

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 538**

21 Número de solicitud: 201630714

51 Int. Cl.:

C07D 265/36 (2006.01)

A61K 31/538 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

31.05.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.01.2018

Fecha de concesión:

10.10.2018

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.10.2018

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2016/070730

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (62.0%)
HOSPITAL REAL. AVDA. HOSPICIO S/N
18071 GRANADA (Granada) ES;
CANVAX BIOTECH S.L. (37.0%) y
UNIVERSIDAD DE JAÉN (1.0%)**

72 Inventor/es:

**CAMPOS ROSA, Joaquín María;
GARCÍA RUBIÑO, María Eugenia;
MARCHAL CORRALES, Juan Antonio;
MORATA TARIFA, Cynthia;
RAMÍREZ RIVERA, Alberto y
PAZ ROJAS, Elier**

54 Título: **BENZO-HETEROCICLOS DE SEIS MIEMBROS CON ÁTOMOS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO
CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

57 Resumen:

Benzo-heterociclos de seis miembros con átomos de oxígeno y nitrógeno con actividad antitumoral.

La presente invención se refiere a una nueva familia de benzo-heterociclos de seis miembros con átomos de oxígeno y nitrógeno, unidos a purinas, a halógenos y a triazoles sustituidos que son útiles en terapia frente al cáncer, en particular en terapias cuya diana terapéutica son las células madre cancerígenas. La invención también describe el procedimiento de síntesis de dichos compuestos.

ES 2 648 538 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

BENZO-HETEROCICLOS DE SEIS MIEMBROS CON ÁTOMOS DE OXÍGENO Y NITRÓGENO CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

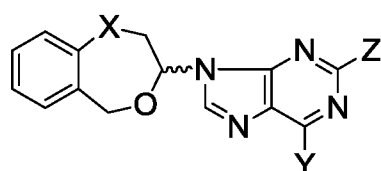
5

ESTADO DE LA TECNICA

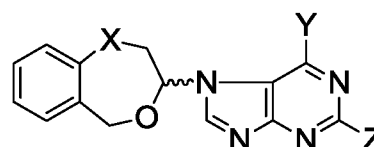
El cáncer sigue siendo una de las causas principales de muerte en el mundo civilizado. A pesar de los grandes progresos que se han llevado a cabo en cuanto a la comprensión de las bases moleculares del cáncer, de la detección y del tratamiento, su mortalidad sigue siendo alta y no hay una cura definitiva a pesar de las mejoras que han experimentado las diversas terapias. Los regímenes actuales muestran supervivencias limitadas cuando se aplican a la mayoría de cánceres en estadios avanzados. Con el auge de la bio-informática y la biología molecular, se han desarrollado nuevas técnicas que permiten analizar las modificaciones globales del genoma y del proteoma de las células tumorales. La detección mediante estas técnicas de las modificaciones génicas y proteicas inducidas por nuevos fármacos antitumorales, permiten caracterizar las dianas potenciales de estos compuestos y el conocimiento más certero de cuál es el mecanismo de acción de los mismos. La profundización en los mecanismos de regulación de estos eventos apoya el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el diseño racional de nuevos agentes antitumorales selectivos frente a sus dianas moleculares.

Uso de purinas en el tratamiento de cáncer

Entre los distintos principios activos para el tratamiento de cáncer conocidos en el estado de la técnica se encuentran las purinas. En el estado de la técnica más cercano a la presente invención se encuentra la patente ES200601538, donde se describen mezclas racémicas y sus usos en el tratamiento del cáncer de las estructuras **1** y **2**.



- 1** X=O; Y= Cl, Z= H
 X=O; Y= Br, Z= H
 X=O; Y= I, Z= H
 X=O; Y= CF₃, Z= H
 X=O; Y= Z= Cl
 X=S; Y= Cl, Z= H
 X=SO₂; Y= Cl, Z= H



- 2** X=O; Y= Cl, Z= H
 X=O; Y= I, Z= H
 X=O; Y= CF₃, Z= H
 X=O; Y= Z= Cl
 X=S; Y= Cl, Z= H
 X=SO₂; Y= Cl, Z= H

Dichas familias de compuestos **1** y **2** presentan actividad antitumoral frente a diversas estirpes de cánceres y baja toxicidad frente a una línea celular sana (línea epitelial de mama normal MCF-10A).

5 En particular, ES200601538 divulga compuestos en los que en el anillo heptagonal los heteroátomos presentes son O y X, donde X se selecciona de entre O, S y SO₂, y sus concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀) sobre la línea celular humana derivada de cáncer de mama MCF-7.

10 Las actividades antitumorales de estos compuestos son notables y comparables a los agentes activos convencionalmente utilizados en terapia como el agente citotóxico 5-fluorouracilo (Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J.A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J.A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Campos, J.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1457-1460).

15 En su esfuerzo por proporcionar agentes anti-proliferativos mejorados los inventores posteriormente han divulgado nuevos compuestos, O,N-acetales y su síntesis en los que X en el anillo heptagonal es un átomo de N sustituido con un grupo nitrobensulfonilo (Díaz-Gavilán, M.; Choquesillo-Lazarte, D.; González-Pérez, J.M.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Campos, J.M. *Tetrahedron* 2007, 63, 5274-5286).

20 Los resultados sobre las actividades anti-proliferativas de diversos compuestos O,N-acetales N-9 y N-7purínicos o N-1 y N-3 pirimidínicos in vitro frente a la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 han sido publicadas (Díaz-Gavilán, M.; Gómez-Vidal, J.A.; Rodríguez-Serrano, F.; Marchal, J.A.; Caba, O.; Aránega, A.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Campos, J.M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 1457-1460). Estos resultados, han puesto de manifiesto, entre otros aspectos, que los compuestos antitumorales más potentes son los derivados de purina. También parecen en general
25 más potentes los compuestos que presentan un anillo de 4,1-benzoxazepina frente a los compuestos que presenta un anillo de 4,1-benzoxatiepino o de 4,1-benzodioxepino.

30 Por otro lado, en la patente ES200802431 se describe el (RS)-9-[1-(p-nitrobensulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-2,6-dicloro-9H-purina. En una reciente publicación hemos demostrado el efecto inhibitorio sobre quinasas implicadas en carcinogénesis, proliferación y angiogénesis (Ramírez A.; Boulaiz H.; Morata-Tarifa C.; Perán M.; Jiménez G.; Picón-Ruiz M.; Agil A, Cruz-López O.; Conejo-García A.; Campos JM.; Sánchez A.; García MA.; Marchal JA. *Oncotarget* 2014, 5,
35 3590-3606). Dicho compuesto inhibió la ruta de señalización de HER-2 y las quinasas JNK y ERK1/2. Además tuvo un efecto inhibitorio de AKT y de VEGF, junto con actividades anti-migratorias y anti-angiogénicas. Por otro lado, dicho compuesto

fue capaz de inhibir la formación de mamó y colonosferas, y eliminó las subpoblaciones de CSCsaldehído deshidrogenasa positivas (ALDH1+) a bajo rango micromolar. Esta acción fue debida a la regulación a la baja de c-MYC, β -CATENINA y SOX2, y el exceso de regulación del represor de la ruta de señalización Hedgehog, GLI-3. Finalmente, también demostró eficacia anti-tumoral y anti-metastásicain vivo en tumores inducidos (xenotransplantes) sin presentar toxicidad aguda o sub-aguda (Ramírez A.; Boulaiz H.; Morata-Tarifa C.; Perán M.; Jiménez G.; Picón-Ruiz M.; Agil A, Cruz-López O.; Conejo-García A.; Campos JM.; Sánchez A.; García MA.; Marchal JA. Oncotarget 2014, 5, 3590-3606).

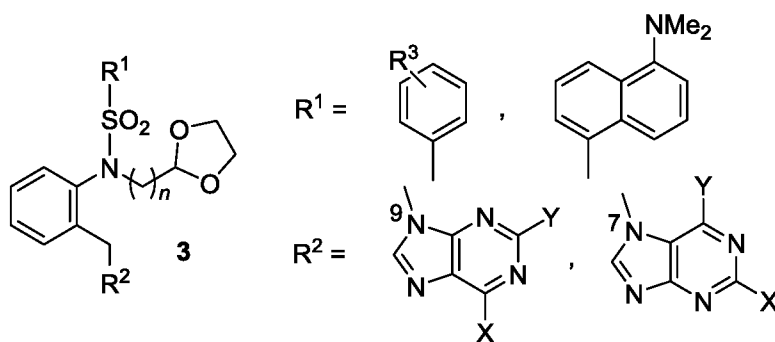
10

Por otro lado, en la patente ES201030415 se presentan los dos enantiómeros del(*RS*)-9-[1-(*p*-nitrobencensulfonil)-1,2,3,5-tetrahidro-4,1-benzoxazepin-3-il]-2,6-dicloro-9*H*-purina, con inhibición de EGFR, HER-2 y de VEGF, con producción de un elevado nivel de apoptosis en células tumorales y además, sin manifestación de toxicidad aguda ni crónica.

15

Finalmente, en la patente ES201430048 se describe la preparación de sulfonamidas secundarias **3** (derivadas de aminas secundarias), y a su uso como medicamentos para el tratamiento y prevención del cáncer, en particular para el tratamiento de cáncer de mama, pulmón, colorrectal, páncreas, neoplasias y síndromes mielo-proliferativos.

20



Las estructuras tipo **3**, están relacionadas con bozepinib y derivados, en cuanto que presentan unidades de purinas en su estructura, sin embargo como aspecto diferenciador son estructuras acíclicas frente a la estructura del bozepinib que presenta un anillo de siete miembros heterocíclico. Otro aspecto diferenciador es que en la familia **3** no existe estereocentro que si está presente en el bozepinib, lo que simplifica el procedimiento sintético.

25

Las principales dificultades que presentan los compuestos descritos en estas patentes son la escalabilidad y sus síntesis enantioméricas.

30

Células Madre Cancerígenas

En la actualidad, uno de los conceptos más interesantes que se está explorando en la investigación de cáncer es la teoría de las células madre cancerígenas (en adelante “CSCs”, del inglés “*Cancer Stem Cells*”) o células iniciadoras de tumor. Las CSCs se pueden definir como las sub-poblaciones de células dentro de los tumores que poseen la capacidad de auto-renovarse y diferenciarse en las diferentes líneas de células cancerosas que componen el tumor. Este tipo de células es propuesto como el promotor de la resistencia frente terapias antitumorales, siendo capaz de mantener tumores benignos y malignos, así como provocar recidivas (Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. *Nature* 2001, 414, 105-111). En comparación con las células madre normales, se cree que las CSCs no tienen ningún control en su proliferación. Estas CSCs, presentes en los tumores en pequeña cantidad, se caracterizan por su capacidad para permanecer quiescentes durante largos periodos de tiempo, capacidad de auto-renovación, mantenimiento del crecimiento y heterogeneidad del tumor, afinidad por ambientes hipóxicos, resistencia a quimioterapia y desarrollo de metástasis (Tirino, V.; Desiderio, V.; Paino, F.; De Rosa, A.; Papaccio, F.; La Noce, M.; Laino, L.; De Francesco, F.; Papaccio, G. *FASEB J.* 2013, 27, 13-24).

