determinar con mayor
25 precisión las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos que se presentan en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales de experimentación, por ejemplo, mediante la determinación de la CE_{50} (la concentración de un compuesto a la que se observa el 50 % de su efecto máximo) y la DL_{50} (la dosis letal que provoca la muerte del 50 % de los animales ensayados) para un compuesto sujeto. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos de actividad y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en humanos.

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

40 La cantidad de dosificación y el intervalo pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos de los compuestos que se presentan en el presente documento que sean suficientes para mantener los efectos deseados, denominados la concentración eficaz mínima (CEM). La CEM variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*; por ejemplo, la concentración de los compuestos necesaria para alcanzar el 50-90 % de la expresión del gen entero que tiene una mutación de truncamiento, es decir, la ultralectura del codón de mutación. Las dosificaciones necesarias para lograr la CEM dependerán de las características individuales y la vía de administración. Pueden usarse ensayos o bioensayos de HPLC para determinar las concentraciones plasmáticas.

50 Los intervalos de dosificación también pueden determinarse usando el valor CEM. Las preparaciones deberían administrarse usando una pauta, que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la CEM durante el 10-90 % del tiempo, preferentemente entre el 30-90 % y mucho más preferentemente el 50-90 %.

55 Dependiendo de la gravedad y el grado de respuesta de la afección crónica que se trata, la dosificación también puede ser una única administración periódica de una composición de liberación lenta descrita anteriormente en el presente documento, durando el curso de tratamiento periódico de varios días a varias semanas o hasta que se produzca una mejora suficiente durante el tratamiento periódico o se consiga una disminución sustancial de la patología para el tratamiento periódico.

La cantidad la composición que se administra dependerá, por supuesto, del sujeto que se trata, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del criterio del médico que prescribe, etc.

60 Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos, por sus siglas en inglés), que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contengan el principio activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como, pero no limitado a un envase blíster o un envase presurizado (para inhalación). El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispositivo dispensador también puede ir acompañado de una nota asociada al envase en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la
65

venta de productos farmacéuticos, nota que es un reflejo de la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones para la administración a seres humanos o veterinaria. Dicha nota, por ejemplo, puede ser del etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos para los fármacos de prescripción o de un prospecto aprobado. Las composiciones que comprenden un compuesto de acuerdo con las presentes realizaciones, formuladas en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada o el diagnóstico, como se ha detallado anteriormente en el presente documento.

Por tanto, en una realización preferida, la composición farmacéutica se envasa en un material de envasado y se identifica por la impresión en o sobre el material de embalaje, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético, como se define en el presente documento.

En cualquiera de las composiciones, métodos y usos descritos en el presente documento, los compuestos pueden utilizarse en combinación con otros agentes útiles en el tratamiento de la enfermedad genética.

Los objetos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no tienen por objeto ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han perfilado anteriormente en el presente documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones a continuación encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

EJEMPLO 1

SÍNTESIS QUÍMICAS

Materiales y métodos:

Los espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN, aumento sin distorsión por transferencia de polarización (1D DEPT), espectroscopía de correlación total (TOCSY), correlación heteronuclear múltiple cuántica (HMQC), y correlación heteronuclear múltiple a un enlace (HMBC), se registraron en un espectrómetro Bruker Avance™ 500. Los desplazamientos químicos, indicados en ppm, son relativos al Me_4Si interno ($\delta = 0,0$) con CDCl_3 como disolvente, y a HOD (hidrógeno a demanda, $\delta = 4,63$) con D_2O como disolvente.

Los análisis por espectroscopía de masas se realizaron en un espectrómetro de masas Bruker Daltonix Apex 3 para condiciones de espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS), o en un espectrómetro de masas TSQ-70B (Finnigan Mat) y un espectrómetro de micromasas MALDI en condiciones MALDI-TOF usando una matriz de ácido α -ciano-4-hidroxycinnámico.

Las reacciones se controlaron por TLC sobre Gel de Sílice (Gel 60 F₂₅₄, 0,25 mm, Merck), y las manchas se visualizaron por carbonización con una solución de color amarillo que contenía $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (120 gramos) y $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (5 gramos) en H_2SO_4 al 10 % (800 ml).

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

Todas las reacciones se realizaron en una atmósfera de argón y usando disolventes anhidros, a menos que se indique otra cosa.

Todos los productos químicos, a menos que se indique otra cosa, se obtuvieron de proveedores comunes.

Resumen sintético general:

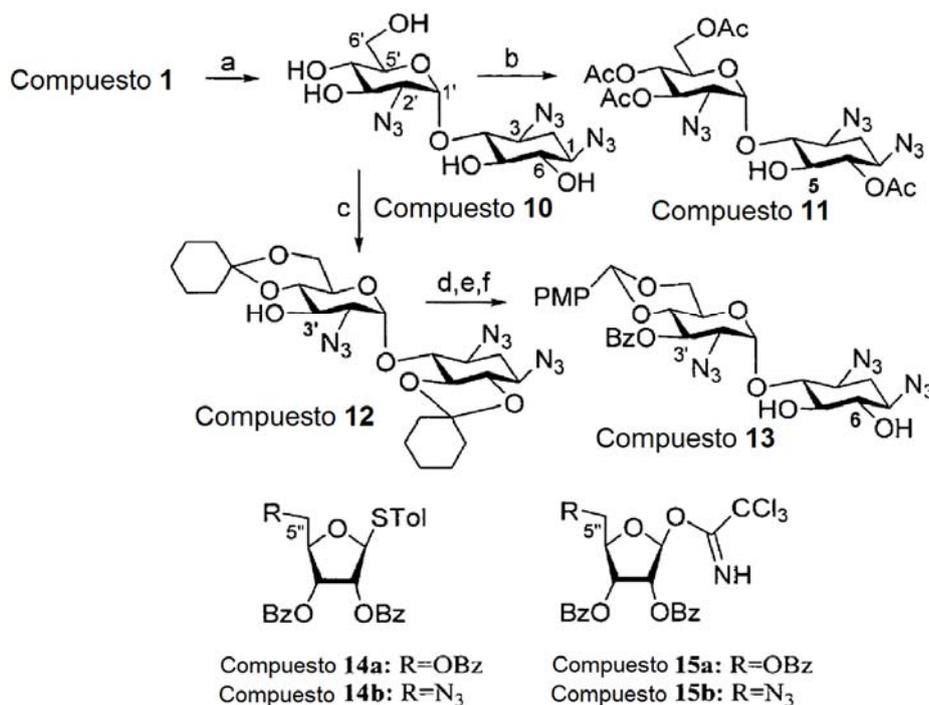
Una serie de nuevos compuestos se designaron de acuerdo con las presentes realizaciones para el tratamiento de enfermedades genéticas humanas causadas por mutaciones de terminación prematura. Todos los compuestos se obtuvieron a partir de paromamina, que se obtiene a partir de paromomicina.

Los Compuestos 2-9 se sintetizaron siguiendo las rutas presentadas en la figura 2. Como puede observarse en la figura 2, las síntesis básicas implican la escisión promovida por ácido de Lewis directa de paromomicina en la paromamina de disacárido, denominada en el presente documento como el Compuesto 1, que después se usa como un material de partida común para la preparación de los Compuestos designados. Los grupos protectores usados en las síntesis que se indican a continuación se escogieron basándose en su facilidad de unión y eliminación, y su estabilidad en condiciones de reacción. El método de glucosidación de tioglicósido usando N-yodosuccinimida (NIS)

[72] y el método de glucosidación del tricloroacetimidato usando BF_3 [73] demostró ser rápido y eficiente. Las protecciones de éster de benzoato en la posición C-2 de los donantes de ribofuranósido, los Compuestos 14a, 14b, 15a y 15b, (véase, el Esquema 1 a continuación) se diseñaron especialmente para permitir una formación de enlace β -glicósido selectivo entre el anillo III y el resto de paromamina a través de la participación del grupo adyacente en los Compuestos 2-7.

5

Esquema 1



10 Los reactivos y condiciones observadas en el Esquema 1 anterior incluyen: (a) TfN_3 , Et_3N , CuSO_4 , en 3:10:3 de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; (b) Ac_2O (4,2 equivalentes), piridina, -6°C ; (c) ciclohexanona dimetil cetal, CSA, DMF, 110°C ; (d) BzCl , piridina; (e) TFA/ H_2O 5:3, THF, 40°C ; (f) anisaldehído-dimetilacetato, CSA, DMF, 50°C ; y las abreviaturas son: Tf = trifluorometanosulfonilo, CSA = ácido canforsulfónico, DMF = dimetilformamida, Bz = benzoílo, TFA = ácido trifluoroacético, PMP = p-metoxifenilo.

15 La preparación de los Compuestos 2-7 empleó los tres aceptores de paromamina diferentes protegidos correctamente, es decir los Compuestos 11-13, que expusieron selectivamente los grupos hidroxilo del resto paromamina en las posiciones C5, C6 y C3', a reacciones de glucosidación, haciendo al hidroxilo C5 más susceptible de reaccionar y al hidroxilo C3' menos susceptible. Estas moléculasceptoras eran fácilmente accesibles desde la paromamina (Compuesto 1) como se ha ilustrado en el Esquema 1 anterior.

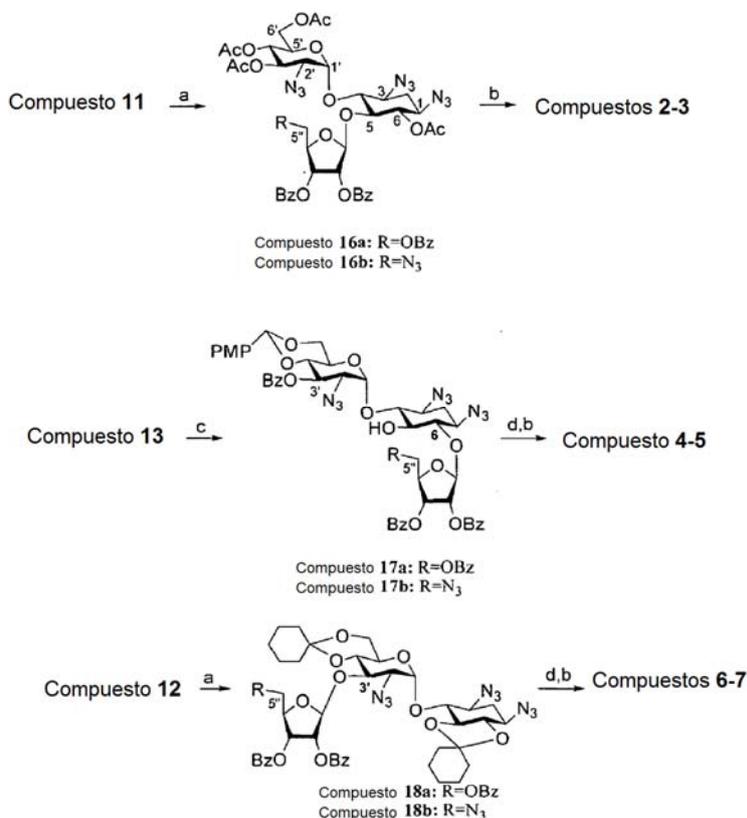
20 La acetilación regiosselectiva del Compuesto 10 con anhídrido acético a baja temperatura dio el Compuesto aceptor 11 con un rendimiento del 65 % [74]. En otra ruta, el tratamiento del Compuesto 10 con ciclohexanona dimetil cetal dio el segundo aceptor, el Compuesto 12, en el que todos los grupos funcionales, excepto el grupo hidroxilo en la posición C3', estaban protegidos. La benzoilación del Compuesto 12 se siguió de etapas de hidrólisis de ácido y formación de bencilideno acetal para proporcionar el tercer Compuesto aceptor 13 a un rendimiento aislado del 86 % para las tres etapas.

30 Después, los Compuestos aceptores de paromamina 11-13 se sometieron por separado a reacciones de glucosidación con dos etapas de donantes glucosilo, es decir, los Compuestos 14a-14b y los Compuestos 15a-b, para formar los derivados protegidos designados, los Compuestos 16-18 a un rendimiento total del 68-95 %, como se ilustra en el Esquema 2 a continuación. Como se presenta en el presente documento a continuación, las estructuras de los Compuestos 16-18 se confirmaron por la combinación de diversas técnicas espectroscópicas, incluyendo espectroscopía HMQC, HMBC, 2D-COSY, y 1D TOCSY RMN. Después, estos compuestos protegidos se sometieron a desprotección de dos o tres etapas: eliminación de todos los grupos éster por tratamiento con metilamina (solución al 33 % en EtOH), reducción de todos los grupos azida por la reacción de Staudinger, e hidrólisis de O-bencilideno acetal y ciclohexilideno cetal con ácido trifluoroacético acuoso, para formar los

35

Compuestos finales 2-7, como se observa en el Esquema 2 a continuación, con excelente pureza y rendimientos aislados.

Esquema 2



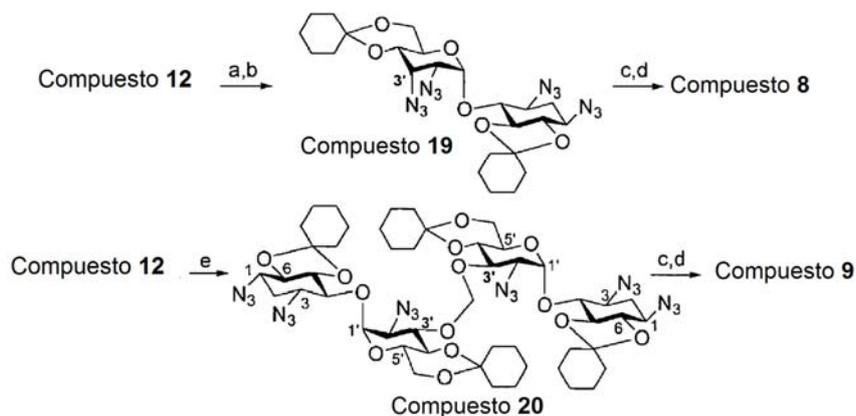
5 Los reactivos y condiciones observadas en el Esquema 2 anterior incluyen: (a) el Compuesto 15a o el Compuesto 15b, BF₃-Et₂O (cantidad catalítica), CH₂Cl₂, 4 Å de tamices moleculares, Compuesto 11 → Compuesto 16a (85 %), Compuesto 11 → Compuesto 16b (71 %), Compuesto 12 → Compuesto 18a (95 %), Compuesto 12 → Compuesto 18b (93 %); (b) (i) MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH), (ii) PMe₃ (1 M en THF), NaOH 0,1 M, THF, temperatura ambiente; (c) Compuesto 16a → Compuesto 2 (84 %), Compuesto 16b → Compuesto 3 (91 %), Compuesto 17a →

10 Compuesto 4 (en 2 etapas 75 %), Compuesto 17b → Compuesto 5 (44 %), Compuesto 18a → Compuesto 6 (84 %), Compuesto 18b → Compuesto 7 (75 %); (d) 6:1 de AcOH/H₂O, THF 50 °C para el Compuesto 17a, 3:2 de TFA/H₂O, THF, 60 °C para el Compuesto 17b (52 %), 10:3 de AcOH/H₂O, 1,4-dioxano, 70 °C para el Compuesto 18a (75 %), TFA/H₂O 5:1, THF, 50 °C para el Compuesto 18b (82 %); y las abreviaturas son: PMP = p-metoxifenilo, NIS = N-yodosuccinimida, Tf = trifluorometanosulfonilo, CSA = ácido canforsulfónico, DMF = dimetilformamida, Bz = benzoílo, TFA = ácido trifluoroacético.

20 El Esquema 3 a continuación ilustra la preparación de los Compuestos 8-9. El Anillo I en el Compuesto 8 que tiene una configuración *D-allo* se preparó a partir del Compuesto 1 invirtiendo selectivamente la configuración en la posición C3'. La trifilación del grupo hidroxilo en la posición C3' en el Compuesto 12 se siguió de un desplazamiento nucleófilo con azida para proporcionar el Compuesto *cis*-diazida correspondientes 19 a un rendimiento del 82 % para las dos etapas. La hidrólisis de los ciclohexilideno cetales con ácido acético acuoso seguido de una desprotección de dos etapas como se ha descrito anteriormente proporcionó el Compuesto designado 8 a un rendimiento del 68 %.

25 El tratamiento de el mismo Compuesto aceptor 12 con CH₂Br₂ en presencia de NaH dio el Compuesto dímero protegido 20 a un rendimiento del 82 %, después de lo cual la desprotección de tres etapas similar, como en el caso del Compuesto 19, proporcionó el Compuesto dímero deseado 9 a un rendimiento del 86 %.

Esquema 3

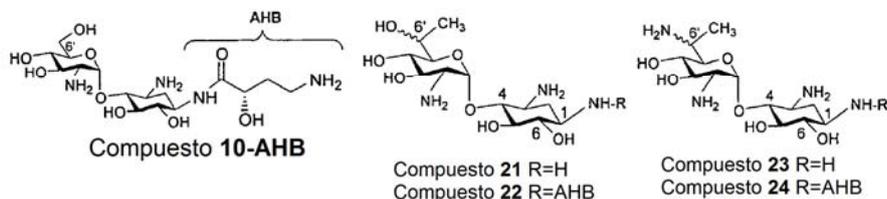


Los reactivos y condiciones observadas en el Esquema 2 anterior incluyen: (a) Tf_2O , piridina, (92 %); (b) NaN_3 , DMF, HMPA, (72 %) (c) para el Compuesto 19 8:1 de $\text{AcOH}/\text{H}_2\text{O}$, 1,4-dioxano, 75 °C, (60 %), para el Compuesto 20 5:6 de $\text{TFA}/\text{H}_2\text{O}$, THF, 60 °C, (90 %); (d) (i) MeNH_2 (solución al 33 % en EtOH), (ii) PMe_3 (1 M en THF), NaOH 0,1 M, THF, temperatura ambiente; Compuesto 19 \rightarrow Compuesto 8 (76 %), Compuesto 20 \rightarrow Compuesto 9 (81 %), (e) CH_2Br_2 , NaH , 2:1 de DMF/HMPA, 4 Å de tamices moleculares, (82 %), y las abreviaturas son: HMPA = hexametilfosforamida.

Basándose en el Compuesto 10, el Compuesto intermedio 10-AHB (véase, Esquema 4 a continuación) tiene el núcleo de paromamina, pero además contiene la sustitución (S)-4-amino-2-hidroxi-butirilo (AHB) en la posición N1. Se espera que la sustitución N1-AHB mejore adicionalmente tanto la actividad ininterrumpida como la toxicidad. Esta expectativa se sostiene por la reciente observación de que funciona mejor que la gentamicina para la restauración de la proteína CFTR [75]. La kanamicina A, que difiere de la amicacina únicamente por la ausencia de la sustitución AHB en la posición N-1, no muestra ninguna actividad ininterrumpida [6].

Los Compuestos intermedios 21 y 23 (véase, Esquema 4 a continuación) corresponden a G-418 y gentamicina respectivamente. Los Compuestos 21 y 23 se usan para preparar diastereómeros C6' separados y C6' diastereoméricos mixtos para conseguir mejor nefrotoxicidad y citotoxicidad. Aunque esta cuestión estereoquímica se ensayó en la gentamicina C_2 [64], no aparece ningún diastereómero C6' de G-418 en la bibliografía. Se añaden los grupos 3'-OH y 4'-OH al Compuesto 23 en un intento por reducir adicionalmente la toxicidad como se observa para la gentamicina C_2 . En intentos por modificar adicionalmente el anillo II en los Compuestos 21 y 23 para estudios de actividad estructural, los Compuestos intermedios 22 y 24, que combinan los grupos funcionales de G-418 y amicacina (correspondientes al Compuesto 22) o gentamicina y amicacina (correspondientes al Compuesto 24) en una molécula.