Las CSCs se caracterizan por su capacidad para formar colonias esféricas al ser cultivadas en suspensión (Dontu, G.; Abdallah, W.M.; Foley, J.M.; Jackson, K.W.; Clarke, M.F.; Kawamura, M.J.; Wicha, M.S. *Genes Dev*, 2003, 17, 1253-1270). Al-Hajj et al. lograron demostrar que la inyección de 200 células tumorales que expresaban marcadores característicos de CSCs fue más eficaz a la hora de generar tumores en ratones inmuno-deprimidos que la inyección de 50.000 células tumorales con marcadores de células diferenciadas de la misma estirpe histológica (Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernández, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:3983-3988). Se ha encontrado que múltiples moléculas relacionadas con las propiedades características de las células madre tales como auto-renovación y pluripotencia, y determinadas actividades enzimáticas se expresan en gran medida en CSCs, incluyendo c-MYC, β -CATENINA (Moumen, M.; Chiche, A.; Decraene, C.; Petit, V.; Gandarillas, A.; Deugnier, M.A.; Glukhova, M.A.; Faraldo, M.M. *Mol Cancer*, 2013, 12, 132-140), SOX-2 (Leis, O.; Eguiara, A.; López-Arribillaga, E.; Alberdi, M.J.; Hernández-García, S.; Elorriaga, K.; Pandiella, A.; Rezola, R.; Martín, A.G. *Oncogene* 2012, 31, 1354-1365), y la actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH1) (Deng, S.; Yang, X.; Lassus, H.; Liang, S.; Kaur, S.; Ye, Q.; Li C.; Wang, L.P.; Roby, K.F.; Orsulic, S.; Connolly, D.C.; Zhang, Y.; Montone, K.; Bützow, R.; Coukos, G.; Zhang, L.

PLoSOne 2010, 5, e10277, entre otras). Actuando selectivamente sobre las rutas o moléculas sobre-reguladas en las células cancerosas diferenciadas y/o en las poblaciones CSC, pero no en las células normales, pueden proporcionar nuevas estrategias para una terapia selectiva y efectiva frente al cáncer.

5

Terapias dirigidas contra Células Madre Cancerígenas

En la actualidad, el tratamiento del cáncer se dirige a su potencial de proliferación y, por lo tanto, la mayoría de los tratamientos están dirigidos a las células que se dividen rápidamente. La presencia de las CSCs puede explicar el fracaso de los tratamientos para erradicar la enfermedad o la recurrencia del cáncer (Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Nature 2001, 414, 105-111). La propiedad que tienen las CSCs para mantenerse en un estado de quiescencia, estado en el que la célula no se divide, permaneciendo en la fase G₀ del ciclo celular, (Arai, F.; Hirao, A.; Ohmura, M.; Sato, H.; Matsuoka, S.; Takubo, K.; Ito, K.; Koh, G.Y.; Suda, T. Cell 2004, 118, 149-161) les permite sobrevivir a la mayoría de los tratamientos anti-cancerígenos. Esta característica hace posible las recaídas o recidivas, incluso décadas después del tratamiento inicial, como es el caso del cáncer de colon o mama (Reya, T.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F.; Weissman, I.L. Nature 2001, 414, 105-111; Dick J.E. Blood 2008, 112, 4793-4807). Aunque los tratamientos actuales pueden reducir el tamaño del tumor, estos efectos son transitorios y generalmente no mejoran los resultados de supervivencia de los pacientes. Para tumores en los que las CSCs desempeñan un papel, existen tres posibilidades. En primer lugar, la mutación de las células madre normales o células progenitoras de las CSCs puede conducir al desarrollo del tumor primario. En segundo lugar, durante la quimioterapia, se puede destruir la mayoría de las células del tumor primario, pero si las CSCs no se erradican, se convierten en CSCs refractarios y puede conducir a la reaparición del tumor (Stockler, M.; Wilcken, N.; Ghersi, D.; Simes, R.J. Cancer Treat Rev 2000, 26, 151-168). En tercer lugar, las CSCs pueden migrar a sitios distantes del tumor primario y provocar metástasis (Jordan, C.T.; Guzman, M.L. Oncogene 2004, 23, 7178-7187; Jordan, C.T.; Guzman, M.L.; Noble, M. New Eng. J Med 2006, 355, 1253-1261; Liu, H.G.; Chen, C.; Yang, H.; Pan, Y.F.; Zhang, X.H. Transl Med 2011, 9, 50-58). Teóricamente, la identificación de las CSCs puede permitir el desarrollo de modalidades de tratamiento que se dirijan frente a dichas células en lugar de hacia las células que se dividen rápidamente (Jayesh, S.; Chaib, B.; Sales, M.; Seifalian, A. Cancer Cell Int 2009, 7, 9-14).

Una de las aproximaciones terapéuticas que se estudian actualmente para combatir las CSCs está relacionada con las vías de señalización implicadas en los procesos de su auto-renovación, proliferación y diferenciación. Esto se debe a que la pérdida de la regulación de vías como Hedgehog (Hh), Notch y Wnt/ β -catenina, da lugar a los procesos claves implicados en las características propias de las CSCs. Actualmente, la terapia dirigida frente a estas rutas representa uno de los mecanismos de actuación más prometedores frente a estas células iniciadoras del tumor (Maugeri-Sacca M.; Zeuner A.; De Maria R. *Front Oncol.* 2011, 1, 10; Takebe N.; Harris P.J.; Warren R.Q.; Ivy S.P. *NatRevClinOncol* 2011, 8, 97-106).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una nueva familia de benzo-heterociclos de seis miembros con átomos de oxígeno y nitrógeno, unidos a purinas y a halógenos, que son útiles en terapia frente al cáncer, en particular en terapias cuya diana terapéutica son las células madre cancerígenas, y más particularmente frente al melanoma, preferiblemente al melanoma metastásico, y el cáncer de mama, pulmón, páncreas y colorrectal. También se considerarán objeto de la invención los enantiómeros, isómeros, sales, o solvatos, de dichos compuestos. También son objeto de la invención los pro-fármacos de los compuestos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Esquema de reacción del procedimiento de síntesis de los compuestos de la invención.

Figura 2. Aislamiento y caracterización de las sub-poblaciones de CSCs a partir de las células MDA-MB 468 mediante separación por citometría de flujo según la actividad aldehído deshidrogenasa; A: uso del inhibidor, B: sub-población ALDH(+), C: sub-población ALDH (-).

Figura 3. Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico pertenecientes a mamíferos cultivados tras el aislamiento de las sub-poblaciones de CSCsALDH+ de la línea celular MDA-MB 468.

Figura 4. Western blot de la línea celular MDA-MB 468 usando **13** a una concentración de 5 μM durante 2h, 4h, 8h, 12h, 16h y 24h. A. Efecto sobre EGFR y ERK1/2 fosforilados. B. Análisis densitométrico normalizado con la señal de β -actina

5 **Figura 5.** Western blot de Sox2 (SOX-2) de las sub-poblaciones de CSCs ALDH+ aisladas de la línea celular MDA-MB 468 y tratadas con **13** a una concentración de 1.43 μM (CI_{50}) y 2.86 μM ($2 \times \text{CI}_{50}$) durante 24h.

10 **Figura 6.** Representación de la actividad antitumoral *in vivo* de **13** sobre la línea metastásica de melanoma humano A375. A los ratones usados como control se les inyectó únicamente el vehículo (●) y los tratados con **13** se dividieron en dos grupos, uno tratado con 50 mg/kg (■) y otro con 100 mg/kg (▲).

15 **Figura 7.** Curva de supervivencia de Kaplan–Meier de los ratones tratados con el vehículo (controles, ●) y tratados con **13** (■: 50 mg/kg, ▲: 100 mg/kg).

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

- 20
- En el presente documento los siguientes términos tienen los significados indicados: "Alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, que tiene 1-12, preferiblemente de uno a ocho, más preferiblemente de uno a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de
- 25
- la molécula por un enlace sencillo, p. ej., metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, etc.
- "Alquenilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos una insaturación, que tiene 2-12, preferiblemente de dos a ocho, más
- 30
- preferiblemente de dos a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo.
- "Alquinilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono, conjugado o no, que tiene de dos a doce,
- 35
- preferiblemente de dos a ocho, preferiblemente de dos a seis átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo, tales como -CCH, -CH₂CCH, -CCCH₃, -CH₂CCCH₃.

- "Arilo" o "Ar" se refiere a un radical hidrocarbonado aromático tal como fenilo, naftilo o antracilo.
- "Arialalquilo" se refiere a un grupo arilo unido al resto de la molécula a través de un grupo alquilo, tal como bencilo y fenetilo.
- 5 • "Cicloalquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada cíclico que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturación, que tiene de 3 a 8 átomos de carbono, unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. "Alcoxilo" se refiere a un radical de fórmula -Oalquilo, p. ej. metoxi, etoxi, propoxi, etc. "Ariloxilo" se refiere a un radical de fórmula -Oarilo.
- 10 • "Heterocicloalquilo" se refiere a un anillo estable de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo constituido por nitrógeno, oxígeno y azufre, preferiblemente un anillo de 4 a 8 miembros con uno a más heteroátomos, más preferiblemente un anillo de 5 ó 6 miembros con uno o más heteroátomos unidos al átomo de nitrógeno de tipo anilínico mediante un grupo alquilo, tal como metilo, etilo, propilo unido a cualquier átomo de carbono del sistema heterociclo. Para el propósito de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema anular monocíclico, bicíclico o tricíclico, que puede incluir sistemas de anillos condensados; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el heterociclo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el heterociclo puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático. Los ejemplos de dichos heterociclos incluyen, pero no se limitan a azepinas, bencimidazol, benzotiazol, furano, isotiazol, imidazol, indol, piperidina, piperazina, purina, quinolina, tiadiazol, tetrahidrofurano.
- 15 • "Acilo" se refiere a un grupo -C(=O)R⁴.
- 20 • "Alcoxiacilo" se refiere a un grupo -C(=O)OR⁴ tales como carbamato de metilo, carbamato de etilo, carbamato de bencilo, carbamato de *p*-nitrobencilo, carbamato de *terc*-butilo, carbamato de alilo, carbamato de 2,2,2-tricloroetilo, carbamato de 2-(trimetilsilil)etilo, y carbamato de alilo.
- 25 • "Alcoxisulfonilo" se refiere a un grupo -SO₂OR⁴ tales como sulfato de metilo, sulfato de etilo, sulfato de bencilo, sulfato de *p*-nitrobencilo, sulfato de *terc*-butilo, sulfato de alilo, sulfato de 2,2,2-tricloroetilo, sulfato de 2-(trimetilsilil)etilo, y sulfato de alilo.
- 30

En las fórmulas anteriores R^4 representa un grupo seleccionado del grupo constituido por alquilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, aril-alquilo sustituido o no sustituido, y heterociclo.