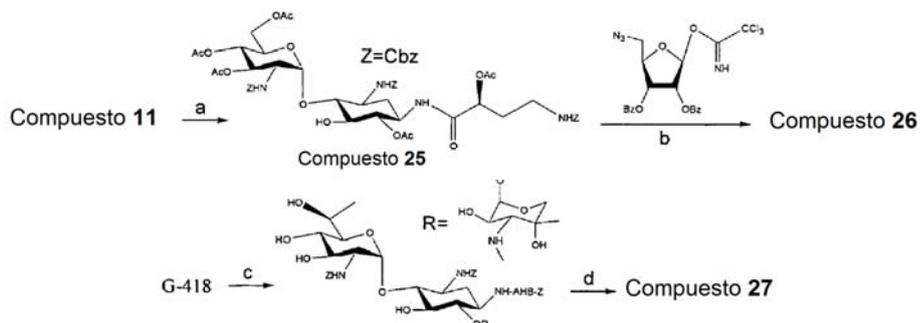
Esquema 4



La preparación de los cinco Compuestos 10-AHB, 21, 22, 23 y 24 comienza con paromamina (Compuesto 1) como un material de partida común, fácilmente accesible desde paromomicina [76]: La protección selectiva del Compuesto 1 en $\text{N}2'$ y $\text{N}3$ con Cbz se sigue del tratamiento con un éster activado de AHB (NOS-AHB-Cbz) de acuerdo con los procedimientos publicados [77-80], para proporcionar el derivado de N1-AHB correspondiente del Compuesto 1, y el tratamiento de este intermedio con Pd/H_2 proporciona el Compuesto 10-AHB.

Etapas similares para la introducción de AHB en paromamina 1 seguido de acetilación selectiva proporcionan el Compuesto aceptor $\text{C}5$ 25, y el acoplamiento del Compuesto 25 con el donante de tricloroacetamido de 5"-azidoribosa [76] seguido de etapas de desprotección proporciona el Compuesto pseudo-trisacárido diseñado 26, como se ilustra en el Esquema 5 a continuación. Etapas similares para la introducción de AHB en G-418 y etapas de desprotección posteriores proporcionan su Compuesto análogo N1-AHB 27 (véase, esquema 5).

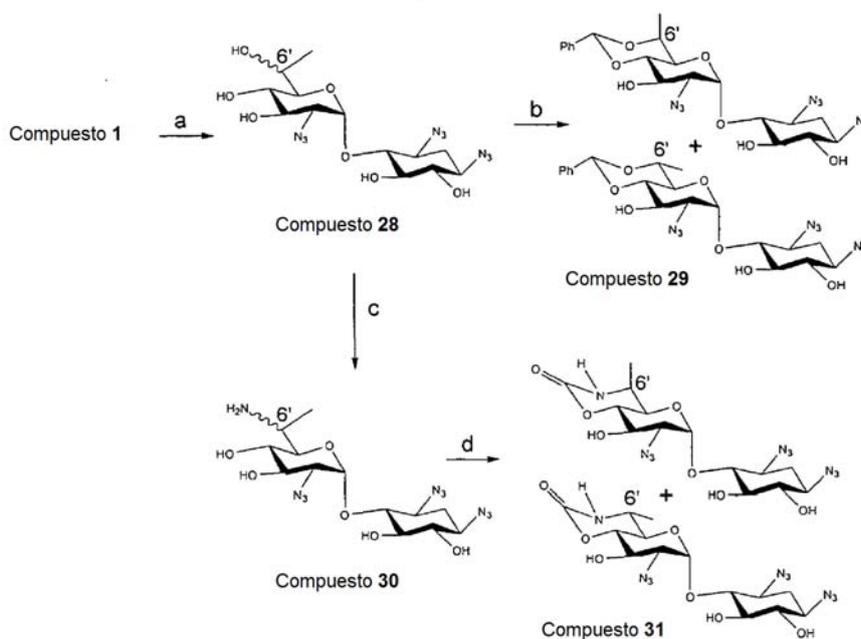
Esquema 5



- 5 Los reactivos y condiciones observadas en el Esquema 5 anterior incluyen: (a) (i) $\text{Cu}(\text{OAc})_2$, $\text{Ni}(\text{OAc})_2$, Cbz-NOS; (ii) NOS-AHB-Cbz, DCC, HOBT; (iii) 4,2 equiv. Ac_2O , Py, $-7\text{ }^\circ\text{C}$; (b) (i) $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$, DCM/MeCN; (ii) MeNH_2 (sol. al 33 % en EtOH); (iii) Pd/C, H_2 , dioxano, AcOH; (c) (i) $\text{Zn}(\text{OAc})_2$, Cbz-NOS; (ii) NOS-AHB-Cbz, DCC, HOBT; y (d) Pd/C, H_2 , dioxano, AcOH.

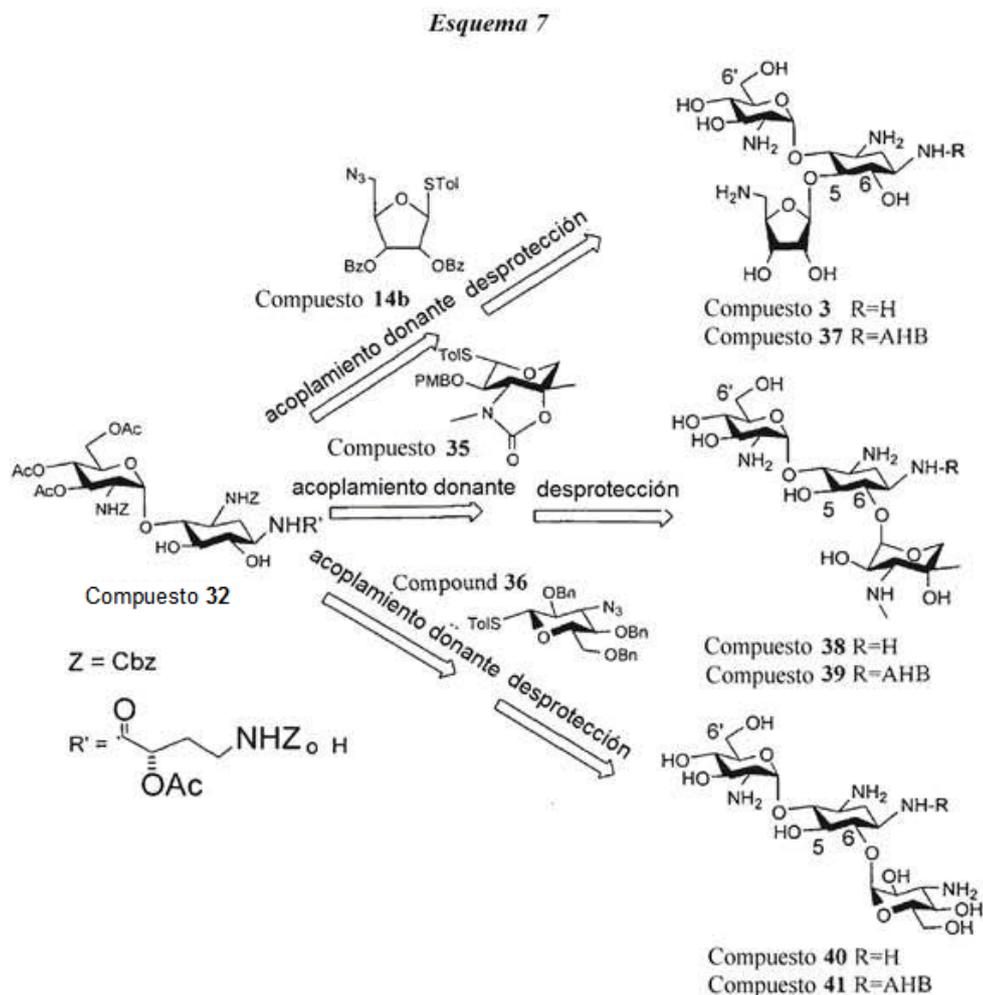
- 10 Para la preparación del Compuesto 21, la paromamina se somete a una secuencia de siete etapas para proporcionar el Compuesto 28 como una mezcla de diastereómeros C6', como se ilustra en el Esquema 6 a continuación. Para determinar la estereoquímica absoluta de estos diastereómeros, cada uno se trata con benzaldehído dimetil acetal para proporcionar los bencilideno acetales correspondientes, el Compuesto 29 con un grupo metilo C6' ecuatorial o axial. Los espectros NOE de estos grupos metilo con el protón C5' junto con la constante de acoplamiento del protón C6' en cada diastereómero permiten la determinación de la configuración absoluta en el centro C6'. De forma análoga, se determina la configuración absoluta en C6' del Compuesto derivado de gentamicina 23. A este efecto, el Compuesto 28 se convierte en primer lugar en el Compuesto amina correspondiente 30, que, después de la protección con Troc y el tratamiento con NaH, proporciona el Compuesto oxazolidinona cíclica correspondiente 31. Cada diastereómero del Compuesto 28 y el Compuesto 30 se somete posteriormente a una reacción de Staudinger seguido de un conjunto similar de reacciones como se ha mostrado en el Esquema 5 anteriormente en el presente documento, para proporcionar el Compuesto 22 y el Compuesto 24 de derivados de N1-AHB correspondientes.

Esquema 6



- 25 Los reactivos y condiciones observadas en el Esquema 6 anterior incluyen: (a) (i) TfN_3 , Cu(II); (ii) TIPSCI, Py; (iii) PMBCl, NaH, DMF; (iv) HF/Py; (v) oxidación de Swern; (vi) MeMgBr , Et_2O ; (vii) TFA; (b) $\text{Ph}(\text{OMe})_2$, CSA; (c) (i) ciclohexanona dimetil cetal, CSA; (ii) oxidación de Swern; (iii) NH_3 , NaBCNH₃, MeOH; (iv) AcOH, MeOH/ H_2O ; y (d) (i) TrocCl, DCM, Et_3N ; (ii) NaH, DMF;

Usando rutas sintéticas similares, se preparan tres series de compuestos, presentadas en el Esquema 7 y el Esquema 8 a continuación, usando los compuestos aceptores correspondientes para cada serie de los Compuestos, concretamente el Compuesto intermedio 32 (Esquema 7) para la primera serie, el Compuesto intermedio 33 para la segunda serie y el Compuesto intermedio 34 para la tercera serie (Esquema 8) y tres Compuestos donantes diferentes 14b, 35 y 36. Los Compuestos donantes 35 y 36 están especialmente diseñados con protecciones éter en posición C2-OH (p-metoxi bencilo en el Compuesto 35 y bencilo en el Compuesto 36) para permitir la formación de unión glucosídica 1,2-cis deseada.

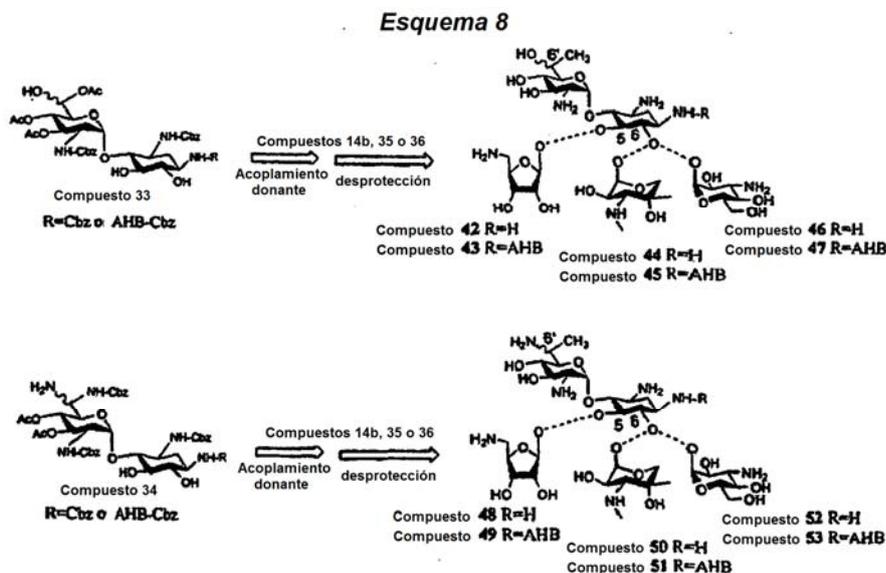


10 El Compuesto donante 35 se obtuvo con un buen rendimiento aislado a partir de gentamicina en la siguiente etapas: MeOH, AcCl, reflujo (rendimiento del 90 %); TrocCl, NaHCO₃, CHCl₃/H₂O (rendimiento del 93 %); BzCl, Py (rendimiento del 70 %); TolSH, BF₃-Et₂O (rendimiento del 53 %); MeNH₂ en EtOH (rendimiento del 90 %); NaH, PMBCl, TBAI (rendimiento del 82 %). La protección de oxazolidinona en el Compuesto 35 probó ser muy eficiente en condiciones de glucosidación convencionales. Este anillo de oxazolidinona experimenta apertura espontánea en condiciones de Staudinger básicas (NaOH) con calentamiento. Por lo tanto, como se ilustra en general en el Esquema 7 anterior, el acoplamiento del aceptor 32 con cualquiera de los donantes, 14b, 35 o 36 seguido de las etapas de desprotección, proporcionó los compuestos deseados 3, 37-41.

20 El Compuesto donante 35 se obtuvo con un buen rendimiento aislado a partir de gentamicina en la siguiente etapas: MeOH, AcCl, reflujo (rendimiento del 90 %); TrocCl, NaHCO₃, CHCl₃/H₂O (rendimiento del 93 %); BzCl, Py (rendimiento del 70 %); TolSH, BF₃-Et₂O (rendimiento del 53 %); MeNH₂ en EtOH (rendimiento del 90 %); NaH, PMBCl, TBAI (rendimiento del 82 %). La protección de oxazolidinona en el Compuesto 35 probó ser muy eficiente en condiciones de glucosidación convencionales. Este anillo de oxazolidinona experimenta apertura espontánea en condiciones de Staudinger básicas (NaOH) con calentamiento. Por lo tanto, como se ilustra en el Esquema 7 anterior, el acoplamiento del Compuesto aceptor 32 con cualquiera de los donantes, es decir, los Compuestos 14b, 35 o 36 seguido de las etapas de desprotección, proporciona los Compuestos deseados 3, 37-41.

25 De forma análoga, el acoplamiento de estos donantes, los Compuestos 14b, 35 y 36, con los aceptores apropiados, es decir, los Compuestos 33 o 34 (NIS, AgOTf, Et₂O/CH₂Cl₂) proporciona los compuestos protegidos

correspondientes que, después de las etapas de desprotección convencionales, proporciona los derivados unidos a C5 y C6 deseados de los Compuestos 42-53 como se ilustra en el Esquema 8 a continuación. Los Compuestos 44-47 y 50-53 son compuestos de referencia.

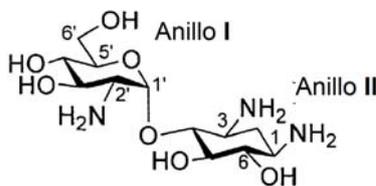


5

Los siguientes ejemplos presentan procedimientos sintéticos detallados para preparar compuestos que conducen a los Compuestos 2-9, como se ha expuesto en los Esquemas 1-3 anteriores. Los Compuestos 10 a 20c, cuya síntesis se ilustra a continuación, son compuestos de referencia.

10

Preparación de paromamina (Compuesto 1):



Compuesto 1

15 El Compuesto 1 se preparó por escisión promovida por ácido de Lewis directa de paromomicina de acuerdo con el procedimiento publicado de Swayze y colaboradores [74] con algunas modificaciones.

Se añadió acetilo (35 ml) a una solución agitada de metanol anhidro (215 ml) durante 10 minutos a 0 °C. Después de agitar durante aproximadamente 15 minutos, más, se añadió una muestra de sulfato de paromomicina disponible en el mercado (25 gramos, 31,0 mmol) y la reacción se calentó a 70 °C a reflujo. La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/MeNH₂ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió durante aproximadamente 2 horas en un congelador, se filtró, y el residuo se disolvió en una cantidad mínima de agua. Esta solución acuosa concentrada se añadió gota a gota a etanol frío (500 ml, 0 °C) y la emulsión resultante se puso en un congelador durante aproximadamente 2 horas. La mezcla se filtró y el residuo se secó al vacío para producir el Compuesto 1 en forma de un sólido de color blanco (12,5 g, rendimiento del 94 %).

25

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, D₂O, pH = 3,5) del Compuesto 1 se resumen en la Tabla 1 a continuación.

30

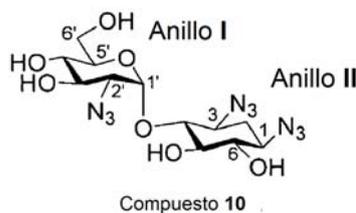
Tabla 1

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,54 d J = 4,0	3,28 dd J = 4,0,11,0	3,80 t J = 10,0	3,70- 3,74 m	3,35 t J = 9,0		3,78- 3,82 m	3,62 dd J = 4,0,12,0
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,16- 3,22 m	2,51 dt J = 4,5, 12,5	1,72 ddd J ₁ = J ₂ = J ₃ = 12,5	3,33- 3,39 m	3,47 t J = 9,5	3,54 t J = 9,0	3,72 t J = 9,5	

^{13}C (RMN 125 MHz, D_2O): δ = 30,6 (C-2), 50,6, 51,6, 55,9, 62,1 (C-6'), 71,0, 71,2, 74,3, 75,2, 76,6, 82,7, 98,8 (C-1');

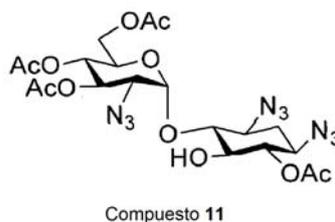
MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_7 \text{ Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 347,2; m/e medida: 347,2.

5 *Preparación del Compuesto 10:*



10 El Compuesto 10 se preparó a partir del Compuesto 1 (paromamina) de acuerdo con un procedimiento publicado [81] que realizó la conversión simultánea de todos los grupos amina del Compuesto 1 en los grupos azida correspondientes por tratamiento con TfN_3 para proporcionar el Compuesto 10 a un rendimiento del 90 %.

Preparación del Compuesto 11:

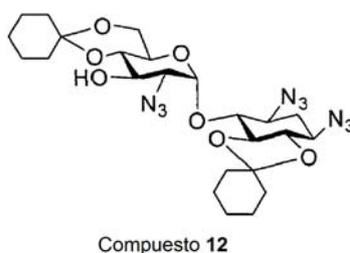


15 El Compuesto 11 se preparó a partir del derivado perazido, el Compuesto 10, mediante la acetilación regioselectiva con anhídrido acético a baja temperatura de acuerdo con el procedimiento publicado de Swayze y colaboradores [74] con las siguientes modificaciones.

20 El Compuesto 10 (2 gramos, 5 mmol), preparado de acuerdo con un procedimiento publicado [81], se disolvió en piridina seca (5 ml) y la mezcla resultante se enfrió a $-6\text{ }^\circ\text{C}$ y posteriormente a la misma se le añadió anhídrido acético (4,2 equivalentes, 2,65 ml). La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 2:3), que indicó la finalización después de 8 horas. La reacción se diluyó con EtOAc y se extrajo con HCl (2 %), NaHCO_3 acuoso saturado, y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 11 (1,84 gramos, rendimiento del 65 %).

25 MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_9\text{O}_{11} \text{ Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 592,2; m/e medida: 592,2.