5 Las funciones orgánicas que se encuentran unidas a un átomo de oxígeno son bien conocidas en la técnica y son representativas las siguientes:

- Éteres de sililo de fórmula $-Si(R^4)_3$, tales como éter de trimetilsililo, éter de trietilsililo, éter de *tert*-butildimetilsililo, éter de *tert*-butildifenilsililo, éter de triisopropilsililo, éter de dietilisopropilsililo, éter de texildimetilsililo, éter de 10 trifenilsililo, éter de di-*tert*-butilmetilsililo;
- Éteres de alquilo y arilalquilo tales como éter de metilo, éter de *tert*-butilo, éter de bencilo, éter de *p*-metoxibencilo, éter de 3,4-dimetoxibencilo, éter de tritilo; éter de alilo;
- Éteres de alcoximetilo y ariloxilo de fórmula $-CH_2OR^4$, tales como éter de 15 metoximetilo, éter de 2-metoxietoximetilo, éter de benciloximetilo, éter de *p*-metoxibenciloximetilo, éter de 2-(trimetilsilil)etoximetilo; tetrahidropiranilo y éteres relacionados; éter de metiltiometilo;
- Esteres de fórmula $-C(=O)R^4$, tales como éster acetato, éster benzoato, éster pivalato (dimetilacetato), éster metoxiacetato, éster cloroacetato, éster 20 levulinato (4-oxopentanoato);
- Carbonatos de fórmula $-C(=O)OR^4$, tales como carbonato de bencilo, carbonato de *p*-nitrobencilo, carbonato de *tert*-butilo, carbonato de 2,2,2-tricloroetilo, y carbonato de 2-(trimetilsilil)etilo, carbonato de alilo.
- Sulfonatos de fórmula $-SO_2R^4$, tales como sulfonatos de metilo, tosilato, 25 brosilato, mesilato.

En todas las fórmulas anteriores R^4 representa un grupo seleccionado del grupo constituido por alquilo sustituido o no sustituido, alquenilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido y arilalquilo sustituido 30 o no sustituido.

El término "tratamiento" o "tratar" en el contexto de este documento se refiere a la administración de un compuesto o una composición según la invención para prevenir, mejorar o eliminar la enfermedad, condición patológica o uno o más síntomas 35 asociados con dicha enfermedad o condición en un mamífero, preferentemente en un ser humano. "Tratamiento" también abarca la prevención, mejora o eliminación de las

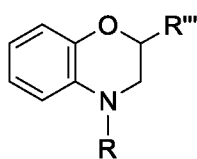
secuelas fisiológicas de la enfermedad. Concretamente, el concepto “*tratar*” se puede interpretar como:

- 5 (i) Evitar que se produzca la enfermedad o la condición patológica en un mamífero, en particular, cuando dicho mamífero tiene pre-disposición por la condición patológica, pero aún no se diagnosticó que la tenga. En particular, el método de la invención permitiría, tras la detección de CSCs, comenzar un tratamiento que podría prevenir el desarrollo del tumor con antelación;
- 10 (ii) Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
- (iii) Aliviar la enfermedad o la condición patológica, es decir, causar la regresión de la enfermedad o la condición patológica;
- (iv) Estabilizar la enfermedad o la condición patológica.

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término “comprende”, que también podrá interpretarse como “consiste en”, y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

20 Compuestos de la invención

En un primer aspecto de la invención, la presente invención se refiere a nuevos compuestos (“compuestos de la invención”), de fórmula general **IV**

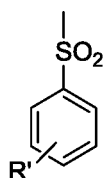


IV

25

donde

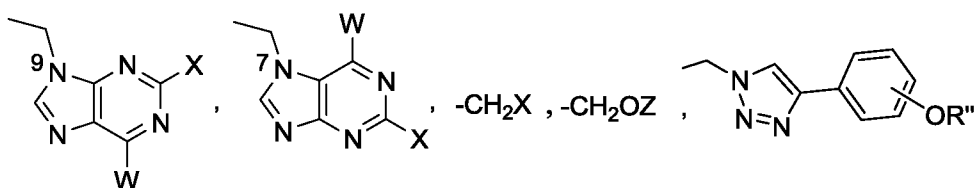
- R puede ser un alquilo, alqueno, alquino, arilalquilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, -C(=O)R'', -C(=O)OR'', o bien el resto de bencensulfonilo
- 30 indicado a continuación:



- R' puede ser H, OH, 3,5-diOH, 2-NO₂, 3-NO₂, 4-NO₂, 2-NH₂, 3-NH₂, 4-NH₂, 4-Me, 4-OMe (Ts), 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI o 3,5-diMe en un resto de bencensulfonilo;

5

- R''' se selecciona del grupo formado por:



10

- X y W representan cada uno, independientemente entre sí, un átomo electronegativo seleccionado del grupo formado por -Cl, -Br, e -I;

- Z es un grupo de átomos que se encuentra integrado dentro de diversas funciones orgánicas tales como éteres de sililo de fórmula -Si(R⁴)₃, éteres de alquilo y arilalquilo, éteres de alcoximetilo y ariloxilo de fórmula -CH₂OR⁴; ésteres de fórmula -C(=O)R⁴; carbonatos de fórmula -C(=O)OR⁴ y sulfonatos de fórmula -SO₂R⁴.

15

- R''' puede ser H, grupos acilo de fórmula -C(=O)R⁴, de tal manera que el grupo -OC(=O)R⁴ puede ser un éster acetato, éster benzoato, éster pivalato (dimetilacetato), éster metoxiacetato, éster cloroacetato, éster levulinato (4-oxopentanoato),

20

- R⁴ representa un grupo seleccionado del grupo constituido por alquilo sustituido o no sustituido, alquilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, y heterociclo.

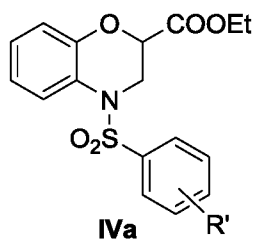
25

En una realización particular, los compuestos de la invención se presentan en forma cristalina como compuestos libres o solvatos (por ejemplo hidratos) o como enantiómeros, isómeros, o sales de dichos compuestos estando todas estas formas comprendidas en el ámbito de protección de la presente invención. Los métodos de solvatación son generalmente conocidos en el estado de la técnica.

30

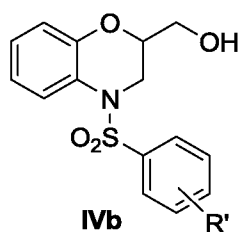
También quedan comprendidos en el ámbito de la presente invención los pro-fármacos de los compuestos de la invención.

Una realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVa**.

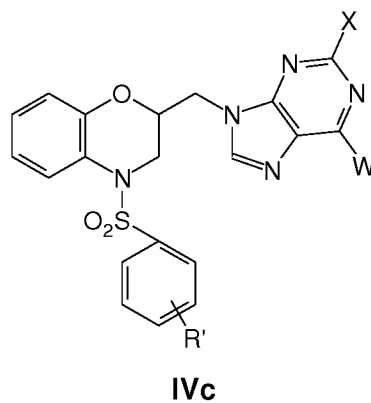


5

Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVb**.

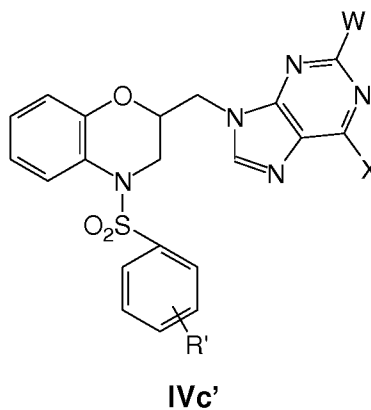


Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVc**.



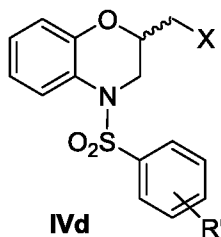
10

Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVc'**.

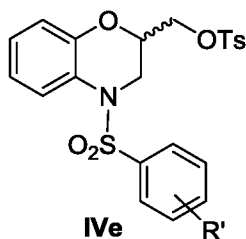


15

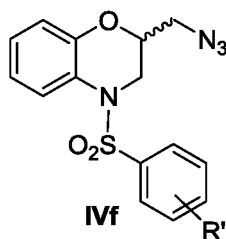
Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVd**.



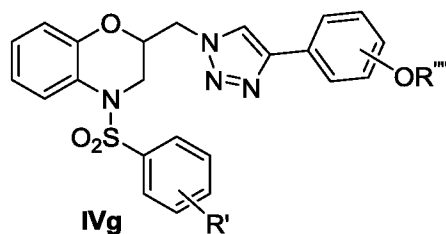
5 Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVe**.



10 Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVf**.

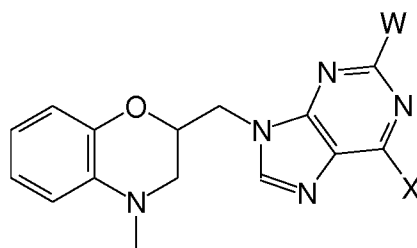


Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVg**.



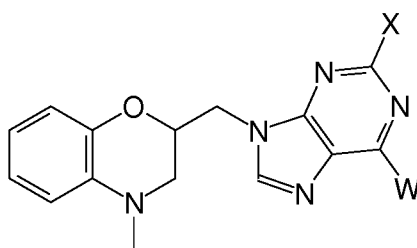
15

Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general **IVh**.



IVh

- 5 Aún otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos de fórmula general IVh'.



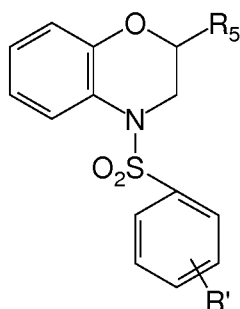
IVh'

- 10 Otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos seleccionados del grupo que consiste en los compuestos detallados en la Tabla 1:

Grupo	Comp.	R	R'''	W	X
IVa	4	-Ts	-CO ₂ Et	-	-
IVb	5	-Ts	-CH ₂ OH	-	-
IVd	6	-Ts	-CH ₂ Cl	-	-
IVe	7	-Ts	-CH ₂ Ts	-	-
IVh'	8	-CH ₃		Cl	H
	9	-CH ₃		Br	H
	10	-CH ₃		Cl	Cl
IVc	11	-Ts		Cl	H
	12	-Ts		Br	H
	13	-Ts		Cl	Cl
IVf	14	-Ts	CH ₂ N ₃	-	-
IVg	15	-Ts		-	-

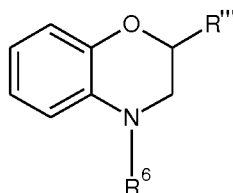
Tabla 1. Realizaciones preferentes de 3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina.