30 *Preparación del Compuesto 12:*



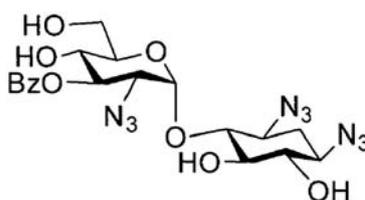
35 Se añadieron ciclohexanona dimetil cetal (30 ml, 200 mmol) y una cantidad catalítica de ácido canforsulfónico (CSA) a una solución de Compuesto 10 (8,9 gramos, 22,2 mmol) en DMF seca (30 ml). La reacción se agitó durante 1 hora a $50\text{ }^\circ\text{C}$ y la propagación se controló por TLC (EtOAc al 100 %), que indicó un consumo completo del material de partida. Posteriormente, la reacción se calentó a $110\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño de aceite y la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 2:3), que indicó la finalización de la reacción después de 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se extrajo con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 12 (8,5 gramos, rendimiento del 67 %).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,25-1,95 (m, 20H, ciclohexanonas), 1,47 (ddd, 1H, $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$ Hz, H-2 axial), 2,33 (dt, 1H, $J_1=5$, $J_2=14,5$ H-2 ecuatorial), 3,26 (dd, 1H, $J_1=3,5$ $J_2=13,5$ Hz, H-2'), 3,39 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-4), 3,47-3,55 (m, 2H, H-3, H-5), 3,55 (t, $J = 9,5$ Hz, 1H, H-5'), 3,62-3,68 (m, 1H, H-1), 3,75-3,82 (m, 1H, H-6'), 3,80 (t, $J = 9,0$ Hz 1H, H-6), 3,85-3,92 (m, 2H, H-4', H-6'), 4,07 (t, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-3'), 5,50 (d, 1H, $J = 4,0$ Hz, H-1').

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ = (el intervalo 22,4-37,8 se refiere a átomos de carbono de ciclohexanona si no se indica de otro modo) 22,5, 22,8, 23,7(2C), 24,9, 25,5, 27,8, 33,9, 36,0, 36,3, 37,8, 57,2, 60,4, 61,5 (C-6'), 61,9, 64,0, 68,7, 73,7, 76,8, 79,3, 79,4, 97,0 (C-1'), 99,1(OCO ciclohexanona cetal), 113,7 (OCO ciclohexanona cetal).

ESIMS calculada para $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_9\text{O}_7$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 584,3; m/e medida: 584,3.

Preparación del Compuesto 13e:



Compuesto 13e

El Compuesto 12 (2,5 gramos, 4,45 mmol) se disolvió en piridina seca (20 ml) seguido de la adición de 4-dimetilamonpiridina (0,5 gramos, 4,6 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se le añadió cloruro de benzoilo (1,3 ml, 0,9 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 1:4), que indicó la finalización después de aproximadamente 8 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se extrajo con HCl (2 %), H_2O y salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida.

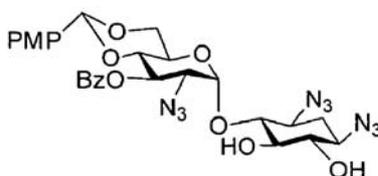
El residuo en bruto se disolvió en THF (20 ml) añadido con TFA (5 ml) y agua (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 40 °C durante 8 horas durante las cuales la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 7:3). La mezcla de reacción se purificó directamente por cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc/Hexano) sin ningún tratamiento adicional para producir el Compuesto 13e (2 gramos, rendimiento total del 89 %).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ = 1,49-1,53 (m, 1H, H-2 axial), 2,32-2,35 (m, 1H, H-2 ecuatorial), 3,34-3,44 (m, 4H, H-1, H-3, H-4 y H-5), 3,55-3,57 (m, 1H, H-6), 3,74-3,77 (m, 1H, H-2'), 3,86-3,93 (m, 3H, H-5' y 2H-6'), 4,10-4,14 (m, 1H, H-4'), 5,49 (d, 1H, $J = 3$ Hz, H-1') 5,59 (t, 1H, $J = 10$ Hz, H-3'), 7,48 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,62 (t, 1H, $J = 7$ Hz), 8,08 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): δ = 32,0 (C-2), 58,8, 59,6, 61,7 (C-6'), 62,3, 69,6, 72,6, 75,1, 75,5, 75,9, 83,2, 99,0(C-1'), 128,6(2C), 130,0(2C), 133,9, 167,3.

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_8$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 528,2; m/e medida: 528,2.

Preparación del Compuesto 13:



Compuesto 13

Se añadieron 1-(dimetoximetil)-4-metoxibenceno (1,3 ml, 7,6 mmol) y una cantidad catalítica de CSA a una solución de Compuesto 13e (1,93 gramos, 3,82 mmol) disuelto en DMF seca (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C y la propagación se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 1:1), que indicó la finalización después de 8 horas. La reacción se diluyó con EtOAc, se extrajo con NaHCO_3 saturado y salmuera, se secó sobre MgSO_4 y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 13 (2 gramos, rendimiento del 84 %).

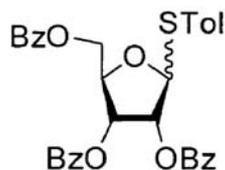
^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): δ = 1,47-1,53 (m, 1H, H-2 axial), 2,32-2,35 (m, 1H, H-2 ecuatorial), 3,33-3,45 (m, 4H, H-1, H-3, H-4 y H-5), 3,58-3,61 (m, 1H, H-6), 3,74-3,77 (m, 1H, H-2'), 3,75-3,81 (m, 2H, H-5' y H-6'), 3,76 (s, 3H,

OCH₃), 4,30-4,35 (m, 2H, H-4' y H-6'), 5,36 (d, 1H, J = 3,5 Hz, H-1'), 5,48 (s, 1H), 5,88 (t, 1H, J = 10 Hz, H-3'), 6,83 (d, 2H, J = 8,5 Hz), 7,33 (d, 2H, J = 9 Hz), 7,46 (t, 2H, J = 7,5 Hz), 7,59 (t, 1H, J = 7,5 Hz), 8,07 (d, 2H, J = 7,5 Hz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 31,9 (C-2), 55,2, 58,5, 59,7, 62,9 (C-5'), 63,6 (C-4'), 68,6 (C-6'), 70,5 (C-3'), 75,5, 75,8, 79,2, 83,2, 99,9 (C-1'), 101,5, 127,4 (4C), 128,4 (2C), 129,2 (2C), 129,9 (2C), 133,4, 160,0, 165,5.

MALDI TOFMS calculada para C₂₇H₂₉N₉O₉ Na ([M+Na]⁺) m/e: 623,2; m/e medida: 623,2.

Preparación de *p*-Metilfenil-2,3,5-tri-*O*-benzoil-1-tio-*D*-ribofuranosa (Compuesto 14a):



Compuesto 14a

Se añadieron 4-metilbencenotiol (0,6 gramos, 4,83 mmol) y BF₃-Et₂O (1,5 ml) a una solución de 1-*O*-Acetil-2,3,5-tri-*O*-benzoil-β-*D*-ribofuranosa (2,0 gramos, 3,96 mmol) disuelta en CH₂Cl₂ (25 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente en una atmósfera de argón. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 1:4), que indicó la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (200 ml), se neutralizó con NaHCO₃ saturado y se lavó con salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 14a (2,0 gramos, rendimiento del 89 %) en forma de una mezcla de anómeros (3:5 de α/β).

Análisis espectral del α-anómero:

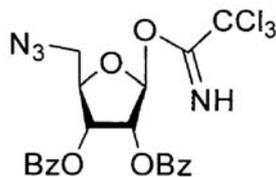
¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 2,23 (s, 3H, Me-STol), 4,50 (dd, 1H, J₁ = 3,5, J₂ = 9,0 Hz, H-5'), 4,64 (m, 2H, H-4 y H-5), 5,56 (d, 1H, J = 5,0 Hz, H-1), 5,66 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H-2), 5,73 (t, 1H, J = 5,0 Hz, H-3), 7,06-8,11 (19H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 21,1 (Me-STol), 64,3 (C-5), 72,4 (C-3), 74,3 (C-2), 80,4 (C-4), 88,0 (C-1), 128,4-166,2 (27C).

Análisis espectral del β-anómero:

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 2,33 (s, 3H, Me-STol), 4,63 (dd, 1H, J₁ = 3,5, J₂ = 14,0 Hz, H-5), 4,74 (dd, 1H, J₁ = 3,0, J₂ = 12,0 Hz, H-5'), 4,88 (dd, 1H, J₁ = 4,5, J₂ = 8,0 Hz, H-4), 5,80-5,83 (m, 2H, H-2, H-3), 6,05 (d, 1H, J = 5,0 Hz, H-1), 7,06-8,11 (19H); ¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 21,1 (Me-STol), 63,8 (C-5), 71,6 (C-3), 72,2 (C-2), 79,0 (C-4), 90,8 (C-1), 128,4-166,2 (27C).

MALDI TOFMS calculada para C₃₃H₂₈O₇S Na ([M+Na]⁺) m/e: 591,2; m/e medida: 591,3.

Preparación de 5-desoxi-5-azido-2,3-di-*O*-benzoil-1-*O*-tricloroacetamido-*D*-ribofuranosa (Compuesto 15b)



Compuesto 15b

Se añadió *N*-bromosuccinimida (NBS, 0,8 g, 4,41 mmol) a una solución de Compuesto 14b (1,8 gramos, 3,67 mmol), preparado de acuerdo con un procedimiento publicado [82], en acetona (30 ml) enfriada a -10 °C, y la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 3:7), que indicó la finalización después de 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (200 ml) y se lavó con NH₄Cl y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO₄ y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida (gel de sílice, EtOAc/Hexano) para proporcionar el alcohol anomérico deseado.

El alcohol intermedio se disolvió en CH₂Cl₂ seco (10 ml) y al mismo se le añadieron CCl₃CN (1,7 ml, 11,8 mmol) y K₂CO₃ (200 mg, 1,4 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente y la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 3:7), que indicó la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, y se filtró a través de celite. El celite se lavó vigorosamente con CH₂Cl₂, y se evaporó a sequedad para producir el Compuesto 15b (1,89 gramos, rendimiento total del 97 %) en forma de una mezcla de anómeros (1:9 de α/β).

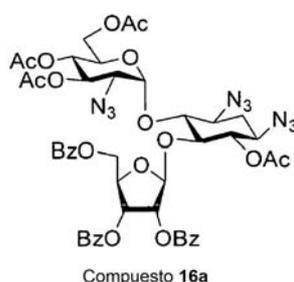
Análisis espectral del α-anómero:

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 3,63 (dd, 1H, J₁ = 5,0, J₂ = 13,5 Hz, H-5), 3,73 (dd, 1H, 1H, J₁ = 3,5, J₂ = 13,5 Hz, H-5'), 4,64-4,68 (m, 1H, H-4), 5,76 (dd, 1H, J₁ = 5,0, J₂ = 6,5 Hz, H-3), 5,94 (d, 1H, J = 5,0 Hz, H-2), 6,57 (s, 1H, H-1), 7,31-8,15 (10H), 8,72 (s, 1H);

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 52,9 (C-5), 71,9 (C-3), 74,8 C-2), 81,9 (C-4), 102,6 (C-1), 128,4-133,6 (10C), 160,4, 165,0, 165,4.

ESIMS calculada para C₁₉H₁₇N₃O₆ Na ([M-C₂NCl₃+Na]⁺) m/e: 406,1; m/e medida: 406,1.

Preparación del Compuesto 16a:



Se añadió CH₂Cl₂ anhidro (5 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 11 (300 mg, 0,527 mmol), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento, y el Compuesto donante 15a (1,15 gramos, 1,896 mmol), preparado de acuerdo con un procedimiento publicado [82]. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrió a -40 °C. Posteriormente, a la mezcla de reacción se le añadió una cantidad catalítica de BF₃-Et₂O (10 μl) y la agitación continuó a -15 °C. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 3:7), que indicó la finalización después de 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂, y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con CH₂Cl₂, los lavados se combinaron, se extrajeron con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 16a (452 mg, rendimiento del 85 %).

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del Compuesto 16a se resumen en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2

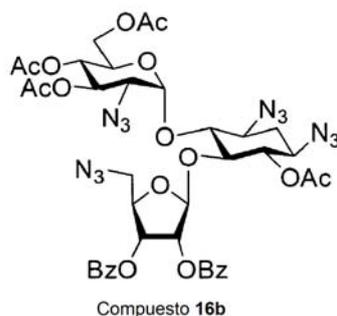
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,69 d J = 4,0	3,44 dd J = 4,0, 10,5	5,33 t J = 9,5, 10,5	5,01 t J = 10,0	4,42-4,45 m		4,12 dd J = 4,5, 12,0	4,20 dd J = 4,5, 12,5
III	5,56 S	5,63 d J = 4,5	5,71-5,74 m	4,67 - 4,70 m	4,36 dd J = 3,5, 12,0	5,04 dd J = 3,0, 12,0		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,32- 3,39 m	2,31 dt J = 5,0, 13,0	1,37 ddd J ₁ = J ₂ = 12,0 J ₃ = 13,0	3,32- 3,39 m	3,16 t J = 9,0	3,74 t J = 10,0	4,74 t J = 10,0	

Los datos adicionales de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) para el Compuesto 16a incluían: δ = 2,03 (s, 3H, Ac), 2,06 (s, 3H, Ac), 2,12 (s, 3H, Ac), 2,33 (s, 3H, Ac), 7,35 (t, 2H, J = 8, 7,5 Hz, Bz), 7,41 (t, 2H, J = 7,5, 8 Hz, Bz), 7,49-7,62 (m, 5H, Bz), 7,89 (d, 2H, J = 7,5, Bz), 7,95 (d, 2H, J = 7, Bz), 8,14 (d, 2H, J = 7, Bz).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 20,6, 20,7, 20,8, 21,0, 31,4 (C-2), 58,2, 58,4, 61,8, 62,0 (C-6'), 62,6 (C-5''), 67,9, 68,2, 70,8, 71,2, 73,8, 74,7, 77,9, 79,5, 80,4, 96,4 (C-1'), 107,6 (C-1''), 128,4 (2C), 128,6 (3C), 128,7, 128,9, 129,7 (3C), 129,8 (3C), 130,3 (2C), 133,3, 133,5, 133,7, 165,2, 165,4, 166,2, 169,7, 170,1 (2C), 170,7.

MALDI TOFMS calculada para C₄₆H₄₇N₉O₁₈ K ([M+K]⁺) m/e: 1052,3; m/e medida: 1052,4.

Preparación del Compuesto 16b:



5 Se añadió CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 11 (300 mg, 0,527 mmol) y el Compuesto donante 15b (1 gramo, 1,896 mmol), ambos de los cuales se prepararon como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrió a -40°C . Posteriormente, a la mezcla de reacción se le añadió una cantidad catalítica de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (10 μl) y la agitación continuó a -15°C . La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 3:7), que indicó la finalización después de 1,5 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con CH_2Cl_2 , los lavados se combinaron, se extrajeron con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 16b (350 mg, rendimiento del 71 %).

15 Los datos de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Compuesto 16b se resumen en la Tabla 3 a continuación.

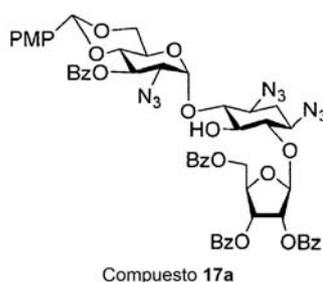
Tabla 3

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,84 d $J = 4,0$	3,56-3,59 m	5,41 t $J = 9,5$	5,07 t $J = 9,5$	4,52-4,55 m		4,15-4,18 m	4,25-4,29 m
III	5,66 s	5,58 d $J = 4,5$	5,39-5,46 m	4,49-4,55 m	3,56-3,61 m	3,56-3,61 m		
II	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
	3,49-3,55 m	2,41 dt $J = 5,0, 12,5$	1,61 ddd $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$	3,49-3,55 m	3,73 t $J = 9,5$	3,88 t $J = 9,5$	5,02 t $J = 10,0$	

20 Los datos adicionales de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) para el Compuesto 16b incluían: $\delta = 2,05$ (s, 3H,Ac), 2,09 (s, 3H, Ac), 2,10 (s, 3H, Ac), 2,31 (s, 3H, Ac), 7,34-7,39 (m, 2H, Bz), 7,40-7,43 (m, 2H, Bz), 7,52-7,61 (m, 2H, Bz), 7,88 (d, 2H, $J = 8$, Bz), 7,95 (d, 2H, $J = 8,5$, Bz).

25 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 20,6, 20,7, 20,8, 20,9, 31,7$ (C-2), 52,1 (C-5''), 58,3, 58,6, 61,7, 61,8 (C-6'), 68,1, 68,2, 70,8, 71,0, 73,9, 74,6, 77,8, 79,8, 80,8, 96,7 (C-1'), 107,6 (C-1''), 128,5 (3C), 128,6 (2C), 128,8, 129,6 (4C), 133,6, 133,7, 165,2, 165,4, 169,8, 170,0 (2C), 170,7. MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{39}\text{H}_{42}\text{N}_{12}\text{O}_{16}$ $\text{Na}([\text{M}+\text{Na}]^+)$ m/e 957,3; m/e medida 957,5.

Preparación del Compuesto 17a:



35 Se añadió CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (800 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 13 (420 mg, 0,674 mmol) y el Compuesto donante 14a (334 mg, 0,808 mmol), ambos de los cuales se prepararon como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después a la mezcla de reacción se le añadió N-

yodosuccinimida (NIS, 290 mg, 0,129 mmol) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a la misma se le añadió una cantidad catalítica de TfOH (10 μl). La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 2:3), que indicó la finalización después de 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con EtOAc, los lavados se combinaron, se extrajeron con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 %), NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 17a (490 mg, rendimiento del 68 %).

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Compuesto 17a se resumen en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

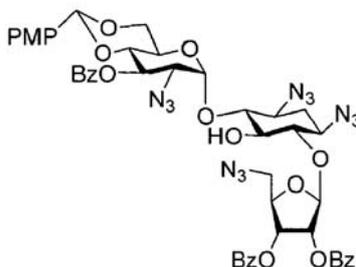
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,42 d $J = 4,0$	3,72-3,75 m	5,89 t $J = 10,0$	4,31-4,36 m	3,79 m $J=9,5$		3,76-3,79 m	4,31-4,36 m
III	5,78 s	5,78 s	5,84 t $J = 5,5$	4,77-4,80 m	4,77-4,80 m	4,69 dd $J = 7,0, 12,5$		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,31-3,43 m	2,33-2,37 m	1,46-1,54 m	3,31-3,43 m	3,31-3,43 m	3,71-3,75 m	3,59 t $J = 9,5$	

Los datos adicionales de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) para el Compuesto 17a incluían: $\delta = 5,49$ (s, 1H), 7,32-7,61 (m, 14H), 7,89 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,92 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz), 7,99 (d, 2H, $J = 7,0$ Hz), 8,07-8,09 (m, 4H).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 32,0$ (C-2), 55,2 (CH_3), 58,2, 58,8, 62,7, 63,5, 65,1 (C-6'), 68,6 (C-5''), 70,4, 72,3, 75,7, 76,1, 79,1, 79,3, 80,8, 82,9, 99,8 (C-1'), 101,5, 106,5 (C-1''), 113,5 (2C), 127,4-133,5 (27C), 160,0, 165,3 (2C), 165,6, 166,1.

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{53}\text{H}_{49}\text{N}_9\text{O}_{16}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 1090,3; m/e medida: 1090,3.