Aún otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a



5 Donde R₅ se selecciona de la lista que consiste en -CO₂Et, -CH₂OH, -CH₂Cl y -CH₂Ts.

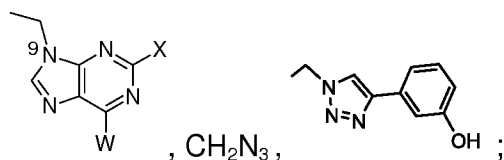
Aún otra realización particular del primer aspecto de la invención se refiere a compuestos con la siguiente fórmula general V.



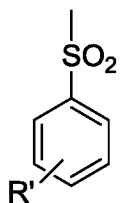
V

10

Donde R''' se selecciona del grupo formado por:



15 y donde R₆ se selecciona del grupo que consiste en un grupo metilo o en el siguiente grupo:



Formulaciones farmacéuticas

20

En un segundo aspecto, la invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden como ingrediente activo al menos un compuesto de la invención, en

particular un compuesto de los detallados en las realizaciones preferidas del primer aspecto de la invención. Dichas formulaciones farmacéuticas pueden contener uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dichas formulaciones puede contener cualquier otro ingrediente activo en el tratamiento de cáncer.

5

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéutica y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

10

15

Opcionalmente la composición farmacéutica puede comprender otro principio activo. Además del requerimiento de la eficacia terapéutica, que puede necesitar el uso de agentes terapéuticos, además de los compuestos de la invención, pueden existir razones fundamentales adicionales que obligan o recomiendan en gran medida el uso de una combinación de un compuesto de la invención y otro agente terapéutico, tal y como en el tratamiento de enfermedades o afecciones que directa o indirectamente modulan la función de la sustancia.

20

25

Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

30

35

Las formulaciones farmacéuticas pueden contener uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dichas formulaciones pueden contener otros ingredientes activos con propiedades anti-cancerígenas. Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular o intravenosa), aunque la mejor vía de

administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

5

Las composiciones de la invención (ver composiciones del primer o segundo aspecto de la invención) se preparan utilizando métodos habituales tales como aquéllos descritos o a los que se hace referencia en las Farmacopeas Española y Estadounidense y textos de referencia similares.

10

Usos médicos de los compuestos de la invención

En un tercer aspecto, la invención se refiere al uso de los compuestos o las composiciones de la invención en terapia o como medicamento. Concretamente, son objeto de la invención los compuestos o las composiciones de la invención para su uso en terapia o como medicamento. En una realización particular, la invención se refiere al uso de los compuestos o composiciones de la invención para el tratamiento del cáncer, preferentemente de los cánceres de mama, páncreas, pulmón y colorrectal, así como de melanomas como el melanoma metastásico. En una realización preferente, su uso está dirigido a la inhibición de CSCs.

20

Por otra parte, se considera objeto de la invención el empleo de un los compuestos o composiciones de la invención en la elaboración de un medicamento. En una realización particular, los compuestos o composiciones de la invención se emplean en la elaboración de un medicamento para el cáncer, preferentemente de los cánceres de mama, páncreas, pulmón y colorrectal, así como de melanomas como el melanoma metastásico. En una realización preferente, su uso está dirigido a la elaboración de medicamentos para la inhibición de CSCs.

25

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos o composiciones de la invención para su uso como medicamento para el tratamiento de patologías o enfermedades provocadas por procesos neoplásicos. Más concretamente, la invención se refiere a los compuestos para su uso como medicamentos para el tratamiento de cáncer. Más preferiblemente el cáncer de mama, páncreas, pulmón y colorrectal, así como de melanomas como el melanoma metastásico.

35

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de pacientes afectados por cáncer mediante el uso de los compuestos o las composiciones de la invención. Los efectos anticancerosos de un método de tratamiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan, a los efectos antitumorales, la velocidad de respuesta, al tiempo de progresión de la enfermedad y al índice de supervivencia. Los efectos antitumorales de un método de tratamiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan, a la inhibición del crecimiento tumoral, retraso en el crecimiento tumoral, regresión del tumor, contracción del tumor, aumento del tiempo para el crecimiento de nuevo del tumor al cesar el tratamiento, y enlentecimiento de la progresión de la enfermedad. Se espera que cuando un método de tratamiento de la presente invención se administre a un animal, preferiblemente mamífero, y más preferiblemente humano, con necesidad de tratamiento anticanceroso, el método de tratamiento producirá un efecto medido, por ejemplo por una o varias de las siguientes características: la extensión del efecto antitumoral, la velocidad de respuesta, el tiempo de la progresión de la enfermedad y el índice de supervivencia. Los efectos anticancerosos incluyen el tratamiento profiláctico.

Este tratamiento consiste en la administración a los individuos afectados por estas enfermedades de cantidades terapéuticamente efectivas de un compuesto de la invención, o una composición farmacéutica que lo incluya.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a aquella cantidad de un compuesto de la invención que cuando se administra a un mamífero, con preferencia un humano, es suficiente para producir el tratamiento, tal como se define más abajo, de una enfermedad o condición patológica de interés en el mamífero, con preferencia un humano. La cantidad de un compuesto de la invención que constituye una cantidad terapéuticamente efectiva variará, por ejemplo, según la actividad del compuesto específico empleado; la estabilidad metabólica y duración de la acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado general de salud, el sexo y la dieta del paciente; el modo y el tiempo de administración; la velocidad de excreción, la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o la condición patológica particulares; y el sujeto que se somete a terapia, pero puede ser determinada por un especialista en la técnica según su propio conocimiento y esa descripción.

35

La administración de los compuestos de la invención, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, se puede llevar a cabo por medio de los modos de administración de agentes aceptados para servir a similares utilidades.

5

Procedimiento de la invención

En otro aspecto la invención se refiere a un procedimiento (Figura 1) para la preparación de los compuestos de la presente invención. Los compuestos de la invención, de estructura general **IV**, que comprende la formación de un éster a partir de un intermedio de fórmula general **I** (Intermedios **I**).

15

En particular, el procedimiento para obtener compuestos de fórmula general **IVa** consiste en la formación de un éster a partir de un intermedio de fórmula general **I**.

En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVb** se obtienen mediante un procedimiento que consiste en la formación de un éster a partir de un intermedio de fórmula general **I** y una posterior reducción.

20

En una realización aún más particular, esta reducción se consigue mediante la acción del borohidruro de litio en THF.

25

En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVc** o **IVc'** se obtienen mediante un procedimiento que consiste en realizar una reacción de Mitsunobu sobre un compuesto de fórmula general **IVb**.

30

En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVd** se obtienen mediante un procedimiento que consiste en realizar una halogenación sobre un compuesto de fórmula general **IVb**.

35

En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVg** se obtienen mediante un procedimiento que consiste en formar un triazol sustituido sobre un compuesto de fórmula general **IVb**.

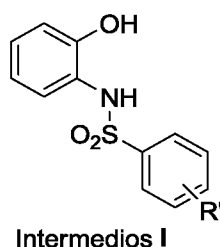
En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVe** se obtienen mediante un procedimiento que consiste en tratar un compuesto de fórmula general

IVb con un equivalente (la misma cantidad de moles) de TsCl calentando a reflujo, preferentemente durante 24 horas.

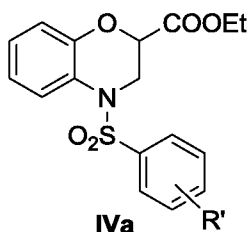
5 En otra realización particular, los compuestos de fórmula general **IVf** se obtienen al tratar un compuesto de fórmula general **IVe** con azida sódica.

En una realización preferente, el procedimiento para obtener los distintos grupos de compuestos de fórmula general **IV**, comprende los siguientes pasos:

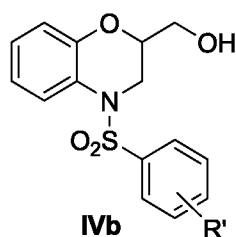
- 10 1. Hacer reaccionar *o*-aminofenol con cloruro de bencensulfonilo con distintos sustituyentes en el anillo aromático (grupos electrón donantes o atrayentes) para producir los intermedios **I**



- 15 2. Hacer reaccionar los intermedios **I** con el 2,3-dibromopropionato de etilo racémico para producir los **IVa**



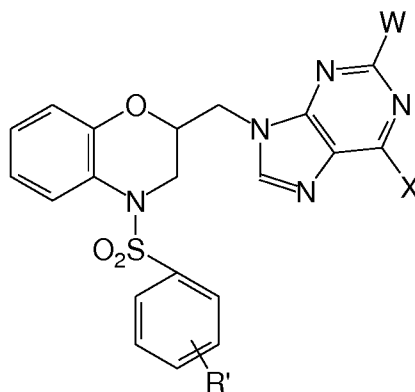
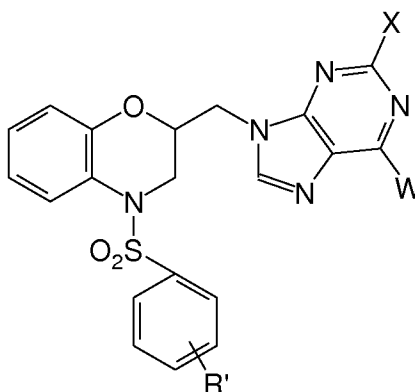
3. Reducir los **IVa** para obtener los intermedios **IVb**



- 20 Las diferentes variaciones para pasar de **IVb** a **IVc**, **IVc'**, **IVd** y **Vg** se describen a continuación:

d1) reacción de Mitsunobu (**IVc** y **IVc'**)

Hacer reaccionar los intermedios **IVb** y una purina mono- o di-sustituida en presencia de azodicarboxilato de dialquilo y de trifenilfosfina en un disolvente orgánico para obtener **IVc** (*N*-9) y/o **IVc'** (*N*-7).

**IVc****IVc'**

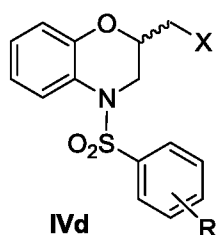
5

10

d2) halogenación (IVd):

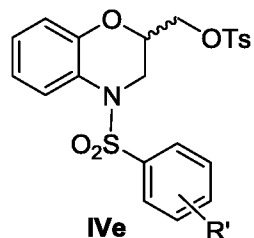
Trata **IVb** en una particularización con cloruro de tionilo para sustituir el alcohol por el cloro. En general se procede a realizar una halogenación.

15

**IVd**

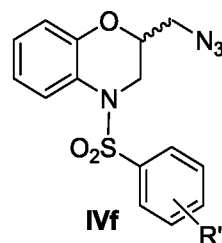
d3) formación de triazoles sustituidos

d3a) Tratar **IVb** con un equivalente (la misma cantidad de moles) de TsCl calentando a reflujo durante 24 horas, para obtener **IVe**.



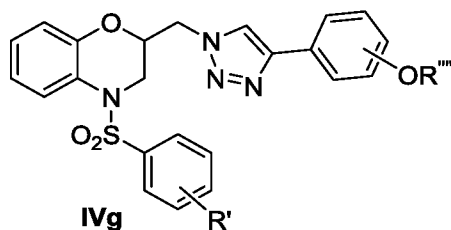
5

d3b) Tratar **IVe** con azida sódica para obtener **IVf**.



10

d3c) Realizar la química click a **IVf**, para obtener los compuestos **IVg**.



A continuación, se describen las etapas del procedimiento de la invención de forma más detallada:

15

Etapa a

La formación de los compuestos intermedios I se lleva a cabo por reacción entre el *o*-aminofenol (Mulzer, J. *J. Org. Chem.*, 2000, 65, 6540-6546) y cloruros de sulfonilo de acuerdo con procedimientos descritos previamente (Díaz-Gavilán, M.; Rodríguez-Serrano, F.; Gómez-Vidal, J.A.; Marchal, J.A.; Aránega, A.; Gallo, M.A.; Espinosa, A.; Campos, J.M. *Tetrahedron*, 2004, 60, 11547-11557).

20

Los intermedios I son fenilsulfonamidas sustituidas en las que R' = H, 4-OH, 3,5-diOH, 4-Me, 4-OMe, 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI, 3,5-diMe.

5 Etapa b

Los compuestos **IVa** se sintetizan a partir de los correspondientes intermedios por reacción de doble intercambio de los átomos de bromo del 2,3-dibromopropionato de etilo racémico, utilizando como base carbonato potásico en acetona y calentando a reflujo. Los compuestos **IVa** son fenilsulfonamidas sustituidas (R' = H, 4-OH, 3,5-diOH, 4-Me, 4-OMe, 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI, 3,5-diMe), en las que el átomo de nitrógeno forma parte de un resto de 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina-2-carboxilato de etilo.

15 Etapa c

Los compuestos **IVa** se reducen, preferentemente con borohidruro de litio, en THF a temperatura ambiente para dar los intermedios compuestos **IVb**. Los compuestos **IVb** son fenilsulfonamidas sustituidas (R' = H, 4-OH, 3,4-diOH, 4-Me, 4-OMe, 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI, 3,5-diMe). en las que el átomo de nitrógeno forma parte de un resto de 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina-2-hidroximetilo.

25 Etapa d1 (Mitsunobu)

Los compuestos **IVb** y una purina mono- o di-sustituida por halógenos en las posiciones 2 y/o 6 que representan cada uno, independientemente entre sí, un átomo seleccionado del grupo formado por Cl, -Br, e -I, se hacen reaccionar en presencia de azodicarboxilato de dialquilo y de trifenilfosfina en un disolvente orgánico para obtener compuestos de las familias **IVc** o **IVc'**.

30 Etapa d2(halogenación)

Los compuestos **IVb** se hacen reaccionar con cloruro de tionilo (para obtener el derivado con cloro **6**) o con tetrabromuro de carbono (para obtener el derivado con bromo) y a partir del derivado cloro, compuesto **6**, por la reacción de Finkelstein, se sustituye el cloro por el yodo para obtener la familia de compuestos **IVd**.

35 Etapa d3 (formación de triazoles sustituidos)

d3a) Protección de los compuestos **IVb** con grupo saliente (**IVe**), d3b) formación de la azida (**IVf**) y d3c) química click para formar el anillo de triazol sustituido. Finalmente obtenemos la familia de compuestos **IVg**.

5 MODOS DE REALIZACIÓN

Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención:

10 Materiales y Métodos

Abreviaturas y Acrónimos (obtenido de la Guía para Autores; Abreviaturas y Acrónimos *J. Org. Chem.* **2008**, *78*, 10A):

Ac: acetilo

Bu: butilo

15 cat.: catalítico

¹³CRMN resonancia magnética nuclear de carbono

d: doblete

dd: doble doblete

ddd: doble doble doblete

20 DMSO: dimetilsulfóxido

DIAD: diisopropilazodicarboxilato

dq: doble cuartete

dt: doblete de tripletes

Et: etilo

25 g: gramo

Hz: hertzio

J: constante de acoplamiento medida en Hertios

HRMS: espectroscopia de masas de alta resolución

Ts: *p*-toluensulfonilo (Tosilo)

30 mM: milimolar

M⁺: pico molecular

Me: metilo

mg: miligramo

mL: mililitro

35 mmol: milimol

m/z: relación masa/carga

Pf: punto de fusión

ppm: partes por millón

s: singlete

t: triplete

t.a.: temperatura ambiente

5 THF: tetrahidrofurano

10 Los reactivos y disolventes utilizados provienen de las casas comerciales Aldrich, Acros, SDS o Scharlau, y fueron purificados por procedimientos habituales (ver Armarego, W. L.; Perrin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals; Butterworth-Heinemann: Oxford, 1996.) cuando fue necesario.

15 La purificación de los productos de reacción se realizó por cromatografía en columna bajo presión (cromatografía flash), utilizando como fase estacionaria gel de sílice (con un tamaño de partícula 230-400 mesh) y como fase móvil los disolventes que se indicarán en cada caso. El eluyente empleado se indica en cada caso y las proporciones de la mezcla de disolventes utilizadas son siempre volumen/volumen.

20 El seguimiento de las reacciones se realizó por cromatografía en placa fina (TLC), empleando cromatofolios de gel de sílice 60 F254 comercializados por Merck. El revelado de las placas se realizó empleando un visor de luz UV ($\lambda = 254$ nm).

25 Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C (completamente desacoplados) se realizaron a temperatura ambiente en el disolvente indicado en cada caso (CDCl_3 , y $\text{DMSO}-d_6$) empleando los siguientes aparatos: Varian INOVA-TM (300, 400, 500, 600 MHz). Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (δ , ppm), utilizando como referencia interna la señal residual del disolvente: CDCl_3 , 7.26 ppm ($^1\text{HRMN}$) y 77.0 ppm ($^{13}\text{CRMN}$); $\text{DMSO}-d_6$, 2.50 ppm ($^1\text{HRMN}$) y 41.1 ppm ($^{13}\text{CRMN}$).

30 Los espectros ^1H -RMN se describen indicando el número de protones y la multiplicidad aparente de cada señal. Las constantes de acoplamiento (J) son las aparentes y se expresan en Hz. Los puntos de fusión (Pf) se midieron en capilares abiertos en un aparato marca Electrothermal. Los datos obtenidos de los espectros de masa están expresados en unidades de masa (m/z). El pico molecular se especifica como M^+ .
35 Las síntesis en pequeña escala asistidas por microondas se han llevado a cabo en instrumento Initiator 2.0 de modo sencillo, produciendo una irradiación controlada a 2.450 GHz (Biotage AB, Uppsala). El tiempo de reacción se refiere a cuando se

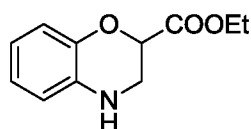
alcanza la temperatura esperada, y no se refiere a todo el tiempo de irradiación. La temperatura se midió por medio de un sensor de IR colocado fuera del medio de reacción. Las condiciones anhidras se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de argón.

5 Ejemplos del procedimiento de síntesis

I) Reactivos de partida conocidos

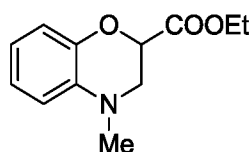
2-(Etoxicarbonil)-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina

10 Obtenido de acuerdo con un procedimiento conocido (Augstein, J.; Monro, A.M.; Hessey, G. W. G.B. Patent 1.057.568, 1967; *Chem. Abstr.* **1967**, 66, 95058z).



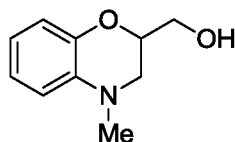
2-(Etoxicarbonil)-4-metil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina

15 Obtenido de acuerdo con un procedimiento conocido (Augstein, J.; Monro, A.M.; Hessey, G. W. G.B. Patent 1.057.568, 1967; *Chem. Abstr.* **1967**, 66, 95058z).



2-(Hidroximetil)-4-metil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina

20 Obtenido de acuerdo con un procedimiento conocido (Zhou, D.; Harrison, B.L.; Shah, U.; Andree, T.H.; Hornby, G.A.; Scerni, R.; Schechter, L.E.; Smith, D.L.; Sullivan, K.M.; Mewshaw, R.E. *Bioorg.&Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 1338-1341).



25 II) Preparación de sustancias de partida

N-[2-(Hidroxifenil)-4-metilbencensulfonamida (Intermedio I)]

30 A una disolución de 2-aminofenol (8 g, 73.3 mmol) en CH₂Cl₂ anhidro (250 mL), se le añade piridina (7.09 mL, 88 mmol) y cloruro de tosilo (15.4 g, 80.6 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 24 horas. Después de enfriar la mezcla de

reacción se lava con H₂O (250mL). Tras secado de la fase orgánica (Na₂SO₄ anhidro) y filtración, se concentra al rotavapor y se precipita el intermedio I con hexano. Sólido blanco (19.1 g, 99 %). Pf = 120-121 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.46 (m, 2H), 7.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.47 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.31 (dd, *J* = 7.9, 1.4 Hz, 1H), 7.09 (t, *J* = 8.67, 7.98 Hz, 1H), 6.88 (m, 2H), 3.52 (s, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 150.06, 142.72, 137.74, 129.27, 126.73, 126.01, 124.27, 124.19, 118.90, 115.51, 20.92. HRMS TOF MSES⁺(*m/z*): Calculado para C₁₃H₁₃NNaO₃S (M + Na)⁺: 286.0514, encontrado: 286.0515. Análisis Elemental: C₁₃H₁₃NO₃S Teórico (%): C 59.30; H 4.98, N 5.32; S 12.18; Obtenido (%): C 59.40, H 4.88, N 5.00; S 12.32.