Preparación del Compuesto 17b:



Compuesto 17b

Se añadió CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 13 (350 mg, 0,561 mmol) y el Compuesto donante 14b (334 mg, 0,682 mmol), ambos de los cuales se prepararon como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después, a la mezcla de reacción se le añadió NIS (290 mg, 0,129 mmol) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción se enfrió a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y a la misma se le añadió una cantidad catalítica de TfOH (10 μl). La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 2:3), que indicó la finalización después de 2 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con EtOAc, los lavados se combinaron, se extrajeron con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 %), NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 17b en forma de una mezcla de anómeros a una relación 1:5 de α/β (420 mg, rendimiento del 76 %).

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Compuesto 17b se resumen en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

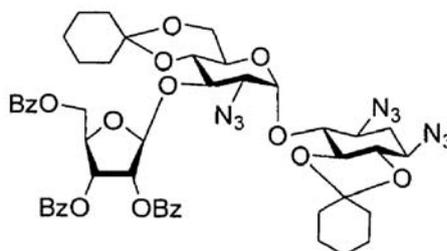
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,39 d $J = 3,5$	3,70-3,73 m	5,59 t $J = 10,0$	4,10-4,13 m	3,88 t $J = 9,5$		3,90-3,92 m	3,90-3,92 m
III	5,80 s	5,71 d $J = 5,0$	5,62-5,65 m	4,54-4,56 m	3,63-3,65 m	3,74-3,79 m		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,33-3,40 m	2,332,3 7 m	1,49-1,57 m	3,45-3,50 m	3,33-3,40 m	3,74-3,79 m	3,62 t $J = 8,5$	

Los datos adicionales de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) para el Compuesto 17b incluían: $\delta = 5,50$ (s, 1H), 7,34 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,39 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,45 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,51-7,61 (m, 3H), 7,89 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,98 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,07 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 31,9$ (C-2), 53,1 (C-5"), 55,1, 58,7, 62,7, 63,4, 68,5 (C-6'), 70,4, 72,2, 75,6, 76,1, 79,1 (2C), 83,1, 99,9 (C-1'), 101,4, 105,9 (C-1"), 113,4 (2C), 127,3-133,5 (21C), 159,9, 165,2 (2C), 165,3.

10 MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{46}\text{H}_{44}\text{N}_{12}\text{O}_{14}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 1011,3; m/e medida: 1011,6.

Preparación del Compuesto 18a:



Compuesto 18a

Se añadió CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 12 (200 mg, 0,356 mmol) y el Compuesto donante 15a (300 mg, 0,494 mmol), ambos de los cuales se prepararon como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrió a -40 °C. Posteriormente, a la mezcla de reacción se le añadió una cantidad catalítica de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (10 μl) y la agitación continuó a -20 °C. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 15:85), que indicó la finalización después de 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con CH_2Cl_2 , los lavados se combinaron, se extrajeron con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 18a (340 mg, rendimiento del 95 %).

25 Los datos de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Compuesto 18a se resumen en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

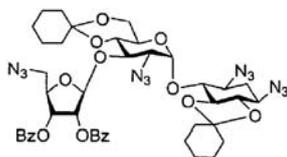
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,12 d $J = 3,5$	3,35-3,37 m	3,91-3,96 m	3,51-3,54 m	3,91-3,96 m		3,75-3,83 m	3,75-3,83 m
III	5,55 s	5,75 d $J = 4,5$	5,87 t $J = 5,0$	4,77-4,81 m	4,57 dd $J = 5,0, 12,5$	4,93 dd $J = 4,0, 12,5$		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,23-3,28 m	2,30 dt $J = 4,0, 13,5$	1,47 ddd $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$	3,38-3,52 m	3,23-3,28 m	3,38-3,52 m	3,38-3,52 m	

Los datos adicionales de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) para el Compuesto 18a incluían: $\delta = 1,25$ -1,30 (m, 5H), 1,62-1,89 (m, 15H), 7,34-7,61 (m, 9H, aromático), 7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,02 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,11 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 24,7$ (2C), 26,8(4C), 31,9 (C-2), 41,8(4C), 52,6, 58,6, 59,4, 61,9 (C-5"), 62,5, 63,6 (C-6'), 69,2, 71,4, 71,8, 75,1, 75,2, 75,7, 76,0, 81,2, 83,6, 85,0, 98,8 (C-1'), 107,2 (C-1"), 128,3-129,7 (15C), 133,4, 133,5 (2C), 165,0, 165,2, 166,1.

ESIMS calculada para $\text{C}_{50}\text{H}_{55}\text{N}_9\text{O}_{14}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 1044,4; m/e medida: 1044,4.

Preparación del Compuesto 18b:



Compuesto 18b

5 Se añadió CH_2Cl_2 anhidro (5 ml) se añadió a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg) seguido de la adición del Compuesto aceptor 12 (340 mg, 0,605 mmol) y el Compuesto donante 15b (600 mg, 1,107 mmol), ambos de los cuales se prepararon como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después se enfrió a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.
 10 Posteriormente, a la mezcla de reacción se le añadió una cantidad catalítica de $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$ (10 μl) y la agitación continuó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 15:85), que indicó la finalización después de 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 , y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con CH_2Cl_2 , los lavados se combinaron, se extrajeron con NaHCO_3 acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO_4 y se concentraron. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 18b (520 mg, rendimiento del 93 %).

15 Los datos de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) del Compuesto 18b se resumen en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7

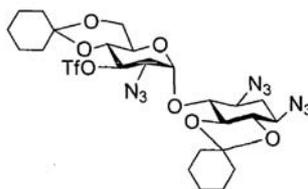
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,51 d $J = 3,5$	3,36-3,39 m	4,22 t $J = 10,5$	3,99 ddd $J = 5,0, 10,5, 15,0$	3,73-3,79 m		3,73-3,80 m	3,53 dd $J = 5,0, 10,5$
III	5,70 S	5,64-5,69 m	5,64-5,69 m	4,52 ddd $J = 3,5, 10,5, 14,5$	3,87 dd $J = 7,0, 13,0$	3,53 dd $J = 3,5, 13,0$		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,52 ddd $J = 4,5, 10,0, 14,0$	2,36 dt $J = 5,0, 13,5$	1,61 ddd $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$	3,66 ddd $J = 4,5, 11,0, 15,0$	3,40 t $J = 9,5$	3,50-3,55 m	3,76-3,80 m	

20 Los datos adicionales de ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) para el Compuesto 18b incluían: $\delta = 7,33$ (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, Bz), 7,44 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, Bz), 7,52 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz, Bz), 7,59 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz, Bz), 7,87 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Bz), 8,03 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz, Bz).

25 ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta =$ (C de 22,4-37,8 de ciclohexanonas) 22,4, 22,6, 23,7 (2C), 24,8, 25,5, 27,9, 33,9 (C-2), 36,0, 36,3, 37,8, 51,9 (C-5''), 57,2, 60,5, 61,6 (C-6'), 63,2, 64,4, 72,2, 72,3, 75,5, 79,2, 79,3, 80,8, 83,1, 84,1, 97,0 (C-1'), 100,3 (OCO ciclohexanona cetal), 105,0 (C-1''), 113,7 (OCO ciclohexanona cetal), 128,4-133,8 (12C), 165,2, 165,4.

30 MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{43}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_{12}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 949,4; m/e medida: 949,3.

Preparación del Compuesto 19a:



Compuesto 19a

35 El Compuesto 12 (300 mg, 0,534 mmol) se disolvió en CH_2Cl_2 (3 ml) y se añadió a piridina seca (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se enfrió a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ en un baño de hielo, y a la misma se

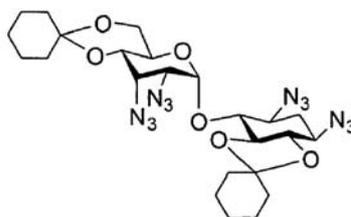
le añadió gota a gota anhídrido trifílico (Tf₂O, 300 mg, 1,067 mmol) durante 5 minutos. El baño de hielo se retiró después de 15 minutos y la mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente. La propagación de la reacción se controló por TLC (1:4 de EtOAc/Hexano), que indicó la finalización después de 1,5 horas. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂, y se extrajo con NaHCO₃ acuoso saturado, HCl (2 %) y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 19a (340 mg, rendimiento del 92 %).

¹H RMN (500 MHz, CDCl₃): δ = 1,25-1,71 (m, 20H, ciclohexanonas), 1,51 (ddd, 1H, J₁ = J₂ = J₃ = 12,5 Hz, H-2 axial), 2,39 (dt, 1H, J₁ = 5,0, J₂ = 14,0 H-2 ecuatorial), 3,36 (dd, 1H, J₁ = 4,0 J₂ = 10,0 Hz, H-2'), 3,41 (t, J = 9,5 Hz, 1H, H-4), 3,51-3,55 (m, 1H, H-3), 3,58 (t, 1H, J₁ = 9,5, J₂ = 10,0 Hz, H-5), 3,66-3,70 (m, 1H, H-1), 3,80 (t, 1H, J = 9,5 Hz, H-6), 3,78-3,84 (m, 2H, H-5', H-6'), 3,96 (dd, 1H, J₁ = 5,0 J₂ = 1,0 Hz, H-6'), 4,00-4,05 (m, 1H, H-4'), 5,07 (t, 1H, J = 10,0 Hz, H-3'), 5,63 (d, 1H, J = 3,5 Hz, H-1').

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = (el intervalo 22,4-37,6 se refiere a átomos de carbono en los anillos ciclohexano si no se indica de otro modo) 22,1, 22,2, 23,7(2C), 24,8, 25,5, 27,7, 33,7 (C-2), 36,0, 36,3, 37,6, 57,2, 60,2, 61,0, 61,3 (C-6'), 64,4, 70,9, 77,7, 78,1, 78,3, 79,2, 83,2 (C-3'), 97,7 (C-1'), 100,7 (OCO ciclohexanona cetal), 114,0 (OCO ciclohexanona cetal).

ESIMS calculada para C₂₅H₃₄F₃N₉O₉S Na ([M+Na]⁺) m/e: 716,2; m/e medida: 716,2.

Preparación del Compuesto 19:



Compuesto 19

El Compuesto 19a (330 mg, 0,476 mmol), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento, se disolvió en DMF (2 ml) y hexametilfosforamida (HMPA, 1 ml), seguido de la adición de NaN₃ (310 mg, 4,77 mmol), y la mezcla de reacción se agitó a 80 °C. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 15:85), que indicó la finalización después de 2 horas. La reacción se diluyó con CH₂Cl₂, se extrajo con salmuera, se secó sobre MgSO₄ y se concentró a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 19 (200 mg, rendimiento del 72 %).

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del Compuesto 19 se resumen en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8

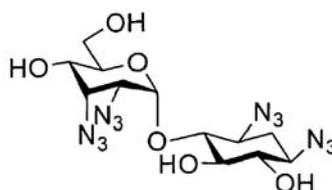
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,44 d J = 4,0	3,17 t J = 4,0	4,18 t J = 3,5	4,30- 4,36 m	3,72- 3,78 m		3,72- 3,78 m	3,97 dd J = 6,0, 11,0
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,63- 3,66 m	2,36 dt J = 5,0, 13,5	1,48 ddd J ₁ = J ₂ = J ₃ = 12,5	3,53- 3,57 m	3,38 t J = 9,5	3,59 t J = 9,5	3,75 t J = 9,5	

Los datos adicionales de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) para el Compuesto 19 incluían: δ = 1,26-1,93 (m, 20H, anillos ciclohexano).

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = (el intervalo 22,6-37,6 se refiere a átomos de carbono en los anillos ciclohexano si no se indica de otro modo) 22,6(2C), 23,7(2C), 24,9, 25,5, 27,8, 34,2 (C-2), 35,9, 36,3, 37,6, 56,9, 57,3, 59,8, 60,4, 60,8, 61,4 (C-6'), 70,9, 77,1, 79,3(2C), 96,5 (C-1'), 100,0 (OCO ciclohexanona cetal), 113,6 (OCO ciclohexanona cetal).

ESIMS calculada para C₂₄H₃₄N₁₂O₆ Na ([M+Na]⁺) m/e: 609,3; m/e medida: 609,3.

Preparación del Compuesto 19c:



Compuesto 19c

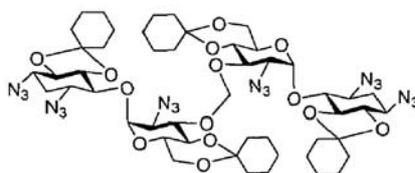
El Compuesto 19 (200 mg, 0,352 mmol), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento, se disolvió en dioxano (3 ml) y se añadió a ácido acético (8 ml) y agua (1 ml), y la mezcla de reacción se agitó a 75 °C. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 7:3), que indicó la finalización después de 3 horas. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc, se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO₄, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 19c (90 mg, rendimiento del 60 %).

¹H RMN (500 MHz, MeOD): δ = 1,41 (ddd, 1H, J₁ = J₂ = J₃ = 12,5 Hz, H-2 axial), 2,39 (dt, 1H, J₁ = 4,5, J₂ = 13,0 Hz, H-2 ecuatorial), 3,27 (t, 1H, J = 9,0 Hz, H-4), 3,33 (t, 1H, J = 4,0 Hz, H-2'), 3,35-3,50 (m, 3H, H-1, H-3 y H-6), 3,43 (d, 1H, J = 3,5 Hz, H-4'), 3,54 (t, 1H, J = 9,5 Hz, H-5'), 3,80 (t, 1H, J = 9,5 Hz, H-6), 3,79-3,81 (m, 2H, H-6'), 4,14-4,16 (m, 1H, H-3'), 5,55 (d, 1H, J = 4,0 Hz, H-1').

¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = 31,8 (C-2), 57,2, 59,2, 59,7, 60,3 (C-6'), 63,3, 66,2, 67,3, 75,8, 75,9, 78,8, 96,5 (C-1').

MALDI TOFMS calculada para C₁₂H₁₉N₁₂O₆ ([M+H]⁺) m/e: 427,3; m/e medida: 427,3.

Preparación del Compuesto 20:



Compuesto 20

Se añadió una mezcla seca de DMF/HMPA (2:1, 3 ml) a 4 Å de tamices moleculares en polvo secados a la llama (500 mg), seguido de la adición del dibromometano (19 µl, 0,26 mmol) y el Compuesto aceptor 12 (290 mg, 0,516 mmol) que se preparó como se ha presentado anteriormente en el presente documento. La mezcla de reacción se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se enfrió a -10 °C, y después a la misma se le añadió NaH (19 mg, 0,792 mmol). Después de 15 minutos de agitación, la mezcla de reacción se calentó a 40 °C. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 15:85), que indicó la finalización después de 2 horas. La reacción se diluyó con EtOAc, y se filtró a través de celite. Después de un lavado exhaustivo del celite con EtOAc, los lavados se combinaron, se extrajeron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄ y se concentraron a presión reducida. El producto en bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida para producir el Compuesto 20 (240 mg, rendimiento del 82 %).

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) del Compuesto 20 se resumen en la Tabla 9 a continuación.

Tabla 9

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,49 d J = 8,5	3,33 dd J = 3,0, 14,0	4,09 t J = 4,5	3,63-3,67 m	3,88-3,93 m		3,75-3,80 m	3,88-3,93 m
II	3,62-3,67 m	2,33 dt J = 5,0, 13,5	1,47 ddd J ₁ = 12 J ₂ = J ₃ = 13,0	3,43-3,46 m	3,39 t J = 10	3,53 t J = 9,5	3,75-3,80 m	

Los datos adicionales de ¹H RMN (500 MHz, CDCl₃) para el Compuesto 20 incluían: δ = 1,23-1,70 (m, 40H, anillos ciclohexano), 5,21 (s, 2H, H-1'').

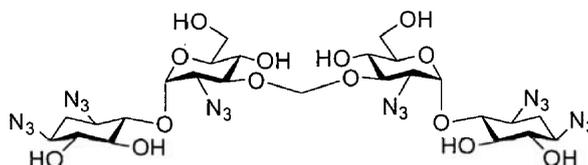
¹³C RMN (125 MHz, CDCl₃): δ = (el intervalo 22,4-37,6 se refiere a átomos de carbono en los anillos ciclohexano si no se indica de otro modo) 22,4, 23,5(2C), 24,7, 25,4, 27,5 (C-2), 33,7, 35,8, 36,1, 37,6, 57,0, 60,4, 61,5 (C-6'), 62,1,

63,9, 73,6, 74,1, 78,0, 78,2, 96,6 (C-1" mitad de otro), 97,0 (C-1'), 99,6(OCO ciclohexanona cetal), 115,4 (OCO ciclohexanona cetal).

MALDI TOFMS calculada para $C_{49}H_{70}N_{18}O_{14} Na$ ($[M+Na]^+$) m/e : 1157,5; m/e medida: 1157,4.

5

Preparación del Compuesto 20c:



Compuesto 20c

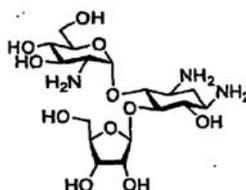
10 El Compuesto 20 (240 mg), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento), se disolvió en THF (5 ml) y se añadió a una mezcla de TFA (1 ml) y agua (1,2 ml). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 horas. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 9:1). La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 20c (155 mg, rendimiento del 90 %).

15 1H RMN (500 MHz, MeOD): δ = 1,40 (ddd, 1H, $J_1=12,5$, $J_2 = J_3 =12$ Hz, H-2 axial), 2,23 (dt, 1H, $J_1=5$ $J_2=13,5$ Hz, H-2 ecuatorial), 3,27-3,43 (m, 4H, H-1, H-3, H-4 y H-5), 3,38-3,48 (m, 1H, H-2'), 3,50 (t, 1H, $J_1=8,5$ Hz, H-6), 3,59 (t, 1H, $J_1=7$ Hz, H-5'), 3,76-3,83 (m, 2H, H-4' y H-6'), 3,88-3,95 (m, 1H, H-6'), 3,91 (t, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-3'), 5,16 (s, 1H, H-1''), 5,49 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-1').

20 ^{13}C RMN (125 MHz, MeOD): δ = 31,3 (C-2), 61,0, 61,8, 62,8 (C-6'), 65,1, 70,9, 74,2, 77,7, 78,0, 82,1, 82,2, 99,9 (C-1" carbono de conexión), 99,9 (C-1').

MALDI TOFMS calculada para $C_{25}H_{38}N_{18}O_{14} Na$ ($[M+Na]^+$) m/e : 837,3; m/e medida: 837,2.

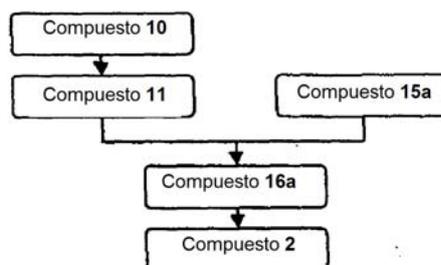
25 *Preparación del Compuesto 2*



Compuesto 2

30 El Compuesto 2 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 9 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 11 y se acopló al Compuesto 15a para proporcionar el Compuesto 16a como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 9



35 El Compuesto 16a (450 mg, 0,444 mmol), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento, se trató con una solución de $MeNH_2$ (solución al 33 % en 30 ml de EtOH) y la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH, 7:3), que indicó la finalización después de 8 horas. La mezcla de

reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (5 ml) y NaOH acuoso (0,1 M, 3,5 ml). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente, a la misma se le añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 2,66 ml de THF, 2,66 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas.

La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH_2Cl_2 (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con la mezcla de MeNH_2 (solución al 33 % en EtOH) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se combinaron, se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en un pequeño volumen de agua y se evaporaron de nuevo a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar la forma de amina libre del Compuesto 2 (170 mg, rendimiento del 84 %). Este producto se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,5 mediante H_2SO_4 (0,01 M) y se liofilizó para proporcionar la sal sulfato del Compuesto 2.

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH = 3,5) del Compuesto 2 se resumen en la Tabla 10 a continuación.

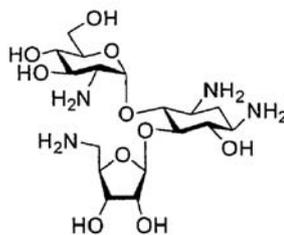
Tabla 10

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,66 d $J = 4,0$	3,26-3,29 m	3,83 t $J = 10,0$	3,70- 3,73 m	3,35 t $J = 9,0$		3,79- 3,83 m	3,66- 3,71 m
III	5,22 s	4,08-4,09 m	4,08-4,09 m	3,90- 3,92 m	3,77- 3,80 m	3,60 dd $J = 5,0, 13,0$		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,18- 3,23 m	2,30 dt $J = 4,5, 12,5$	1,65 ddd $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$	3,33- 3,39 m	3,56 t $J = 9,0$	3,75-3,81 m	3,77- 3,81 m	

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O): $\delta = 31,1$ (C-2), 50,7, 51,8, 55,8, 62,1 (C-5"), 62,5 (C-6'), 70,7, 70,8, 71,1, 74,4, 75,3, 76,9, 80,4, 84,1, 86,3, 97,8 (C-1'), 111,9 (C-1");

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_{11} \text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 478,2; m/e medida: 478,2.

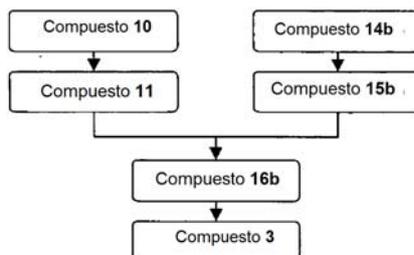
Preparación del Compuesto 3:



Compuesto 3

El Compuesto 3 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 10 a continuación, partiendo del Compuesto 10 y el Compuesto 14b que se convirtieron en el Compuesto 11 y el Compuesto 15b respectivamente y se acoplaron entre sí para proporcionar el Compuesto 16b como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 10



El Compuesto 16b (320 mg, 0,342 mmol), preparado como se ha presentado anteriormente en el presente documento, se trató con una solución de MeNH_2 (solución al 33 % en 30 ml de EtOH) y la propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/MeOH, 7:3), que indicó la finalización después de 8 horas. La mezcla de reacción se evaporó a sequedad a presión reducida y el residuo se disolvió en una mezcla de THF (3,7 ml) y NaOH

acuoso (0,1 M, 2,5 ml). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y posteriormente, a la misma se le añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 2,74 ml, 2,74 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas.

El producto se purificó como se ha descrito anteriormente para el Compuesto 2 para producir el Compuesto 3 en forma de una amina libre (142 mg, rendimiento del 91 %).

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH = 3,5) del Compuesto 3 se resumen en la Tabla 11 a continuación.

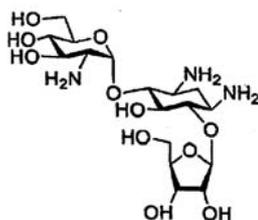
Tabla 11

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,75 d $J = 4,0$	3,40-3,46 m	3,94 m $J = 9,5$	3,71- 3,73 m	3,40-3,46 m		3,70- 3,74 m	3,82- 3,85 m
III	5,31 s	4,17-4,19 m	4,15 t $J = 10,0$	4,03- 4,08 m	3,17 dd $J =$ 7,5, 13,5	3,28- 3,32 m		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,28- 3,32 m	2,41 dt $J =$ 4,0, 12,5	1,83 ddd $J_1 = J_2 =$ $J_3 = 12,5$	3,52- 3,55 m	3,69 t $J = 9,5$	3,93 t $J = 9,0$	4,06 t $J = 9,0$	

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O): $\delta = 29,5$ (C-2), 43,4 (C-5''), 50,9, 51,7, 55,3, 61,9 (C-6'), 70,8(2C), 72,8, 73,4, 75,9, 76,4, 77,8, 80,1, 84,2, 95,7 (C-1'), 110,4 (C-1'').

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10} \text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e 477,2; m/e medida 477,5.

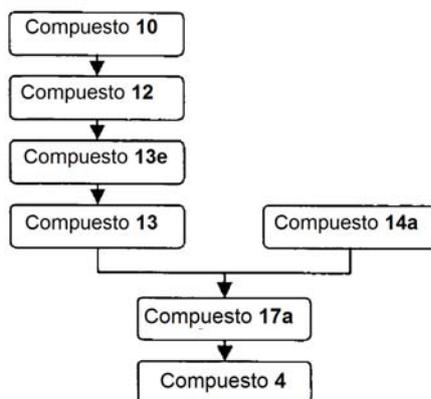
Preparación del Compuesto 4:



Compuesto 4

El Compuesto 4 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 11 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 13 que se acopló al Compuesto 14a para proporcionar el Compuesto 17a como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 11



El Compuesto 17a (460 mg, 0,43 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió con ácido acético (4,5 ml) y agua (0,75 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 3 horas y la propagación se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 3:2). La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con NaHCO_3 saturado y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre MgSO_4 y la mezcla se evaporó a sequedad a presión reducida.

El residuo se disolvió en THF (4 ml) y se añadió con la solución de NaOH (0,1 M, 3 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, después de lo cual se añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 2,85 ml, 2,85 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH_2Cl_2 (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con la mezcla de MeNH_2 (solución al 33 % en EtOH) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron de nuevo, y el procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 4 en forma de amina libre (147 mg, rendimiento total del 75 %). El producto se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,65 con H_2SO_4 (0,01 M) y se liofilizó para proporcionar la sal sulfato del Compuesto 4 en forma de un sólido espumoso de color amarillo.

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH 3,0, ajustado por H_2SO_4 0,01 M) del Compuesto 4 se resumen en la Tabla 12 a continuación.

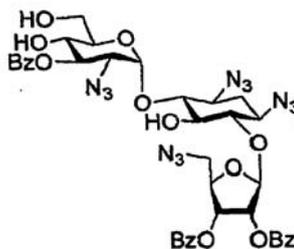
Tabla 12

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,61 d $J=4,0$	3,28 dd $J=$ 4,0,10,5	3,84 t $J= 10,0$	3,70- 3,73 m	3,36 t $J=$ 9,5		3,80-3,87 m	3,64- 3,71 m
III	5,07 s	4,11 d $J=5,0$	4,23-4,26 m	3,91- 3,94 m	3,65-3,69 m	3,74-3,78 m		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,22- 3,28 m	2,43 dt $J=$ 4,0, 12,0	1,77 ddd $J_1 = J_2$ $= J_3 = 12,5$	3,42- 3,47 m	3,58 t $J=$ 9,5	3,80 t $J=$ 9,5	3,84 t $J=$ 9,5	

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O): $\delta = 29,8$ (C-2), 49,9, 50,5, 55,8, 60,7 (C-5"), 62,1 (C-6'), 70,3, 70,7, 71,2, 75,4, 76,0, 76,4, 81,1, 82,4, 84,1, 98,5 (C-1'), 110,5 (C-1").

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 478,2; m/e medida: 478,2.

Preparación del Compuesto 5d (Compuesto de Referencia):



Compuesto 5d

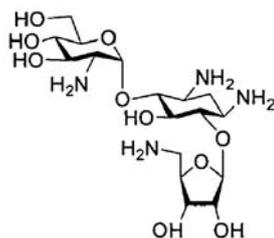
El Compuesto 17b (400 mg, 0,40 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una mezcla de TFA (1,5 ml) y agua (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 horas durante las cuales la propagación se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 1:1). La mezcla de reacción se aplicó directamente sobre una columna de gel de sílice y se purificó por cromatografía ultrarrápida (EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 5d (180 mg, rendimiento del 51,6 %).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,49$ -1,57 (m, 1H, H-2 axial), 2,33-2,37 (m, 1H, H-2 ecuatorial), 3,33-3,40 (m, 2H, H-3, H-4), 3,45-3,50 (m, 1H, H-1), 3,62 (t, 1H, $J = 8,5$ Hz, H-6), 3,63-3,65 (m, 1H, H-5"), 3,70-3,73 (m, 1H, H-2'), 3,74-3,79 (m, 2H, H-5 y H-5"), 3,88 (t, 1H, $J = 9,5$ Hz, H-5'), 3,90-3,92 (m, 2H, H-6'), 4,10-4,13 (m, 1H, H-4'), 4,53-4,56 (m, 1H, H-4"), 5,39 (d, 1H, $J = 3,5$ Hz, H-1'), 5,59 (t, 1H, $J = 10$ Hz, H-3'), 5,62-5,65 (m, 1H, H-3"), 5,71 (d, 1H, $J = 5$ Hz, H-2"), 5,80 (s, 1H, H-1"), 7,34 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,39 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,45 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,51-7,61 (m, 3H), 7,89 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,98 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,07 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 32,2$ (C-2), 53,4 (C-5"), 58,5, 58,9, 61,6 (C-6'), 62,3, 69,5, 72,4, 72,6, 75,0, 75,8, 76,3, 79,2, 79,3, 83,2, 99,1 (C-1'), 106,2 (C-1"), 128,4-130,0 (15C), 133,6 (2C), 133,7, 165,5 (2C), 167,2.

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{38}\text{H}_{38}\text{N}_{12}\text{O}_{13}$ Na ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 893,3; m/e medida: 893,2.

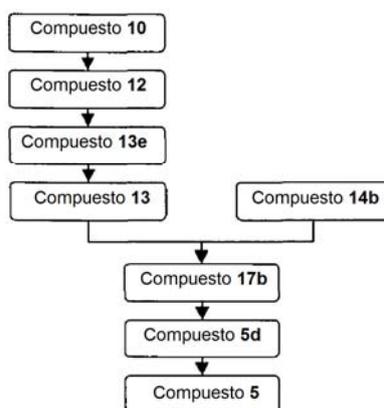
Preparación del Compuesto 5:



Compuesto 5

El Compuesto 5 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 12 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 13, que se acopló al Compuesto 14b para proporcionar el Compuesto 17b, que se convirtió en el Compuesto 5d como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 12



El Compuesto 5d (140 mg, 0,16 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una solución de NaOH (0,1 M, 2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, a la misma se le añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 1,65 ml, 1,65 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH_2Cl_2 (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con una mezcla de MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH, 30 ml) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 5 en forma de amina libre (32 mg, rendimiento del 44 %). La amina se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,5 con H_2SO_4 (0,01 M) y se liofilizó para dar la sal sulfato del Compuesto 5 en forma de un sólido espumoso de color amarillo.

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH = 3,0) del Compuesto 5 se resumen en la Tabla 13 a continuación.

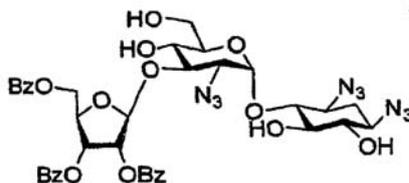
Tabla 13

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,57 d $J = 4,0$	3,25-3,36 m	3,80-3,84 m	3,80-3,84 m	3,31-3,38 m		3,59-3,63 m	3,67-3,72 m
III	5,19 d $J = 1,5$	3,97-4,06 m	3,97-4,06 m	3,97-4,06 m	3,05-3,10 m	3,26-3,30 m		
II	H1 3,31-3,38 m	H2eq 2,41-2,44 m	H2ax 1,83 ddd $J_1 = J_2 = J_3 = 12,5$	H3 3,42-3,48 m	H4 3,71-3,72 m	H5 3,71-3,73 m	H6 3,82-3,86 m	

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O): $\delta = 29,7$ (C-2), 43,9 (C-5''), 49,8, 50,5, 55,7, 62,1 (C-6'), 70,7, 71,2, 72,8, 75,4, 75,8, 76,0, 79,9, 81,6, 81,8, 98,6 (C-1'), 110,7 (C-1'');

TOF APMS calculada para $C_{17}H_{34}N_4O_{10}$ ($[M+H]^+$) m/e : 455,2; m/e medida: 455,2.

Preparación del Compuesto 6a (Compuesto de Referencia):



Compuesto 6a

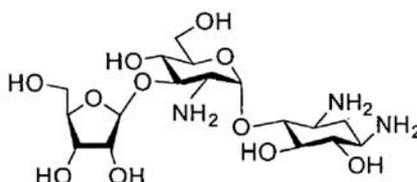
5 El Compuesto 18a (240 mg, 0,24 mmol) se disolvió en dioxano (6 ml) y se añadió a una mezcla de ácido acético (10 ml) y agua (3 ml). La mezcla de reacción se agitó a 70 °C durante 5 horas. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 7:3). La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con $NaHCO_3$ saturado y salmuera. La capa orgánica combinada se secó sobre $MgSO_4$, se evaporó a presión reducida y se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 6a (215 mg, rendimiento del 75 %).

10 1H RMN (500 MHz, $CDCl_3$): δ = 1,47 (ddd, 1H, $J_1 = 11,5$ Hz, $J_3 = J_2 = 12,5$ Hz, H-2 axial), 2,30 (dt, 1H, $J_1=4$ $J_2=13$ Hz, H-2 ecuatorial), 3,21-3,30 (m, 2H, H-3, H-4), 3,35-3,37 (m, 1H, H-2'), 3,40-3,50 (m, 3H, H-1, H-5, H-6), 3,51-3,54 (m, 1H, H-4'), 3,75 (dd, 1H, $J_1=4$ $J_2=12$ Hz, H-6'), 3,82 (dd, 1H, $J_1=4$ $J_2=12$ Hz, H-6''), 3,90-3,96 (m, 2H, H-3', H-5'), 4,57 (dd, 1H, $J_1=5$ $J_2=12,5$ Hz, H-5''), 4,78-4,81 (m, 1H, H-4''), 4,93 (dd, 1H, $J_1=4$ $J_2=12,5$ Hz, H-5'''), 5,11 (d, 1H, $J = 4$ Hz, H-1'), 5,55 (s, 1H, H-1''), 5,76 (d, 1H, $J = 5$ Hz, H-2''), 5,87 (t, 1H, $J = 5$ Hz, H-3''), 7,35-7,61 (m, 9H), 7,92 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,02 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz), 8,12 (d, 2H, $J = 7,5$ Hz).

15 ^{13}C RMN (125 MHz, $CDCl_3$): δ = 31,9 (C-2), 52,6, 58,6, 59,4 (C-5''), 62,5, 63,6 (C-6'), 69,2, 71,4, 71,8, 75,1, 75,2, 76,2, 80,1, 83,7, 85,0, 98,9 (C-1'), 107,2 (C-1''), 128,3-129,7 (15C), 133,4, 133,5 (2C), 165,0, 165,2, 166,1;

20 MALDI TOFMS calculada para $C_{38}H_{39}N_9O_{14} Na$ ($[M+Na]^+$) m/e : 868,3; m/e medida: 868,4.

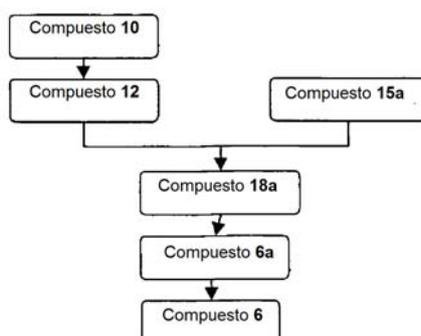
Preparación del Compuesto 6:



Compuesto 6

25 El Compuesto 6 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 13 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 12, que se acopló al Compuesto 15a para proporcionar el Compuesto 18a, que se convirtió en el Compuesto 6a como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 13



30 El Compuesto 6a (200 mg, 0,236 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una solución de NaOH (0,1 M, 1,5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, a la misma se

le añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 1,4 ml, 1,4 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH_2Cl_2 (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con una mezcla de MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH, 30 ml) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 6 en forma de amina libre (90 mg, rendimiento del 84 %). La amina se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,5 con H_2SO_4 (0,01 M) y se liofilizó para dar la sal sulfato del Compuesto 6 en forma de un sólido espumoso de color blanco.

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH = 3,5) del Compuesto 6 se resumen en la Tabla 14 a continuación.

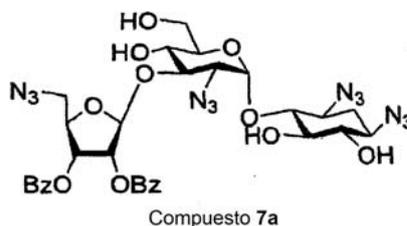
Tabla 14

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,61 d $J = 4,0$	3,47-3,50 m	3,95-3,97 m	3,57-3,59 m	3,68-3,75 m		3,74-3,76 m	3,80-3,83 m
III	5,10 S	4,09 d $J = 4,5$	4,16-4,19 m	3,94-3,96 m	3,60-3,62 m	3,73-3,76 m		
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,21-3,25 M	2,39-2,44 m	1,80 ddd $J_1 = 13,0 J_2 = J_3 = 12,5$	3,45-3,52 m	3,45-3,52 m	3,57 t $J = 9,0$	3,80 t $J = 10,0$	

^{13}C RMN (125 MHz, D_2O): $\delta = 30,0$ (C-2), 50,6, 51,4, 54,5, 62,0 (C-5"), 62,5 (C-6"), 69,2, 71,3, 74,0, 75,2, 76,5 (2C), 79,6, 81,8, 84,5, 98,5 (C-1'), 108,7 (C-1").

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10} \text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 478,2; m/e medida: 478,4.

Preparación del Compuesto 7a (Compuesto de Referencia):



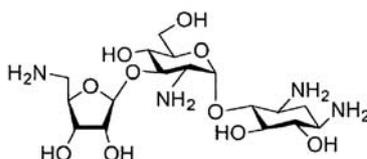
El Compuesto 18b (500 mg) se disolvió en THF (5 ml) y se añadió a una mezcla de TFA (1 ml) y agua (1 ml). La mezcla de reacción se agitó a 50 °C durante 2 horas. La propagación de la reacción se controló por TLC (EtOAc/Hexano, 7:3). La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida (sílice, EtOAc/Hexano) para producir el Compuesto 7a (340 mg, rendimiento del 82 %).

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,45$ -1,52 (m, 1H, H-2 axial), 2,26-2,33 (m, 1H, H-2 ecuatorial), 3,28-3,53 (m, 5H, H-1, H-5, H-6, H-3 y H-4), 3,62 (dd, 1H, $J_1=3,5 J_2=10,0$ Hz H-2'), 3,69-3,73 (m, 2H, H-5" y H-5'), 3,85 (dd, 1H, $J_1=3,0 J_2=13,5$ Hz, H-5"), 3,86-3,96 (m, 3H, H-4' y 2H-6'), 3,99 (t, 1H, $J_1=9,5 J_2=9,0$ Hz, H-3'), 4,52-4,55 (m, 1H, H-4"), 5,29 (d, 1H, $J = 4$ Hz, H-1'), 5,55 (s, 1H, H-1"), 5,69 (d, 1H, $J = 5$ Hz, H-2"), 5,70-5,73 (m, 1H, H-3"), 7,35 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,44 (t, 2H, $J = 7,5$ Hz), 7,54 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,60 (t, 1H, $J = 7,5$ Hz), 7,89 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz), 8,02 (d, 2H, $J = 8,0$ Hz).

^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 32,1$ (C-2), 52,3(C-5"), 58,9, 59,7, 61,0 (C-6'), 62,0, 69,3, 71,5, 72,2, 75,4 (2C), 76,0, 80,3, 83,1, 84,1, 98,8 (C-1'), 106,9 (C-1"), 128,3-135,5 (12C), 165,2, 165,4.

MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{31}\text{H}_{34}\text{N}_{12}\text{O}_{12} \text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) m/e : 789,2; m/e medida: 789,2.