10

Ejemplos de síntesis de compuestos de la invención

Los siguientes ejemplos se presentan a modo de ilustración de la presente invención:

4-Tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina-2-carboxilato de etilo (compuesto 4)

15

A una mezcla del intermedio I con cloruro de tosilo (6 g, 22.79 mmol) y K₂CO₃ (7.66 g, 55.47 mmol) se le añade acetona (70 mL) en primer lugar y posteriormente 2,3-dibromopropionato de etilo (5.92 g, 22.79 mmol). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 8 horas. Tras enfriamiento de la mezcla se filtra, se concentra a rotavapor el disolvente quedando un crudo que se suspende en H₂O, se filtra y se obtiene el compuesto **4** en forma de sólido blanco (8.2 g, 99%). Pf = 147-148 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.83–7.78 (m, 1H), 7.55 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.12–7.06 (m, 1H), 6.99-6.93 (m, 2H), 4.51-4.46 (m, 1H), 4.25 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.95 (dd, *J* = 9.5, 2.8 Hz, 1H), 3.53-3.46 (m, 1H), 2.39 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 167.50, 145.88, 144.73, 135.45, 130.18, 127.38, 126.57, 124.45, 123.50, 121.69, 117.87, 70.37, 62.16, 45.82, 21.70, 14.25. HRMS TOF MSES⁺(*m/z*): Calculado para C₁₈H₁₉NNaO₅S (M + Na)⁺: 384.0882, encontrado: 384.0883. Análisis Elemental: C₁₈H₁₉NO₅S Teórico (%): C 59.82; H 5.30, N 3.88; S 8.87; Obtenido (%): C 59.85, H 5.28, N 3.96; S 8.68.

20

25

30

2-Hidroximetil-2-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina (compuesto 5)

A una disolución del compuesto **4** (8.23 g, 22.77mmol) en THF (90 mL), se le añade LiBH₄ (0.60 g, 27.33mmol) a temperatura ambiente y gota a gota. La reacción es instantánea. Se elimina al rotavapor el disolvente, se añade H₂O obteniéndose el compuesto **5** en forma de precipitado blanco que se filtra y se seca. Pf.: 133-134°C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.84-7.79 (m, 1H), 7.53 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.07 (dd, *J* = 11.3, 4.1 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 6.84 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 14.4, 2.3 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 12.0, 4.1 Hz, 1H), 3.66 (dd, *J* = 12.0,

35

4.6 Hz, 1H), 3.53 (m, 1H), 3.38 (dd, $J = 14.3, 10.0$ Hz, 1H), 2.39 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 146.87, 144.47, 135.84, 130.11, 127.33, 126.38, 124.59, 123.76, 121.26, 117.53, 72.11, 62.80, 45.54, 29.86, 21.74, 1.17. HRMS (m/z): Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NNO}_4\text{S}$ TOF MSES $^+(\text{M} + \text{Na})^+$: 342.0776, encontrado: 342.0773. Análisis Elemental: $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{NO}_4\text{S}$ Teórico (%): C 60.17; H 5.37, N 4.39; S 10.04; Obtenido (%): C 59.99, H 5.29, N 4.46; S 9.91.

2-(Clorometil)-4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina (compuesto 6)

A una disolución de 2-(hidroximetil)-4-metil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina, compuesto 5 (0.26 g, 0.081 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (2.4 mL), se le añade cloruro de tionilo (0.071 mL, 0.9769 mmol). Se deja agitar media hora a temperatura ambiente. Posteriormente se añade piridina anhidra (0.072 mL, 0.9769 mmol). La mezcla de reacción se irradia en microondas a 100 °C durante 90 min. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente solo diclorometano. Sólido blanco (0.27 g, 99 %); pf = 120-121 °C. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.85 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.55–7.51 (m, 2H), 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.08 (ddd, $J = 8.3, 7.4, 1.6$ Hz, 1H), 6.96 (ddd, $J = 8.6, 7.4, 1.5$ Hz, 1H), 6.83 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1H), 4.45 (dd, $J = 14.4, 2.4$ Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 11.2, 4.1$ Hz, 1H), 3.57–3.50 (m, 1H), 3.46 (dd, $J = 11.2, 6.7$ Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 14.4, 9.6$ Hz, 1H), 2.40 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 146.56, 144.61, 135.47, 130.16, 127.42, 126.51, 124.74, 123.61, 121.47, 117.51, 70.91, 46.47, 42.97, 29.85, 21.75. HRMS (m/z): Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNNO}_3\text{S}$ TOF MSES $^+(\text{M} + \text{Na})^+$: 360.0437, encontrado: 360.0438. Análisis Elemental: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_3\text{S}$ Teórico (%): C 56.89; H 4.77, N 4.15; S 9.49; Obtenido (%): C 56.77, H 4.53, N 4.21; S 9.54.

4-Metilbencensulfonato de 4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il)metilo (compuesto 7)

A una disolución del compuesto 5 (2 g, 6.26 mmol) en CH_2Cl_2 anhidro (20 mL) se le añade sucesivamente piridina anhidra (0.6 g, 7.51 mmol) y cloruro de tosilo (1.2 g, 6.26 mmol). Tras calentar la disolución a reflujo durante 24 horas se elimina el disolvente al rotavapor tras enfriamiento, el crudo se suspende en H_2O , se filtra y se purifica mediante cromatografía flash en gradiente (EtOAc/hexano: 2/8, 3/7, 4/6 y 1/1). Tras eliminación de los disolventes, obtenemos el compuesto 7 (2.71 g, 56.8%), como un sólido blanco; pf: 84-85 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.63 (d, $J = 8.2$ Hz, 3H), 7.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.22 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.08 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.90 (dt, $J = 8.3, 4.6$ Hz, 1H), 6.78 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H), 6.56 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1H), 4.14 (dd, $J = 14.4, 2.3$ Hz, 1H), 3.94 (dq, $J = 11.0, 4.5$ Hz, 2H), 3.43 (m, 1H), 3.07 (dd, $J = 14.4, 10.1$ Hz,

1H), 2.32 (s, 3H), 2.23 (s, 3H). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 146.05, 145.25, 144.47, 135.10, 132.16, 129.97, 129.91, 127.85, 127.04, 126.22, 124.34, 123.15, 121.13, 117.32, 68.92, 68.25, 44.98, 30.74. HRMS (m/z): Calculado para C₂₃H₂₄NO₆S₂ TOF MS ES⁺(M + H)⁺: 474.1040, encontrado: 474.1040 Análisis Elemental: C₂₃H₂₃NO₆S₂ Teórico (%): C 58.33; H 4.90, N 2.96; S 13.54; Obtenido (%): C 58.19, H 4.80, N 3.08; S 13.87.

2-(Azidometil)-4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il)metilo (compuesto 14)

A una disolución del compuesto **7** (3 g. 6.3mmol) en DMF (29 mL) se le añade azida
 10 sódica (0.6 g, 9.5mmol). Tras calentar la reacción a reflujo a 150°C durante 5 horas se
 deja enfriar y se elimina el disolvente al rotavapor. El crudo precipita con metanol, se
 filtra con bushner y kitasato y se obtiene el compuesto **14** (1.57 g, 72%), como un
 sólido amarillento; pf: 136-140°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) ¹H NMR (400 MHz,
 15 dmso) δ 7.57 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.10 (m, 2H), 6.97 (m, 1H),
 6.84 (dd, J = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 4.33 (dd, J = 14.4, 2.5 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 12.7, 3.3
 Hz, 1H), 3.55 (ddd, J = 9.2, 5.7, 2.7 Hz, 1H), 3.49 (dd, J = 12.7, 5.6 Hz, 1H), 3.33 (dd, J
 = 12.7, 5.6 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 146.03, 144.57,
 137.63, 134.69, 130.17, 127.02, 125.49, 123.68, 121.00, 117.28, 70.87, 50.88, 45.10,
 20.99. HRMS (m/z): Calculado para C₁₆H₁₆N₄O₃NaSTOF MS ES⁺ (M + Na)⁺: 367.0876,
 20 encontrado: 367.0841. Análisis Elemental: C₁₆H₁₆N₄O₃STeórico (%): C 55.80, H 4.68,
 N 16.27, S 9.31. Obtenido (%): C 55.90, H 4.71, N 15.99, S 9.27.

3-(1-((4-Tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazin-2-il)metilo)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenol (compuesto 15)

A una disolución del compuesto **14** (0.2 g. 0.58mmol) en DMF (5 mL) se le añade 3-4-
 25 hidroxifenilacetileno al 95% (0.1 g, 0.75mmol), bromuro de cobre (0.13 g, 0.58mmol) y
 propilamina (0.03 mL, 0.35mmol). Se irradia la reacción a 140°C, durante 30 minutos.
 Se elimina la DMF y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando
 como eluyente una mezcla de disolventes en gradiente (EtOAc/hexano: 2/8, 3/7, 4/6 y
 30 1/1). Se obtiene el compuesto **15** (1.57 g, 72%), como un sólido amarillento; pf: 153-
 160°C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 9.56 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 8.3, 1.5
 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.29 (m, 5H), 7.09 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 6.87 (dd, J
 = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 6.75 (dt, J = 6.4, 2.5 Hz, 1H), 4.78 (dd, J = 14.4, 4.4 Hz, 1H), 4.65
 (dd, J = 14.5, 6.2 Hz, 1H), 4.46 (dd, J = 14.5, 2.4 Hz, 1H), 3.74 (dd, J = 6.3, 3.4 Hz,
 35 1H), 3.32 (dd, J = 8.3, 1.5 Hz, 4H), 2.33 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ
 157.77, 146.50, 145.77, 144.60, 134.45, 131.69, 130.17, 129.97, 126.96, 126.21,
 123.58, 123.18, 122.31, 121.17, 117.46, 116.07, 115.01, 111.89, 70.42, 50.41, 45.35,

20.98. HRMS (m/z): Calculado para C₂₄H₂₃N₄O₄STOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 463.1440, encontrado: 463.1453. Análisis Elemental: C₂₄H₂₂N₄O₄S Teórico (%): C 62.32, H 4.79, N 12.11, S 6.93. Obtenido (%): C 62.38, H 4.70, N 12.30, S 6.78.

5

Metodología general de síntesis de los compuestos 8-13

Bajo atmósfera de argón se prepara una mezcla de PPh₃ (2.2 equiv.), compuesto 5(1 equiv.) y la purina correspondiente (1 equiv.) en THF anhidro (5 mL) que se enfría a -20 °C en un baño de acetona y CO₂ antes de adicionar el DIAD (2.2 equiv.) gota a gota. Se eleva la temperatura de la mezcla de reacción lentamente hasta 5 °C por adición de acetona al baño y se irradia en microondas a 140 °C durante 10min. El disolvente se evapora a vacío y el crudo de reacción se purifica por cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla de disolventes EtOAc:hexano (1:1)(Tabla 1).

15

2-[(6-Cloro-9*H*-purin-9-il)metil]-4-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina (compuesto 8)

Sólido amarillento (60%). Pf: 143-144 °C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (td, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.71 (dd, *J* = 12.0, 4.6 Hz, 2H), 4.62 (dd, *J* = 14.6, 3.6 Hz, 1H), 4.53 (dd, *J* = 14.6, 7.6 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 11.7, 2.7 Hz, 1H), 3.01 (dd, *J* = 11.6, 6.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) 151.96, 151.18, 146.15, 142.29, 135.50, 131.46, 122.22, 119.03, 116.28, 112.73, 77.19, 76.98, 76.77, 71.19, 50.40, 45.75, 38.62. HRMS (m/z): Calculado para C₁₅H₁₅ClN₅O TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 316.0965, encontrado: 316.0963. Análisis Elemental: C₁₅H₁₄ClN₅O Teórico (%): C 57.06, H 4.47, N 22.18. Obtenido (%): C 57.23, H 4.71, N 22.00.