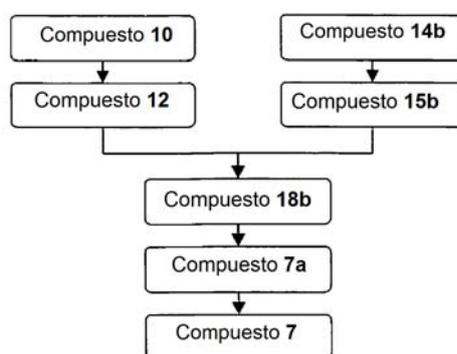
Preparación del Compuesto 7:



Compuesto 7

5 El Compuesto 7 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 14 a continuación, partiendo del Compuesto 10 y el Compuesto 14b que se convirtieron en el Compuesto 12 y el Compuesto 15b respectivamente, que se acoplaron entre sí para proporcionar el Compuesto 18b, que se convirtió en el Compuesto 7d como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 14



10 El Compuesto 7a (300 mg, 0,391 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una solución de NaOH (0,1 M, 2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, a la misma se le añadió PMe_3 (solución 1 M en THF, 3,3 ml, 3,3 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{MeNH}_2$ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH_2Cl_2 (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con una mezcla de MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH, 40 ml) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 7 en forma de amina libre (134 mg, rendimiento del 75 %). La amina se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,6 con H_2SO_4 (0,01 M) y se liofilizó para dar la sal sulfato del Compuesto 7 en forma de un sólido espumoso de color blanco.

Los datos de ^1H RMN (500 MHz, D_2O , pH = 3,5) del Compuesto 7 se resumen en la Tabla 15 a continuación.

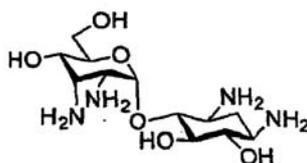
Tabla 15

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,74 d $J = 4,0$	3,53 dd $J =$ 4,0, 11,0	4,14-4,19 m	3,87- 3,94 m	3,56- 3,59 m		3,77 dd $J =$ 5,0, 12,0	3,88- 3,94 m
III	5,25 s	4,23-4,28 m	4,23-4,28 m	4,14- 4,19 m	3,16- 3,21 m	3,36-3,40 m		
II	H1 3,31- 3,37 m	H2eq 2,52 dt $J =$ 4,0, 12,5	H2ax 1,89 ddd $J_1=J_2$ $= J_3 = 12,5$	H3 3,56- 3,62 m	H4 3,57- 3,63 m	H5 3,70 t $J_1=$ 9,5 $J_2=9,0$	H6 3,90-3,93 m	

25 ^{13}C RMN (125 MHz, D_2O) : $\delta = 30,0$ (C-2), 44,0 (C-5''), 50,6, 51,5, 54,8, 61,9 (C-6'), 70,3, 73,4, 74,1, 73,4, 74,1, 75,4, 76,3, 76,5, 79,4, 80,2, 81,5, 81,6, 98,3 (C-1'), 110,5 (C-1'');

30 MALDI TOFMS calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_{10} \text{Na}$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/e : 477,2; m/e medida: 477,2).

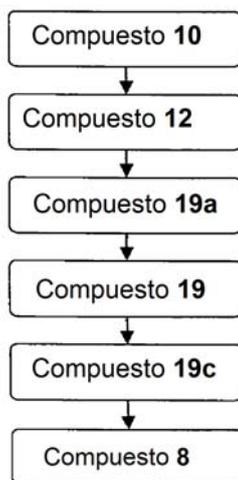
Preparación del Compuesto 8 (Compuesto de Referencia):



Compuesto 8

El Compuesto 8 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 15 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 19c como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 15



5

El Compuesto 19c (90 mg, 0,211 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una solución de NaOH (0,1 M, 2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, a la misma se le añadió PMe₃ (solución 1 M en THF, 1,69 ml, 1,69 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/MeNH₂ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH₂Cl₂ (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con una mezcla de MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH, 30 ml) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 8 en forma de amina libre (52,0 mg, rendimiento del 76,5 %). El producto se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,6 con H₂SO₄ (0,01 M) y se liofilizó para proporcionar la sal sulfato del Compuesto 8.

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, D₂O, pH = 3,5) data de 8 se resumen en la Tabla 16 a continuación. 96

Tabla 16

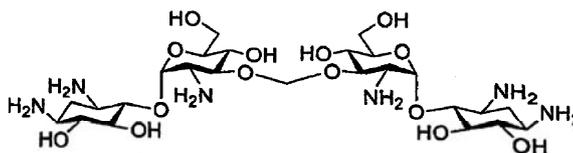
Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,37 d J = 2,0	3,46-3,51 m	3,98-4,09 m	3,98-4,09 m	3,98-4,09 m		3,73 d J = 5,0	3,73 d J = 5,0
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,20-3,26 m	2,42 dt J = 4,0, 12,5	1,72 ddd J ₁ = J ₂ = J ₃ = 12,5	3,41-3,52 m	3,47 t J = 9,5	3,57 t J = 9,0	3,80 t J ₁ = 9,5, J ₂ = 10,0	

25

¹³C (RMN 125 MHz, D₂O): δ = 29,8 (C-2), 50,1, 50,9, 51,6, 56,0, 61,2 (C-6'), 64,9, 73,8, 74,0, 75,8, 82,5, 96,8 (C-1').

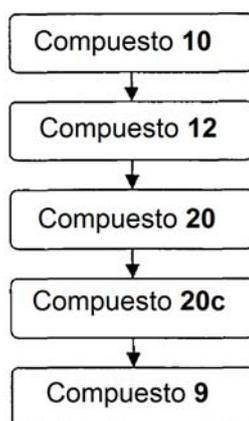
MALDI TOFMS calculada para C₁₂H₂₆N₄O₆ Na ([M+Na]⁺) m/e: 345,2; m/e medida: 345,2.

Preparación del Compuesto 9 (Compuesto de Referencia):



Compuesto 9

El Compuesto 9 se preparó siguiendo el gráfico presentado en el Esquema 16 a continuación, partiendo del Compuesto 10 que se convirtió en el Compuesto 20c como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Esquema 16

5

El Compuesto 20c (155 mg, 0,208 mmol) se disolvió en THF (3 ml) y se añadió a una solución de NaOH (0,1 M, 2 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos, y posteriormente, a la misma se le añadió PMe₃ (solución 1 M en THF, 2,28 ml, 2,28 mmol). La propagación de la reacción se controló por TLC, usando una mezcla de CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/MeNH₂ a una relación relativa de 10:15:6:15 diluida con respecto a una solución al 33 % en etanol como eluyente, que indicó la finalización después de 5 horas. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía ultrarrápida en una columna corta de gel de sílice. La columna se lavó con los siguientes disolventes: THF (100 ml), CH₂Cl₂ (200 ml), EtOH (100 ml) y MeOH (150 ml). El producto se eluyó con una mezcla de MeNH₂ (solución al 33 % en EtOH, 30 ml) y MeOH a una relación de 1:4. Las fracciones que contenían el producto se evaporaron a presión reducida, se disolvieron de nuevo en agua y se evaporaron a presión reducida. Este procedimiento se repitió de 2 a 3 veces para proporcionar el Compuesto 9 en forma de amina libre (102 mg, rendimiento del 81,4 %). La amina se disolvió en agua, el pH se ajustó a 6,5 con H₂SO₄ (0,01 M) y se liofilizó para dar la sal sulfato del Compuesto 9 en forma de un sólido espumoso de color amarillo.

Los datos de ¹H RMN (500 MHz, D₂O, pH = 3,75) del Compuesto 9 se resumen en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17

Anillo	H1	H2	H3	H4	H5	H5'	H6	H6'
I	5,72 d J = 3,5	3,45-3,48 m	4,11 t J = 10,0	3,79- 3,85 m	3,53- 3,57 m		3,67-3,69 m	3,80- 3,85 m
	H1	H2eq	H2ax	H3	H4	H5	H6	
II	3,24- 3,26 m	2,33 dt J = 4,0, 13,0	1,81 ddd J ₁ = J ₂ = 13,0 J ₃ = 12,5	3,50- 3,53 m	3,50- 3,53 m	3,65 t J = 9,5	3,84 t J = 10,0	

Los datos adicionales de ¹H RMN (500 MHz, D₂O, pH = 3,75) para el Compuesto 9 incluían: δ = 5,12 (s, 1H).

¹³C (RMN 125 MHz, D₂O): δ = 30,0 (C-2''), 50,5, 51,5, 62,0 (C-6'), 70,6, 74,2, 75,1, 76,6, 79,1, 80,9, 98,1 (C-1'), 99,6 (C-1'' carbono de conexión).

MALDI TOFMS calculada para C₂₅H₅₀N₆O₁₄ Na ([M+Na]⁺) m/e: 681,3; m/e medida: 681,6.

30

EJEMPLO 2

ENSAYOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

5 La capacidad de los compuestos que se presentan en el presente documento, es decir, los compuestos 2-9, para leer más allá de las mutaciones de codón de parada, se examinó tanto *in vitro* como *ex-vivo* en células cultivadas de mamíferos.

10 Todos los productos químicos y reactivos se obtuvieron de fuentes comerciales normales a menos que se indique lo contrario. Los antibióticos comerciales, paromomicina y gentamicina se obtuvieron de Sigma.

Reacciones de traducción y cuantificación de la supresión y la traducción in vitro:

15 Los ensayos de actividad de supresión de mutación se realizaron en la mutación "UGA C", que ha demostrado ser la más susceptible a la supresión mediada por aminoglucósidos. Inicialmente, los Compuestos 1-9 se ensayaron para determinar su capacidad para suprimir esta mutación sin sentido *in vitro*, usando una construcción indicadora que lleva la mutación sin sentido R3X (un codón de parada prematura UGA C) del gen *PCDH15*. Las mutaciones en el gen *PCDH15* que codifica la protocardherina 15, provoca el síndrome de Usher de tipo 1 (USH1), que se caracteriza por una pérdida de audición prelocutiva profunda, la arreflexia vestibular y el inicio prepuberal de la retinitis pigmentosa (RP) [83]. Se han notificado cuatro mutaciones sin sentido diferentes en *PCDH15* que provocan USH1, R3X, R245X, R643X y R929X en seres humanos. Curiosamente, mientras que las mutaciones sin sentido de *PCDH15* anteriores provocan USH1, ciertas mutaciones sin sentido en el mismo gen provocan solamente sordera no sindrómica, que no se asocia a la RP. Estas observaciones sugieren que el nivel de actividad parcial o bajo de la proteína codificada por este gen puede ser suficiente para la función normal de la retina, haciendo de cualquiera de los compuestos que se presentan en el presente documento un candidato adecuado para la terapia de ultralectura.

25 La supresión de mutaciones sin sentido por los Compuestos 1-9 se ensayó *in vitro* usando un plásmido indicador que alberga la mutación R3X del gen *PCDH15* [84]. Para crear este plásmido, los oligonucleótidos GATCCATGTTTTGACAGTTTTATCTCTGGACA y AGCTTGTCAGAGATAAACTGTCAAACATG se hibridaron entre sí y se insertaron en los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pDB650 [6].

30 El plásmido indicador resultante pDB650-R3X contenía una mutación sin sentido TGA C entre un polipéptido de 25 kDa que codifica el marco de lectura abierto (ORF, siglas del inglés *open reading frame*) y un polipéptido de 10 kDa que codifica el ORF. Por tanto, una terminación de la traducción eficiente en el codón de parada dio como resultado la producción de un polipéptido de 25 kDa, mientras que la supresión de la mutación sin sentido por los compuestos ensayados en el presente documento permitió la síntesis de una proteína de 35 kDa más larga.

35 El plásmido se transcribió y se tradujo en un sistema de transcripción/traducción acoplado de lisado de reticulocitos de conejo (Promega) en presencia de [³⁵S]-metionina y los productos de reacción se separaron mediante SDS-PAGE y se cuantificaron usando el análisis de PhosphorImager. El nivel de supresión de la mutación se calculó como la proporción relativa del producto de 35 kDa sobre la proteína total (la suma de 35 kDa y 25 kDa) y el nivel de traducción se calculó como la proporción relativa de la proteína total en cada concentración de compuesto ensayo sobre la proteína total sin la presencia de los compuestos ensayados.

40 Las actividades de supresión de la mutación de la paromomicina y la gentamicina se midieron y se usaron como referencia para la actividad de los compuestos que se presentan en el presente documento. Las concentraciones ensayadas de paromomicina fueron de 0, 5, 10, 20, 30 y 40 µg/ml, las concentraciones ensayadas de gentamicina fueron de 0, 5, 10, 20 y 30 µg/ml y las concentraciones ensayadas de los Compuestos 1-9 se estaban en el intervalo de 0-160 µg/ml. Las concentraciones a las que se observaron los niveles de supresión máxima se proporcionan en la Tabla 18 a continuación.

45 Usando métodos similares para los ensayos y el análisis, se ensayan compuestos que presentan un grupo N1-AHB como se ha presentado anteriormente en el presente documento para determinar la actividad de supresión de la mutación.

50 La Tabla 18 presenta la supresión de mutación *in-vitro* máxima y los niveles de traducción de la mutación R3X, junto con los valores de CIM medidos para los Compuestos 1-9. Los resultados de la Tabla 18 se presentan como promedios de al menos tres experimentos independientes.

55
60

Tabla 18

Compuesto	Conc. [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	Nivel de sup. [%]	Nivel de trad. [%]	CIM [$\mu\text{g ml}^{-1}$]	
				<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Paromomicina	40	49 \pm 6	40 \pm 13	12	8
Gentamicina	30	49 \pm 4	40 \pm 9	4	<0,5
Paromamina (Compuesto 1)	80	6,2 \pm 0,2	74 \pm 15	512	128
Compuesto 2	80	1,3 \pm 0,1	100 \pm 10	256	64
Compuesto 3	80	21 \pm 3	72 \pm 6	>512	48
Compuesto 4	80	1,5 \pm 0,1	74 \pm 7	256	96
Compuesto 5	80	4,4 \pm 2	75 \pm 9	>512	192
Compuesto 6	160	<1	82 \pm 8	>512	>512
Compuesto 7	80	2,9 \pm 2	98 \pm 10	192	48
Compuesto 8	80	2,0 \pm 2	71 \pm 7	192	48
Compuesto 9	80	<1	22 \pm 2	96	48

Como puede verse en la Tabla 18, la eliminación de un anillo cualquiera que esté presente en la paromomicina, a saber, el anillo IV como en el caso del Compuesto 2, o dos anillos que estén presentes en la paromomicina, a saber, los anillos de III y IV como en el caso del Compuesto 1, disminuye dramáticamente su actividad de ultralectura *in vitro* desde una supresión del 49 % a una del 1,6 % (Compuesto 2) y del 6,2 % (Compuesto 1). Estos datos solos indican que el anillo IV de la paromomicina es crítico para su correcto reconocimiento del sitio A de mamífero y para su posterior actividad de ultralectura. El nivel de supresión de sustancialmente más alto del Compuesto 1 (6,2 %) en comparación con el del Compuesto 2 (1,6 %) implica que el Compuesto 1 (paromamina) representa el motivo estructural mínimo de la paromomicina que es reconocido preferentemente por los ribosomas de mamíferos y tiene una actividad de supresión significativa.

Como se concluye adicionalmente de la Tabla 18, la conexión del anillo de ribosa sencillo al armazón de paromamina ya sea en la posición C6, como en el Compuesto 4, o en la posición C3' como en el Compuesto 6, junto con la adición de una amina adicional como en el Compuesto 8, o la dimerización de la paromamina como en el Compuesto 9, proporcionaron niveles de supresión menores que el de paromamina por sí misma.

Los resultados más importantes, sin embargo, se observaron cuando, en lugar de la ribosa sencilla, se unió la 5-amino ribosa (ribosamina) al resto de paromamina en diferentes posiciones. Como también puede verse en la Tabla 18, los niveles observados de supresión de la mutación de los Compuestos 3, 5 y 7 fueron más altos que los correspondientes compuestos que contenían el anillo de ribosa sencillo en la misma posición, a saber, los Compuestos de 2, 4 y 6, respectivamente. Además, en la serie de los Compuestos 3, 5 y 7, se observó una influencia particular de la posición de la ribosamina en el armazón de paromamina que era C5 (Compuesto 3) >> C6 (Compuesto 5) >C3' (Compuesto 7), lo que indica que la conservación de la estructura del núcleo de pseudotrisacárido de la paromomicina parental (anillos I-III) en el Compuesto 3 es importante para una eficiente actividad de ultralectura.

Los datos de supresión de la mutación de los Compuestos 1-9 muestran que, aunque en la serie de los Compuestos 2-7, un mayor número de grupos amino en cada par conduce a la mejora de la actividad de ultralectura, los datos obtenidos con el Compuesto 8 y el Compuesto 9 indican que simplemente aumentar el número de grupos amino en el armazón de paromamina no siempre conduce a un aumento de la actividad de ultralectura, a pesar de que es probable que la afinidad de unión de estos análogos a ambos ARNr procariota y eucariota aumente [36, 85]. Sin embargo, el nivel de supresión observado 13 veces mayor del Compuesto 3 en comparación con el del Compuesto de ribosa correspondiente 2, y la actividad más de 3 veces mayor en comparación con la del Compuesto 1, indican que la presencia del grupo C5"-NH₂ en el Compuesto 3 es responsable de su elevada actividad de ultralectura.

Las Figuras 3a-d presentan los resultados de los ensayos de supresión y traducción de la mutación *in vitro* medidos para el Compuesto de ejemplo 3 y la paromomicina, mediante la expresión de una construcción indicadora basada en un plásmido que contiene una mutación de parada sin sentido TGA C entre un polipéptido de 25 kDa que codifica el marco de lectura abierto (ORF) y un polipéptido de 10 kDa que codifica el ORF, en presencia de los compuestos ensayados y [³⁵S]-metionina, muestran los productos de reacción separadas por SDS-PAGE y cuantificados usando un PhosphorImager para el Compuesto 3 (Figura 3a) y paromomicina (Figura 3c), y muestran gráficas comparativas en las que los valores de supresión de la mutación (que se muestran como puntos negros) y los valores de traducción (que se muestran como puntos blancos), calculados como la proporción relativa de la proteína total en cada concentración de los compuestos ensayados sobre la proteína total expresada en ausencia de los mismos, medidos por triplicado para el Compuesto 3 (Figura 3b) y para la paromomicina (Figura 3d).

Como puede verse en la Tabla 18 y en las Figuras 3a-d, además de su muy significativa actividad de ultralectura, el Compuesto 3 también conservó un nivel de traducción aproximadamente dos veces mayor (aproximadamente del 80 %, véase también la Tabla 18) que la paromomicina (aproximadamente del 40 %) o la gentamicina (aproximadamente del 40 %), a las concentraciones en las que cada compuesto ensayado alcanzó la tasa de supresión máxima. Una reducción de este tipo en la inhibición de la traducción por el Compuesto 3 podría interpretarse como una toxicidad reducida del Compuesto 3 con respecto a la de la paromomicina parental o los compuestos de gentamicina. Por tanto, aunque a las concentraciones anteriores la tasa de supresión inducida por paromomicina es mayor que la del Compuesto 3, la cantidad de proteína total producida en el caso del Compuesto 3 es mayor.

Supresión de la mutación inducida por antibióticos aminoglucósidos ex vivo:

Al reducir adicionalmente la presente invención a la práctica, se razonó que la potenciación de la producción de proteínas mostrada por el Compuesto 3, incluso a la tasa de supresión observada, en principio, podría aumentar la eficacia de la supresión de las mutaciones sin sentido inducida por fármacos en sistemas celulares de mamíferos, mediante el aumento de la cantidad total de proteínas funcionales producidas a partir de genes que contiene codones sin sentido. Estudios recientes sobre la producción potenciada de proteínas funcionales a partir de genes que contienen codones sin sentido por agentes de activación del promotor apoyan esta suposición [33]. Para ensayar esta posibilidad, el Compuesto 3 junto con la paromomicina y la gentamicina, se evaluaron para determinar la actividad de ultralectura del codón de parada UGA C en células cultivadas usando un sistema indicador dual de luciferasa.

La supresión de mutaciones sin sentido por los Compuestos 1-9 se ensayó *ex vivo* usando un plásmido indicador dual de luciferasa [86]. El plásmido p2LUC que alberga de la mutación UGAC se transfectó a células COS-7 con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se realizó la adición de compuestos ensayados después de 15 horas. Se determinó la actividad de la luciferasa después de 24 horas de incubación, usando el Sistema de Ensayo Indicador de Luciferasa Dual (Promega) y la ultralectura del codón de parada se calculó como se ha descrito anteriormente.

Usando métodos similares para los ensayos y análisis, se ensayan compuestos que presentan un grupo N1-AHB como se ha presentado anteriormente en el presente documento para determinar la actividad de supresión de la mutación *ex-vivo*.

La Figura 4 presenta la supresión *ex vivo* de una mutación sin sentido mostrada por el Compuesto de ejemplo 3, la paromomicina y la gentamicina, usando el plásmido p2Luc que contiene una mutación sin sentido TGA C en un polienlazador entre los genes de luciferasa de renilla y de luciferasa de luciérnaga expresados en células COS-7, que muestra los niveles de supresión calculadas como promedios de tres experimentos independientes o más para cada compuesto ensayado a diferentes concentraciones.

Como puede verse en la Figura 4, la actividad del Compuesto 3 es superior a la de la paromomicina y la gentamicina en todas las concentraciones ensayadas. En los compuestos ensayados, la actividad de ultralectura inducida aumentó con el aumento de la concentración del compuesto ensayado, pero este aumento fue más significativo en el caso del Compuesto 3 que en los otros dos fármacos utilizados clínicamente. Como puede verse adicionalmente en la Figura 4, la gentamicina, que es actualmente el único aminoglucósido clínicamente relevante que demostró que tiene la capacidad de suprimir las mutaciones sin sentido en los pacientes, fue menos eficiente que la paromomicina o el Compuesto 3. Una eficacia de ultralectura aumentada de este tipo del Compuesto 3 con respecto a la de la paromomicina y la gentamicina es causada muy probablemente debido a su menor toxicidad con respecto a las células cultivadas.

Actividad antibacteriana:

Con el fin de comparar la actividad de ultralectura de codón de parada inducida por aminoglucósidos observada en células de mamífero con la actividad antibacteriana de los mismos, los Compuestos 1-9 se investigaron adicionalmente como agentes antibacterianos tanto contra bacterias gramnegativas (*E. coli*) como contra bacterias grampositivas (*Bacillus subtilis*) y se determinaron los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) usando un ensayo de microdilución con paromomicina y gentamicina como controles, y los resultados se presentan en la Tabla 18 anteriormente en el presente documento.

Las cepas bacterianas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Los valores de CIM se determinaron usando el método de microdilución doble de acuerdo con el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) de los EE.UU. [87] con dos concentraciones de partida diferentes de los compuestos ensayados, 384 µg/ml y 512 µg/ml. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados análogos se obtuvieron en dos a cuatro experimentos diferentes.

Usando métodos similares para los ensayos y análisis, se ensayan compuestos que presentan un grupo N1-AHB como se ha presentado anteriormente en el presente documento para determinar la actividad antimicrobiana.

Como puede deducirse a partir de los valores de CIM presentados en la Tabla 18, la actividad antibacteriana de todos los compuestos que se presentan en el presente documento es notablemente menor que la del compuesto parental paromomicina por un factor que varía de 8 a 43 en *E. coli* y de 6 a 64 en *B. subtilis*, mientras que la gentamicina y paromomicina presentaron una excelente actividad antibacteriana contra las dos cepas bacterianas.

Más importante aún, la actividad antibacteriana considerablemente menor del Compuesto 3 en comparación con la de la paromomicina indica que la selectividad del Compuestos 3 para las células eucariotas es muy superior a la de la paromomicina parental. Por tanto, la incapacidad observada del Compuestos 3 para mostrar actividad antibacteriana significativa debe interpretarse como un resultado positivo en el sentido de la aplicabilidad general de la estrategia esbozada en el presente documento para el diseño de nuevas variantes de aminoglucósidos que puedan actuar selectivamente sobre el ribosoma de mamíferos y provoquen una supresión del codón de parada eficiente sin alterar el equilibrio de la biota GI o aumentar la aparición de resistencia a antibióticos.

Citotoxicidad en sistema de mamífero:

Para confirmar adicionalmente la toxicidad reducida del Compuesto 3 con referencia a los aminoglucósidos disponibles en el mercado y utilizados clínicamente, se realizó una serie de ensayos de toxicidad celular usando tres estirpes celulares derivadas de riñón de, es decir, HEK-293 (riñón embrionario humano), COS-7 (riñón de mono) y MDCK (riñón canino), como se describe a continuación en el presente documento.

Se cultivaron HEK-293, COS-7 o MDCK en placas de 96 pocillos (5000 células/pocillo) en medio DMEM que contenía FBS al 10 %, penicilina/estreptomina al 1 % y glutamina al 1 % (Biological Industries) a 37 °C y 5 % de CO₂ durante la noche. Después de 1 día se cambió el medio por medio sin estreptomina y se añadieron diferentes concentraciones de los compuestos ensayados. Después de 48 horas se realizó un ensayo de proliferación celular (ensayo colorimétrico basado en XTT, Biological Industries), usando el protocolo de incubación de 5 horas, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad óptica (DO) se leyó usando un lector de placas de ELISA. La viabilidad celular se calculó como la relación entre el número de células vivas en cultivos cultivados en presencia de los compuestos ensayados, frente a los correspondientes cultivos celulares que se cultivaron sin los compuestos ensayados. La concentración de la dosis letal semimáxima para las células (CL₅₀) se obtuvo a partir de curvas de concentración-respuesta ajustadas a los datos de al menos dos experimentos independientes, usando el software Grafit 5 [R.J. Leatherbarrow, Erithacus Software Ltd., Horley, Reino Unido 2001] (véase la Tabla 19 a continuación).

Usando métodos similares para los ensayos y análisis, se ensayan compuestos que presentan un grupo N1-HBA como se ha presentado anteriormente en el presente documento para determinar la citotoxicidad.

Tabla 19

Compuesto	Valores de CL ₅₀ para la estirpe celular (mg/ml)		
	HEK293	COS-7	MDCK
gentamicina	0,70 ± 0,08	0,49 ± 0,06	0,51 ± 0,07
paromomicina	0,77 ± 0,14	0,90 ± 0,10	1,00 ± 0,06
Compuesto 3	4,82 ± 0,92	7,03 ± 1,85	7,53 ± 1,21

Como puede verse en la Tabla 19, los valores de CL₅₀ obtenidos para el Compuesto 3 fueron de 6 veces a 15 veces mayores que los valores de CL₅₀ obtenidos para los aminoglucósidos gentamicina y paromomicina clínicamente utilizados, según se ensayó en las tres estirpes celulares.

En resumen, los derivados de paromamina, Compuestos 2-9, sintetizados y ensayados por los presentes inventores, proporcionan un estudio sistemático de los aminoglucósidos de síntesis para la supresión de codones de parada prematura en sistemas de traducción de mamíferos tanto *in vitro* como *ex vivo*. La paromamina (Compuesto 1) se identificó como el motivo estructural mínimo del fármaco clínicamente importante paromomicina y se usó como un armazón para la construcción de diversas estructuras como inductores de ultralectura de codones de parada potenciales. Estos compuestos mostraron una actividad de ultralectura de codones de parada significativamente mayor y una menor toxicidad en comparación con la de la paromomicina parental en células cultivadas. En las células COS-7 la actividad de estos compuestos también fue mayor que la de la gentamicina, el único aminoglucósido que hasta la fecha se ha demostrado que tiene la capacidad de suprimir las mutaciones sin sentido en los pacientes. Los ensayos antibacterianos contra cepas bacterianas tanto Gramnegativas como Grampositivas indican que estos compuestos son altamente selectivos en su acción en las células eucariotas.

Basándose en los resultados experimentales presentados anteriormente en el presente documento, puede observarse que la actividad inductora de la ultralectura de la mutación de los compuestos de acuerdo con las presentes realizaciones mejora notablemente según se mide *ex vivo* en células de mamíferos y en comparación con la actividad de ultralectura de aminoglucósidos disponibles en el mercado y utilizados clínicamente. Por otra parte, la reducción de la toxicidad de los compuestos que se presentan en el presente documento, combinada con su

actividad de supresión de mutaciones sin sentido hace que el uso de los mismos sea muy ventajoso en comparación con los aminoglucósidos disponibles en el mercado y utilizados clínicamente, ya que se espera que vayan acompañados de menos efectos secundarios y menos importantes. Estas observaciones demuestran claramente que los compuestos que se presentan en el presente documento pueden considerarse como un agente terapéutico nuevo potencial para el tratamiento de trastornos genéticos causados por mutaciones de truncamiento.

En conjunto, estos resultados indican que los compuestos que se presentan en el presente documento podrían representar una alternativa a la gentamicina y la paromomicina para la terapia de supresión de la mutación, proporcionando de este modo una nueva dirección para el desarrollo de moléculas pequeñas nuevas a base de aminoglucósidos que se dirijan a las células de mamíferos selectivamente por medio de la optimización de la eficiencia de la supresión inducida por aminoglucósidos de mutaciones de parada prematura.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Además, la cita o la identificación de cualquier referencia en la presente solicitud no deberá interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

REFERENCIAS CITADAS POR NÚMEROS

(En el texto se citan otras referencias)

1. OMIM. *Online Mendelian Inheritance in Man* [cited; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>].
2. Atkinson, J. and R. Martin, Mutations to nonsense codons in human genetic disease: implications for gene therapy by nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 1994. 22(8): p. 1327-34.
3. Burke, J.F. and A.E. Mogg, Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Res.*, 1985. 13(17): p. 6265-72.
4. Kaufman, R.J., Correction of genetic disease by making sense from nonsense. *J. Clin. Invest.*, 1999. 104(4): p. 367-8.
5. Kerem, E., Pharmacologic therapy for stop mutations: how much CFTR activity is enough? *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2004. 10(6): p. 547-52.
6. Manuvakhova, M., K. Keeling, and D.M. Bedwell, Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *Rna*, 2000. 6(7): p. 1044-55.
7. Davis, B.D., Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. *Microbiol. Rev.*, 1987. 51(3): p. 341-50.
8. Jana, S. and J.K. Deb, Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006. 70(2): p. 140-50.
9. Fujisawa, K., T. Hoshiya, and H. Kawaguchi, Aminoglycoside antibiotics. VII. Acute toxicity of aminoglycoside antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 1974. 27(9): p. 677-81.
10. Magnet, S. and J.S. Blanchard, Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem. Rev.*, 2005. 105(2): p. 477-98.
11. Ogle, J.M., et al., Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science*, 2001. 292(5518): p. 897-902.
12. Vicens, Q. and E. Westhof, Molecular recognition of aminoglycoside antibiotics by ribosomal RNA and resistance enzymes: an analysis of x-ray crystal structures. *Biopolymers*, 2003. 70(1): p. 42-57.
13. Schluenzen, F., et al., Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution. *Cell*, 2000. 102(5): p. 615-23.
14. Wimberly, B.T., et al., Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature*, 2000. 407(6802): p. 327-39.
15. Ogle, J.M., et al., Selection of tRNA by the ribosome requires a transition from an open to a closed form. *Cell*, 2002. 111(5): p. 721-32.
16. Carter, A.P., et al., Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature*, 2000. 407(6802): p. 340-8.
17. Selmer, M., et al., Structure of the 70S ribosome complexed with mRNA and tRNA. *Science*, 2006. 313(5795): p. 1935-42.
18. Francois, B., et al., Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.*, 2005. 33(17): p. 5677-90.
19. Vicens, Q. and E. Westhof, Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure (Camb)*, 2001. 9(8): p. 647-58.
20. Vicens, Q. and E. Westhof, Crystal structure of geneticin bound to a bacterial 16S ribosomal RNA A site oligonucleotide. *J. Mol. Biol.*, 2003. 326(4): p. 1175-88.
21. Vicens, Q. and E. Westhof, Crystal structure of a complex between the aminoglycoside tobramycin and an oligonucleotide containing the ribosomal decoding a site. *Chem. Biol.*, 2002. 9(6): p. 747-55.
22. Fourmy, D., S. Yoshizawa, and J.D. Puglisi, Paromomycin binding induces a local conformational change in the A-site of 16 S rRNA. *J. Mol. Biol.*, 1998. 277(2): p. 333-45.

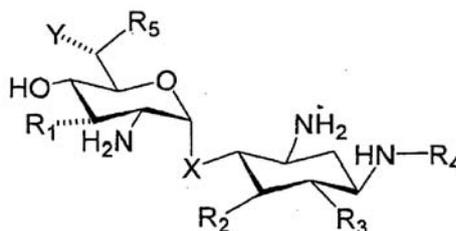
23. Howard, M.T., et al., Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, 2000. 48(2): p. 164-9.
24. Bedwell, D.M., et al., Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat. Med.*, 1997. 3(11): p. 1280-4.
- 5 25. Howard, M., R.A. Frizzell, and D.M. Bedwell, Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat. Med.*, 1996. 2(4): p. 467-9.
26. Du, M., et al., Aminoglycoside suppression of a premature stop mutation in a Cfr-/- mouse carrying a human CFTR-G542X transgene. *J. Mol. Med.*, 2002. 80(9): p. 595-604.
- 10 27. Wilschanski, M., et al., Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N. Engl. J. Med.*, 2003. 349(15): p. 1433-41.
28. Barton-Davis, E.R., et al., Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.*, 1999. 104(4): p. 375-81.
- 15 29. Keeling, K.M., et al., Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum. Mol. Genet.*, 2001. 10(3): p. 291-9.
30. Sangkuhl, K., et al., Aminoglycoside-mediated rescue of a disease-causing nonsense mutation in the V2 vasopressin receptor gene in vitro and in vivo. *Hum. Mol. Genet.*, 2004. 13(9): p. 893-903.
31. Helip-Wooley, A., et al., Expression of CTNS alleles: subcellular localization and aminoglycoside correction in vitro. *Mol. Genet. Metab.*, 2002. 75(2): p. 128-33.
- 20 32. Grayson, C., et al., In vitro analysis of aminoglycoside therapy for the Arg120stop nonsense mutation in RP2 patients. *J. Med. Genet.*, 2002. 39(1): p. 62-7.
33. Xi, B., F. Guan, and D.S. Lawrence, Enhanced production of functional proteins from defective genes. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. 126(18): p. 5660-1.
34. Forge, A. and J. Schacht, Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.*, 2000. 5(1): p. 3-22.
- 25 35. Nagai, J. and M. Takano, Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 2004. 19(3): p. 159-70.
36. Kaul, M., C.M. Barbieri, and D.S. Pilch, Defining the basis for the specificity of aminoglycoside-rRNA recognition: a comparative study of drug binding to the A sites of Escherichia coli and human rRNA. *J. Mol. Biol.*, 2005. 346(1): p. 119-34.
- 30 37. Vicens, Q. and E. Westhof, RNA as a drug target: the case of aminoglycosides. *Chembiochem*, 2003. 4(10): p. 1018-23.
38. Keeling, K.M. and D.M. Bedwell, Pharmacological suppression of premature stop mutations that cause genetic diseases. *Curr. Pharmacogenomics*, 2005. 3(4): p. 259-269.
- 35 39. Sener, G., et al., Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J. Pineal. Res.*, 2002. 32(4): p. 231-6.
40. Kawamoto, K., et al., Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol. Ther.*, 2004. 9(2): p. 173-81.
41. Gilbert, D.N., et al., Polyaspartic acid prevents experimental aminoglycoside nephrotoxicity. *J. Infect. Dis.*, 1989. 159(5): p. 945-53.
- 40 42. Beauchamp, D., et al., Protection against gentamicin-induced early renal alterations (phospholipidosis and increased DNA synthesis) by coadministration of poly-L-aspartic acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1990. 255(2): p. 858-66.
43. Thibault, N., et al., Protection against gentamicin nephrotoxicity by daptomycin in nephrectomized rats. *Life Sci.*, 1995. 56(22): p. 1877-87.
- 45 44. Thibault, N., et al., Attenuation by daptomycin of gentamicin-induced experimental nephrotoxicity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994. 38(5): p. 1027-35.
45. Watanabe, A., et al., Targeted prevention of renal accumulation and toxicity of gentamicin by aminoglycoside binding receptor antagonists. *J. Control Release*, 2004. 95(3): p. 423-33.
46. Bartal, C., et al., Pharmacokinetic dosing of aminoglycosides: a controlled trial. *Am. J. Med.*, 2003. 114(3): p. 194-8.
- 50 47. Beauchamp, D. and G. Labrecque, Aminoglycoside nephrotoxicity: do time and frequency of administration matter? *Curr. Opin. Crit. Care*, 2001. 7(6): p. 401-8.
48. Karpati, G. and H. Lochmuller, When running a stop sign may be a good thing. *Ann. Neurol.*, 2001. 49(6): p. 693-4.
- 55 49. Chernikov, V.G., et al., Comparison of cytotoxicity of aminoglycoside antibiotics using a panel cellular biotest system. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2003. 135(1): p. 103-5.
50. Keeling, K.M. and D.M. Bedwell, Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J. Mol. Med.*, 2002. 80(6): p. 367-76.
- 60 51. Howard, M.T., et al., Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann. Neurol.*, 2004. 55(3): p. 422-6.
52. Mattis, V.B., et al., Novel aminoglycosides increase SMN levels in spinal muscular atrophy fibroblasts. *Hum. Genet.*, 2006. 120(4): p. 589-601.
- 65 53. Arcamone, F.C., Giuseppe; Cuccia, Pietro B.; Di Colo, Giacomo, Synthesis of β -D-ribofuranosyl derivatives of paromamine. *Annali di Chimica (Rome, Italy)* 1974. 64(7-8): p. 485-96.