25

2-[(6-Bromo-9*H*-purin-9-il)metil]-4-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina (compuesto 9)

Sólido amarillento (70%). Pf: 137-138 °C. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 8.73 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 6.92 (td, *J* = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 8.4, 1.4 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 11.6, 4.5 Hz, 2H), 4.70 (ddd, *J* = 9.7, 6.2, 3.2 Hz, 1H), 4.63 (dd, *J* = 14.6, 3.6 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 14.6, 7.6 Hz, 1H), 3.40 (dd, *J* = 11.7, 2.7 Hz, 1H), 3.03 (dd, *J* = 11.7, 6.0 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H). ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 151.93, 150.72, 146.04, 143.28, 142.32, 134.50, 134.09, 122.25, 119.11, 116.32, 112.80, 71.17, 50.42, 45.77, 38.68. HRMS (m/z): Calculado para C₁₅H₁₅BrN₅O TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 360.0454, encontrado: 360.0456. Análisis Elemental: C₁₅H₁₄BrN₅O Teórico (%): C 50.02, H 3.92, N 19.44. Obtenido (%): C 49.89, H 3.80, N 19.29.

35

**2-[(2,6-Dicloro-9*H*-purin-9-il)metil]-4-metil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina
(compuesto 10)**

Sólido amarillento (85%). Pf: 123-124 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.14 (s, 1H),
5 6.83 (m, 1H), 6.71 (dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz, 1H), 6.64 (m, 2H), 4.61 (ddd, *J* = 8.6, 5.9, 2.9
Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 14.5, 3.3 Hz, 1H), 4.43 (dd, *J* = 14.5, 8.0 Hz, 1H), 3.35 (dd, *J* =
11.7, 2.8 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 11.7, 5.8 Hz, 1H), 2.84 (s, 2H). ¹³C NMR (100 MHz,
CDCl₃) δ 153.26, 152.83, 151.63, 146.95, 142.05, 135.45, 130.54, 122.22, 118.91,
116.17, 112.69, 71.01, 50.23, 45.88, 38.57. HRMS (m/z): Calculado para C₁₅H₁₄Cl₂N₅O
10 TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 350.0570, encontrado: 350.0573. Análisis Elemental:
C₁₅H₁₃Cl₂N₅O Teórico (%): C 51.44, H 3.74, N 20.00. Obtenido (%): C 51.58, H 3.81, N
20.30.

**2-[(6-Cloro-9*H*-purin-9-il)metil]-4-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina (compuesto
11)**

Sólido blanco (45%). Pf: 189-190°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.77 (s, 1H), 8.14 (s,
1H), 7.75 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.07 (t,
J = 7.7 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.52 (dd, *J* = 14.7, 3.6
Hz, 1H), 4.37 (m, 2H), 3.84 (m, 1H), 3.15 (dd, *J* = 14.3, 9.6 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C
20 NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 152.28, 151.97, 151.53, 145.88, 145.72, 144.74, 135.51,
131.56, 130.23, 127.28, 126.65, 124.49, 123.54, 121.97, 117.56, 69.77, 45.96, 45.52,
21.71. HRMS (m/z): Calculado para C₂₁H₁₉ClN₅O₃S TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 456.0892,
encontrado: 456.0890. Análisis Elemental: C₂₁H₁₈ClN₅O₃S Teórico (%): C 55.32, H
3.98, N 15.36, S 7.03. Obtenido (%): C 55.49, H 4.08, N 15.51, S 6.89.

25

**2-[(6-Bromo-9*H*-purin-9-il)metil]-4-tosil-3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazina
(compuesto 12)**

Sólido blanco (39%). Pf: 168-169°C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.72 (s, 1H), 8.15 (s,
1H), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.19 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.07 (t,
30 *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.95 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 14.7, 3.5
Hz, 1H), 4.36 (m, 2H), 3.83 (m, 1H), 3.15 (dd, *J* = 14.4, 9.6 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C
NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 152.20, 150.72, 145.75, 145.71, 144.74, 143.60, 135.50,
134.16, 130.23, 127.27, 126.65, 124.49, 123.53, 121.97, 117.55, 69.75, 45.95, 45.53,
21.71. HRMS (m/z): Calculado para C₁₅H₁₅BrN₅O TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 500.0386,
35 encontrado: 500.0387. Análisis Elemental: C₂₁H₁₈BrN₅O₃S Teórico (%): C 50.41, H
3.63, N 14.00, S 6.41. Obtenido (%): C 50.40, H 3.44, N 13.89, S 6.29.

2-[(2,6-Dicloro-9H-purin-9-il)metil]-4-tosil-3,4-dihidro-2H-1,4-benzoxazina (13)

Sólido blanco (62.8%). Pf: 196-197 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.12 (s, 1H), 7.77 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.09 – 7.04 (m, 1H), 6.99-6.93 (m, 1H), 6.78 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 14.7, 3.3 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 14.4, 2.5 Hz, 1H), 4.29 (dd, *J* = 14.7, 7.4 Hz, 1H), 3.78 (ddt, *J* = 9.9, 7.3, 2.9 Hz, 1H), 3.20 (dd, *J* = 14.4, 9.5 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 153.31, 153.18, 152.22, 146.60, 145.49, 144.87, 135.29, 130.70, 130.29, 127.23, 126.69, 124.51, 123.46, 122.04, 117.52, 69.41, 45.83, 45.70, 21.70. HRMS (m/z): Calculado para C₂₁H₁₈Cl₂N₅O₃S TOF MS ES⁺ (M + H)⁺: 490.0502, encontrado: 490.0500. Análisis Elemental: C₂₁H₁₇Cl₂N₅O₃S Teórico (%): C 51.44, H 3.49, N 14.28, S 6.54. Obtenido (%): C 51.56, H 3.49, N 14.65, S 6.20.

Conservación de los fármacos

Los compuestos se disuelven en DMSO y se conservan a –20 °C. La solución stock de diluye en el medio correspondiente para obtener las concentraciones que se requieren en cada experimento, siendo la concentración final siempre menor al 0.1 % v/v de DMSO. Como controles se han utilizado cultivos paralelos de las líneas celulares MCF-7, MDA-MB 468, SKBR-3, HCT-116, HT-29, RKO, A-375, NCI-H460, A-549 y BxPC-3 en el medio.

20

Ejemplos de ensayos con los compuestos de la invención**Líneas celulares utilizadas**

Se han utilizado cultivos de las siguientes líneas celulares MCF-7, MDA-MB 468, SKBR-3, HCT-116, HT-29, RKO, A-375, NCI-H460, A-549 y BxPC-3.

25

Ensayos de citotoxicidad

Las células se siembran en placas de 24 pocillos (1.000 células/pocillo) en su respectivo medio. Después de permitir la adhesión celular durante la noche, se tratan durante 3 o 6 días con concentraciones crecientes de los compuestos 4-15. El medio se cambia a los 3 días, en el caso de experimentos a 6 días, adicionándole las respectivas concentraciones de los compuestos. Se utilizan como controles cultivos paralelos de las líneas celulares sin adicción de fármacos y con DMSO. Tras los 3 o 6 días de tratamiento, se lleva a cabo la tinción con sulforrodamina B (SRB) para determinar la tasa de supervivencia. En primer lugar, se fijan las células con ácidotricloroacético al 10% durante 20 min a 4 °C, y tras lavar las placas 3 veces con agua bidestilada, se dejan secar a temperatura ambiente. A continuación se agrega

35

0.4% de SRB en 1% de ácido acético y tras incubar 20 minutos a temperatura ambiente, se elimina la SRB y se lava tres veces con ácido acético al 1 %. Finalmente, se solubiliza la SRB con una solución 10 mM Tris-base (pH 10.5) mediante agitación suave durante diez minutos. Posteriormente se transfieren 100 μ L a placas de 96 pocillos por triplicado y se analizan en un colorímetro Multiscan Titertek a 492 nm.

De esta manera se obtuvieron los datos que se utilizaron para realizar las gráficas de Densidad Óptica (D.O.) (eje y de la gráfica) y concentración (eje x) del fármaco. Mediante regresión mínimo cuadrática se calculó la ecuación de la curva y de aquí, la concentración del fármaco correspondiente a una D.O. (eje y)=50.

10 Tratamiento de las líneas celulares con los fármacos

La Tabla 2 resume los resultados obtenidos en los ensayos realizados para experimentos con 6 días de incubación con cada compuesto.

Comp.	A-375	HCT-116	MCF-7
4	10.9 \pm 0.012	13.6 \pm 0.008	>20
5	1.34 \pm 0.012	7.65 \pm 0.005	>20
6	0.83 \pm 0.003	0.47 \pm 0.006	1.32 \pm 0.018
7	4.04 \pm 0.003	6.88 \pm 0.004	>20
8	4.97 \pm 0.004	6.88 \pm 0.004	>20
9	2.96 \pm 0.003	4.18 \pm 0.004	>20
10	0.95 \pm 0.010	1.05 \pm 0.008	3.68 \pm 0.016
11	0.63 \pm 0.013	1.21 \pm 0.024	4.78 \pm 0.013
12	0.73 \pm 0.037	1.30 \pm 0.040	2.61 \pm 0.024
13	0.41 \pm 0.022	0.37 \pm 0.006	1.15 \pm 0.017

15 **Tabla 2.** Concentraciones inhibitorias cincuenta (CI_{50} μ M) de las 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas sustituidas en posición 2 (**4-13**) frente a las líneas celulares A-375, HCT-116 y MCF-7 (numeración de los compuestos de acuerdo a lo expuesto en la tabla 1).

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos en los ensayos realizados para experimentos con 3 días de incubación con cada compuesto:

20

Comp.	HT-29	HCT-116	RKO	NCI-H460	BxPC-3
6	2.54 \pm 0.6	3.70 \pm 0.9	3.62 \pm 1.2	2.96 \pm 1.4	1.79 \pm 0.89
11	6.13 \pm 1.3	6.78 \pm 1.8	6.67 \pm 2.6	7.21 \pm 1.5	2.15 \pm 0.95
12	5.38 \pm 1.1	5.8 \pm 1.5	43.18 \pm 8.3	8.53 \pm 1.6	2.92 \pm 1.07

13	5.52 +/- 0.9	4.01 +/-3	4.91 +/- 1.2	5.95 +/- 1.7	8.88 ± 1.64
15	5.52 +/- 1.2	9.64 +/-1.3	3.6 +/- 1.1	6.33 +/- 2.6	30.86 ± 5.33

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias cincuenta (CI_{50} μ M) de las 3,4-dihidro-2*H*-1,4-benzoxazinas sustituidas en posición 2 (**6**, **11-13** y **15**) frente a las líneas celulares NCI-H460, RKO, HCT-116, HT-29 y BxPC-3, tratadas durante 3 días (numeración de los compuestos de acuerdo a lo expuesto en la tabla 1).