54. Haddad, J., et al., Design of novel antibiotics that bind to the ribosomal acyltransfer site. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002. 124(13): p. 3229-37.
55. Hanessian, S.O., Tomoya; Takamoto, Tetsuyoshi, Aminoglycoside antibiotics: synthesis of pseudotrisaccharides derived from neamine and paromamine. *Canadian Journal of Chemistry*, 1978. 56(11): p. 1500-8.
56. Kirby, J.P., D.B. Borders, and G.E. Van Lear, Structure of LL-BM408 an aminocyclitol antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 1977. 30(2): p. 175-7.
57. Marrero-Ponce, Y., et al., Atom, atom-type, and total nonstochastic and stochastic quadratic fingerprints: a promising approach for modeling of antibacterial activity. *Bioorg Med Chem*, 2005. 13(8): p. 2881-99.
58. Minowa, N., et al., Synthesis and antibacterial activity of novel neamine derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006. In Press.
59. Ogawa, T.T., T; Hanessian, S, Amionglycoside antibiotics. Synthesis of 6-0-(β -D-ribofuranosyl)paromamine. *Tetrahedron Letters*, 1974. 46: p. 4013-16.
60. Russell, R.J., et al., The complex of a designer antibiotic with a model aminoacyl site of the 30S ribosomal subunit revealed by X-ray crystallography. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003. 125(12): p. 3410-1.
61. Takeda, K., et al., Biosynthesis of butirosins. I. Biosynthetic pathways of butirosins and related antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)*, 1979. 32(1): p. 18-28.
62. Aurino, S. and V. Nigro, Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol.*, 2006. 25(1): p. 5-12.
63. PTC Therapeutics. Frequently asked questions about PTC124. 2006 [cited; Available from: <http://www.ptcbio.com/big/discovery/flash.html>].
64. Sandoval, R.M., et al., A non-nephrotoxic gentamicin congener that retains antimicrobial efficacy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2006. 17(10): p. 2697-705.
65. Pfister, P., et al., The molecular basis for A-site mutations conferring aminoglycoside resistance: relationship between ribosomal susceptibility and X-ray crystal structures. *Chembiochem*, 2003. 4(10): p. 1078-88.
66. Recht, M.I., S. Douthwaite, and J.D. Puglisi, Basis for prokaryotic specificity of action of aminoglycoside antibiotics. *Embo J.*, 1999. 18(11): p. 3133-8.
67. Abera, F.N., et al., Antibiotic use and the risk of flare of inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2005. 3(5): p. 459-65.
68. Dejace, P. and J. Klastersky, Emergence of resistance as a consequence of antimicrobial prophylaxis in immunocompromised patients. *Scand J Infect Dis Suppl*, 1986. 49: p. 165-71.
69. Hughes, J.M. and F.C. Tenover, Approaches to limiting emergence of antimicrobial resistance in bacteria in human populations. *Clin Infect Dis*, 1997. 24 Suppl 1: p. S131-5.
70. Kollef, M.H., Bench-to-bedside review: antimicrobial utilization strategies aimed at preventing the emergence of bacterial resistance in the intensive care unit. *Crit Care*, 2005. 9(5): p. 459-64.
71. Stratton, C.W., Dead bugs don't mutate: susceptibility issues in the emergence of bacterial resistance. *Emerg Infect Dis*, 2003. 9(1): p. 10-6.
72. Veeneman, G.H., S.H. Van Leeuwen, and J.H. Van Boom, Iodonium ion-promoted reactions at the anomeric center. II. An efficient thioglycoside-mediated approach toward the formation of 1,2-trans-linked glycosides and glycosidic esters. *Tetrahedron Lett.*, 1990. 31(9): p. 1331-4.
73. Schmidt, R.R., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1986. 25: p. 212.
74. Ding, Y., et al., Efficient synthesis of neomycin B related amino glycosides. *Tetrahedron Lett.*, 2000. 41(21): p. 4049-4052.
75. Du, M., et al., Clinical doses of amikacin provide more effective suppression of the human CFTR-G542X stop mutation than gentamicin in a transgenic CF mouse model. *J. Mol. Med.*, 2006. 84(7): p. 573-82.
76. Nudelman, I., et al., Redesign of aminoglycosides for treatment of human genetic diseases caused by premature stop mutations. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006. 16: p. 6310-6315.
77. Nagabhushan, T.L., et al., Interacting of Vicinal and Nonvicinal Amino-Hydroxy Group Pairs in Aminoglycoside-Aminocyclitol Antibiotics with Transition-Metal Cations - Selective N-Protection. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978. 100(16): p. 5253-5254.
78. Moon, M.S., et al., Synthesis of the selectively protected garamine derivatives as aminoglycoside intermediates. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2003. 24(2): p. 163-164.
79. Kirst, H.A., B.A. Truedell, and J.E. Toth, Control of Site-Specific Substitution of Aminoglycosides by Transition-Metal Cations. *Tet. Lett.*, 1981. 22(4): p. 295-298.
80. Nam, G., et al., An efficient and selective 1-N-monoethylation of sisomicin: Process development of netilmicin. *Org. Proc. Res. Dev.*, 2002. 6(1): p. 78-81.
81. Alper, P.B., et al., Probing the specificity of aminoglycoside-ribosomal RNA interactions with designed synthetic analogs. *J. Am. Chem. Soc.*, 1998. 120: p. 1965 - 1978.
82. Fridman, M., et al., Dual effect of synthetic aminoglycosides: antibacterial activity against *Bacillus anthracis* and inhibition of anthrax lethal factor. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2005. 44(3): p. 447-452.
83. Petit, C., Usher syndrome: from genetics to pathogenesis. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2001. 2: p. 271-97.
84. Ahmed, Z.M., et al., Mutations of the protocadherin gene PCDH15 cause Usher syndrome type 1F. *Am. J. Hum. Genet.*, 2001. 69(1): p. 25-34.

- 5
85. Kaul, M., C.M. Barbieri, and D.S. Pilch, Fluorescence-based approach for detecting and characterizing antibiotic-induced conformational changes in ribosomal RNA: comparing aminoglycoside binding to prokaryotic and eukaryotic ribosomal RNA sequences. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004. 126(11): p. 3447-53.
 86. Grentzmann, G., et al., A dual-luciferase reporter system for studying recoding signals. *Rna*, 1998. 4(4): p. 479-86.
 87. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifth information supplement Approved Standard M100-S5. 1994, Villanova, Pa.: NCCLS.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la Fórmula general I:



Fórmula I

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

cada uno de R₁, R₂ y R₃ es independientemente un resto monosacárido, haluro, hidroxilo, amina o un resto oligosacárido,

X es oxígeno o azufre;

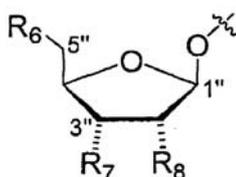
10 R₄ es (S)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB);

R₅ es hidroxilo;

Y es hidrógeno o alquilo; y

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

y en la que al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

15 en la que:

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

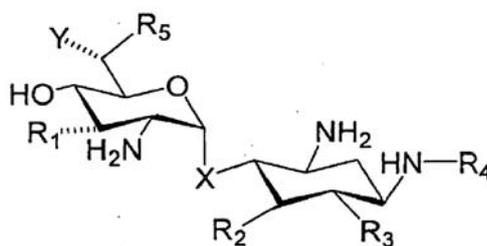
20 cada uno de R₆, R₇ y R₈ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X es oxígeno.

3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que Y es alquilo.

25

4. Un compuesto representado por la Fórmula general I:



Fórmula I

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

30 cada uno de R₁, R₂ y R₃ es independientemente un resto monosacárido, hidroxilo, amina o un resto oligosacárido,

X es oxígeno o azufre;

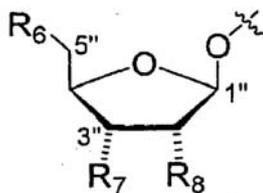
R₄ es hidrógeno;

R₅ es hidroxilo;

35 Y es hidrógeno;

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

y en la que al menos uno de R₁, R₂ y R₃ es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

en la que:

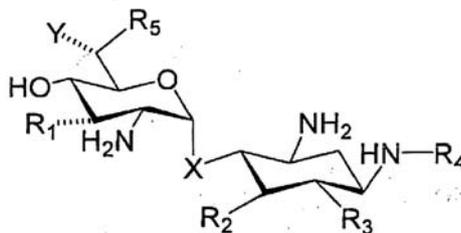
5 la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*; y cada uno de R_6 , R_7 y R_8 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina; para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.

5. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que X es oxígeno.

10 6. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en el que R_6 es amina.

7. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que R_7 y R_8 son cada uno hidroxilo.

8. Un compuesto representado por la Fórmula general I:



Fórmula I

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

cada uno de R_1 , R_2 y R_3 es independientemente un resto monosacárido, haluro, hidroxilo, amina o un resto oligosacárido,

20 X es oxígeno o azufre;

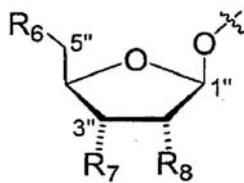
R_4 es hidrógeno o (*S*)-4-amino-2-hidroxitirilo (AHB);

R_5 es hidroxilo o amina;

Y es alquilo;

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

y en la que al menos uno de R_1 , R_2 y R_3 es un resto monosacárido representado por la Fórmula general II:



Fórmula II

en la que:

30 la línea discontinua indica una configuración *R* o una configuración *S*; y cada uno de R_6 , R_7 y R_8 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidroxilo y amina, para su uso en el tratamiento de un trastorno genético.

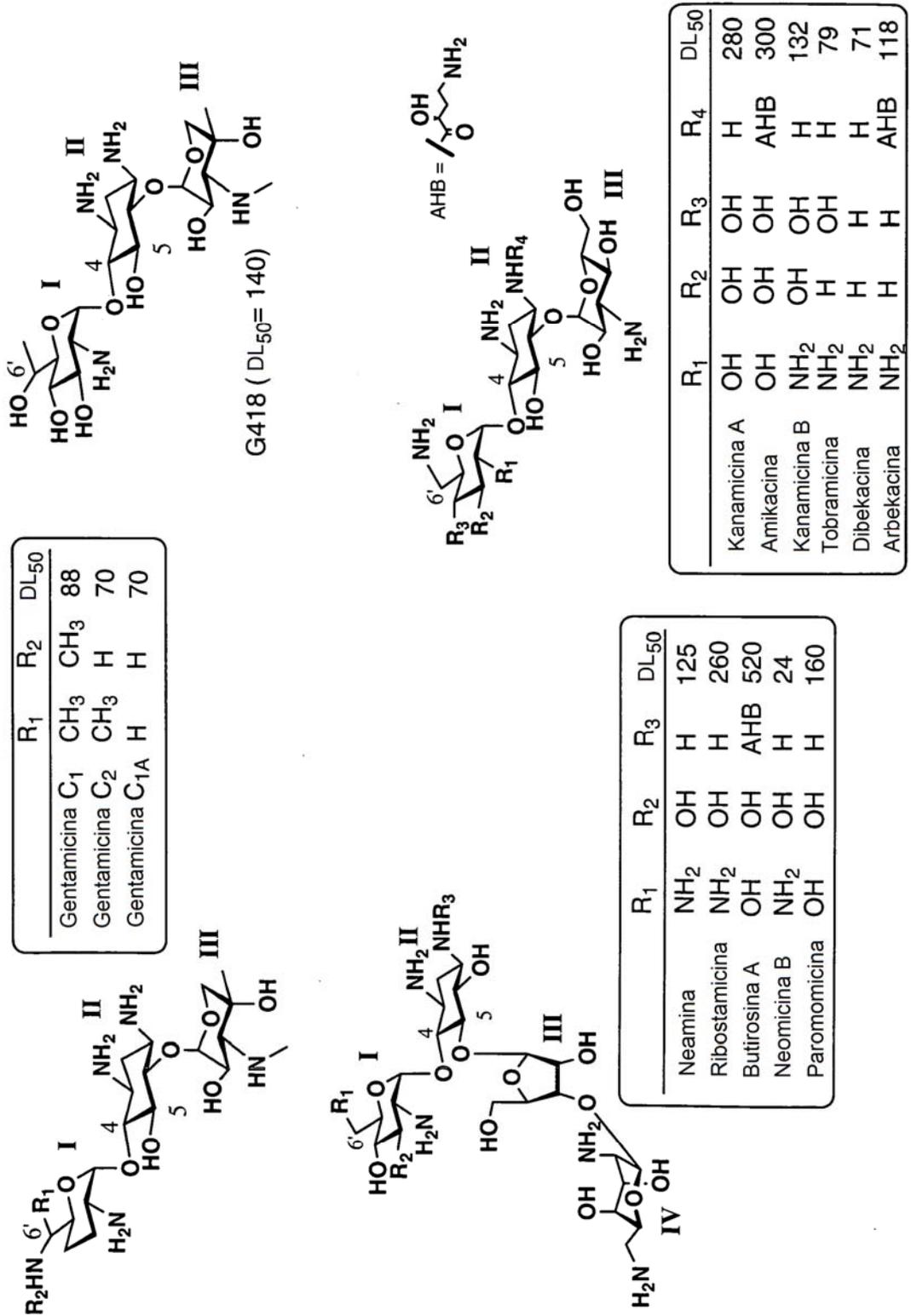
9. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que X es oxígeno.

35 10. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que R_5 es hidroxilo.

11. El compuesto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que R_4 es AHB.

40 12. El compuesto para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en el que el trastorno genético está asociado a una mutación de codón de parada prematura.

Figura 1 (antecedentes de la técnica)



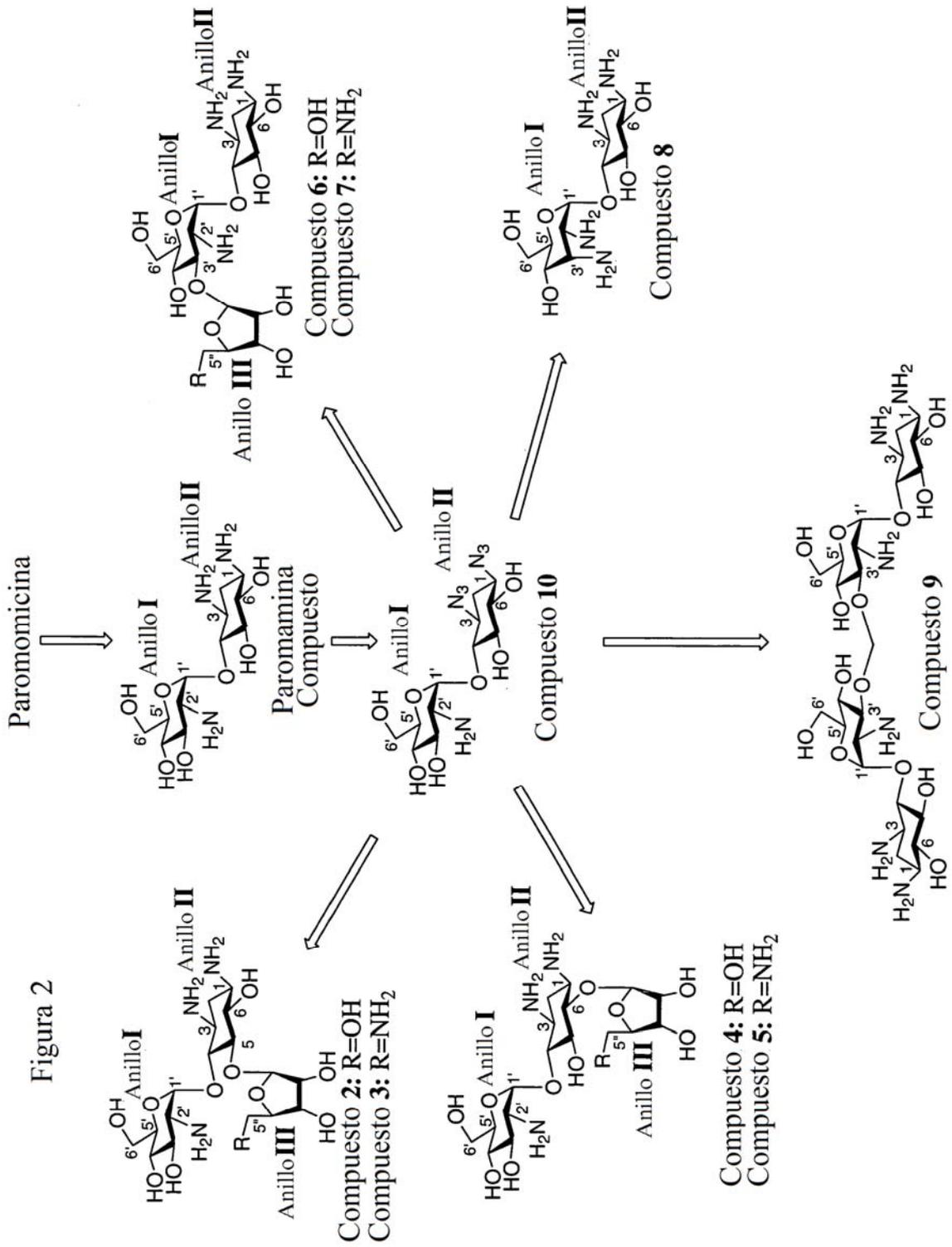


Figura 3

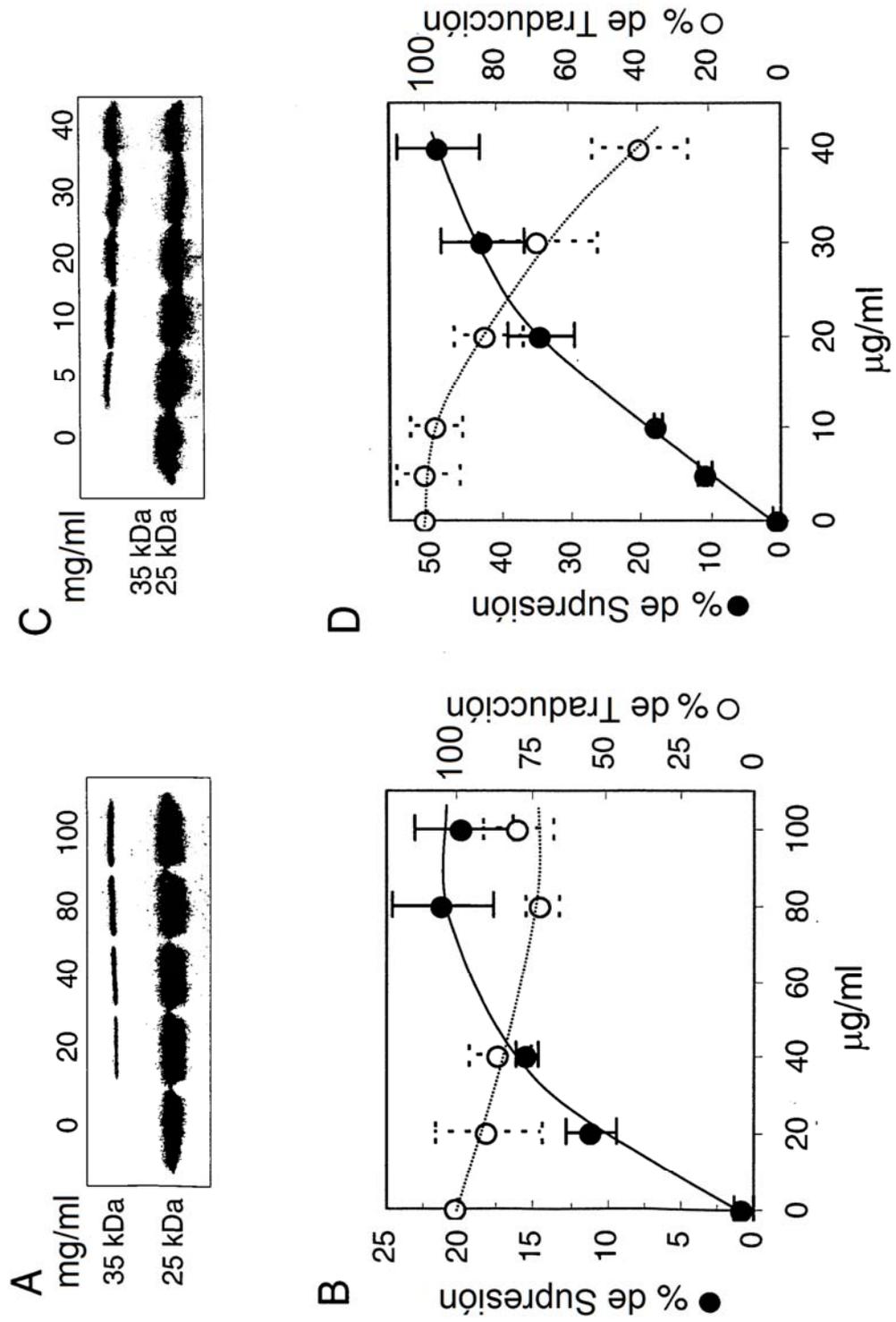


Figura 4