Las concentraciones inhibitorias cincuenta, (CI_{50} μ M) mostradas en la tabla 3, a 3 días fueron mayores que a los 6 días como corresponde pero equivalentes a las de fármacos utilizados actualmente en la clínica.

Además, la acción de **13** ha sido estudiada en las líneas celulares SKBR-3 y MDA-MB 468, las cuales sobre-expresan los receptores de superficie HER-2 y EGFR respectivamente, obteniendo unos valores de IC_{50} de 1.17 +/-0.005 μ M y 1.43 +/-0.006 μ M.

15 **Ensayo de inhibición de kinasas**

La capacidad inhibitoria de **13** sobre kinasas implicadas en vías de señalización relacionadas con el cáncer, se demostró *in vitro* mediante la técnica de western blot. Para ello se utilizó la línea celular MDA-MB 468 de cáncer de mama, que sobre-expresa el receptor de superficie EGFR. La sobre-expresión de este receptor en cáncer de mama está relacionado con un aumento del tamaño del tumor, una mayor expresión de características de células troncales (*stem*) y un mal pronóstico (Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, et al., ClinCancer Res 13: 4429-4434, 2007). Además, **13** es capaz de inhibir rutas de señalización implicadas en la proliferación celular, que se encuentran alteradas en las células tumorales (Yu S.; Cai X.; Wu C.; Wu L.; Wang Y.; Liu Y.; Yu Z.; Qin S.; Ma F.; Thiery JP.; Chen L. Oncotarget. 2014. Tal es el caso de la quinasa ERK1/2, que juega un papel fundamental en la invasión, migración y angiogénesis de diferentes tipos de células tumorales, tanto *in vivo* como *in vitro* (Wang, X.G.; Meng, Q.; Qi, F.M. and Yang, Q.F. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2014, 18: 3844-3853.

Actualmente se están estudiando inhibidores de esta quinasa para ser utilizados como opción terapéutica en el tratamiento de pacientes que presentan tumores con

mutaciones para *BRAF*, *KRAS*, o *NRAS*, incluyendo pacientes que presentaban recaídas y que estaban utilizando terapias inhibitorias frente a BRAF o MEK (Morris, EJ. et al., Cancer Discov. 2013, 3:742-750.)

5 Para llevar a cabo nuestro estudio se indujo la sobreexpresión de pEGFR mediante la adición al medio de cultivo de EGF durante dos horas. Tras dicho tiempo se añadió **13** (5 μ M) y se determinó su capacidad de inhibición de las quinasas pEGFR y pERK1/2 a diferentes tiempos. La extracción de proteínas se realizó del cultivo de las células adherentes y CSCs ALDH+ en placas de 6 pocillos (normales y de baja adherencia), tras los tratamientos con el compuesto. Posteriormente, el medio de cultivo fue retirado
10 y se procedió a lavar las células con PBS. A continuación, se añadieron 100 μ L de la solución de extracción de proteínas y se despegaron las células de la superficie de la placa mediante la utilización de un cepillo celular ("scraper"). En el caso de las CSCs, el medio fue centrifugado y tras ser lavado con PBS, se le añadió la solución de lisis, la cual fue recogida y guardada en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL, para
15 posteriormente ser hervida a 100 °C durante 10 min en un thermoblock ThermoStat plus (Eppendorf Corp., Hamburg, Germany). Las muestras finalmente fueron almacenadas a -20 °C. Tras esto, se procedió a la separación de las proteínas en base a su carga y tamaño mediante geles de acrilamida (10%). El siguiente paso fue la transferencia de las proteínas separadas electroforéticamente a una membrana de
20 nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU) mediante un Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EEUU), Una vez transferida la membrana de nitrocelulosa se procedió al bloqueo para evitar uniones inespecíficas con las proteínas y a su posterior marcaje con los anticuerpos primarios (p-EGFR y p-ERK; CellSignaling). Tras un periodo de incubación, las
25 proteínas se marcaron con el correspondiente anticuerpo secundario (Sigma Aldrich). Finalmente se procedió al revelado de la membrana usando el kit ECL (Bonus, Amersham, Little Chalfont, UK), en un sistema de imagen LAS-4000, utilizando el software Image Reader LAS-4000.

30 La Figura 4 muestra que **13** inhibió de forma significativa ambas quinasas a partir de las 12 horas de tratamiento.

De igual modo, se realizó un estudio acerca de la capacidad de **13** para modular rutas de señalización relacionadas con las propiedades de células troncales (*stem*) de las
35 CSCs. Los resultados indican que **13** fue capaz de inhibir la formación de esferas tanto en número como en tamaño de las mismas en las CSCs ALDH+, así como de inhibir la expresión de Sox-2 a muy bajas concentraciones (1.43 y 2.86 μ M) tras sólo 24 horas

de tratamiento. Sox-2 ha sido asociado al mantenimiento de la pluripotencia y está considerado como un marcador de células troncales (stemcells) (Lü, X.;Deng, Q.; Li H.;Suo Z. ExpTherMed. 2011 Sep; 2(5):821-826). De hecho se ha demostrado que juega un papel primordial en el desarrollo de la resistencia al tamoxifeno en las células de cáncer de mama receptor de estrógenos (ER)-positivas. La sobreexpresión de Sox2 aumenta la proporción de células madre mediante la activación de la vía de señalización Wnt, haciendo de ese modo las células resistentes a la quimioterapia. Estos hallazgos, junto con la observación de que los niveles de Sox2 están elevados en los tumores primarios de pacientes que no responden a la terapia endocrina, sugieren que la señalización de Wnt puede ser una diana terapéutica atractiva en estos pacientes. La implicación de estos hallazgos es que pequeñas moléculas inhibitoras de la señalización de Wnt podrían ser un nuevo tratamiento para prevenir la recurrencia en grupos definidos de pacientes con cáncer de mama(Piva M.; Domenici G.; Iriondo O.; Rábano M.; Simões BM.; Comaills V.; Barredo I.; López-Ruiz JA.; Zabalza I.; Kypka R.; Vivanco Md. EMBO Mol Med.2014, 6, 66-79. Además, se ha descrito que la inhibición de Sox2 incrementa los niveles de apoptosis de las CSCs. De hecho, recientemente se ha demostrado que Sox2 contribuye a la proliferación y a las características stem del cáncer de páncreas a través de la regulación de genes que controlan la transición de la fase G1 a la S del ciclo celular y el fenotipo de la transición epitelio mesenquima (EMT) (Herreros-Villanueva M.; Zhang JS.;Koenig A.; Abel EV.; Smyrk TC.; Bamlet WR.; de Narvajás AA.; Gomez TS.; Simeone DM.; Bujanda L.; Billadeau DD. Oncogenesis. 2013, 2; e61). Todo ello indica que la inhibición selectiva de Sox2 en CSCs mediante **13** es un prometedora estrategia terapéutica.

25 **Ensayos de toxicidad *in vivo***

Los estudios de toxicidad aguda *in vivo* se llevaron a cabo con **13**. La toxicidad del compuesto se evaluó utilizando ratones BALBc (n= 40) hembra de 6 semanas de edad y un peso de unos 20 mg a los que se les administra por vía oral mediante una sonda bucoesofágica una dosis diaria de hasta 250 mg/kg/día (50/75/100/150/250) de los compuestos durante 1 semana seguida de 1 semana de descanso. El compuesto se disolvió en metilcelulosa al 1%. Los ratones se inocularon con el mismo volumen de metilcelulosa al 1% (grupo de control) y DMSO sólo (grupo de DMSO). Los ratones se mantuvieron bajo condiciones estándares y se pesaron. Se evaluó la toxicidad sistémica: apatía, excitación, pérdida de peso; y local: alopecia, reacciones cutáneas y motilidad de una pata cada 24 horas. Durante el periodo de estudio no se observaron cambios en la conducta, signos clínicos de toxicidad, ni muertes en el 100% de los

animales tratados. El análisis macroscópico de los órganos estudiados no mostró ningún dato de interés, siendo su aspecto normal.

Ensayos de actividad antitumoral en xenoinjertos

5 Para evaluar el efecto de **13** sobre el crecimiento tumoral, se establecieron xenoinjertos de tumor heterotópico utilizando la línea celular de melanoma metastásico A375. Para ello, se indujo la formación del tumor mediante la inyección subcutánea de 5×10^5 células/ratón en ratones hembra NOD scid gamma (NOD, Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl/SzJ}, NSG) de ocho semanas de edad. Se alojaron y se mantuvieron de 20 °C
 10 a 24° C, 50% de humedad, un ciclo de luz-oscuridad de 14 a 10 h con comida y agua ad libitum. Los tumores se dejaron crecer hasta un volumen medio de 100 mm³, tras lo cual fueron asignados aleatoriamente como grupos control (metilcelulosa al 1%) y de tratamiento con **13** (50 mg/kg, disuelto en metilcelulosa al 1%) o **13**(100 mg/kg, disuelto en metilcelulosa al 1%) inyectados ip tres veces por semana durante 40 días.

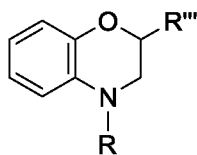
15 El peso del tumor se calculó de acuerdo con la fórmula: TW (mg) = volumen del tumor (mm³) = $d^2 \times D/2$, donde d y D son los diámetros más cortos y más largos, respectivamente. El tratamiento con **13** inhibió significativamente el crecimiento del melanoma en comparación con el grupo control a partir del día 20 para ambas concentraciones, y dichas diferencias significativas se mantuvieron para la
 20 concentración de 100 mg/kg hasta el día 40 (Figura 6). Estos resultados indican la potente actividad antitumoral de **13** incluso en estirpes tumorales altamente tumorigénicas e invasivas y con altos niveles de CSCs y en tumores con pocas alternativas terapéuticas.

25 Tasa de supervivencia

Para llevar a cabo los estudios de supervivencia, los ratones se monitorizaron estrechamente, al menos tres veces por semana, durante todo el período experimental. Como se muestra en la Figura 7 el tratamiento con **13** a ambas concentraciones (50mg/kg y 100mg/kg) mostró mejor supervivencia en relación con el
 30 grupo control. Dicha supervivencia fue mejor en el grupo de animales tratados con 100mg/kg.

REIVINDICACIONES

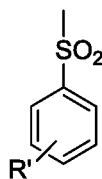
1. Un compuesto de fórmula general IV:



IV

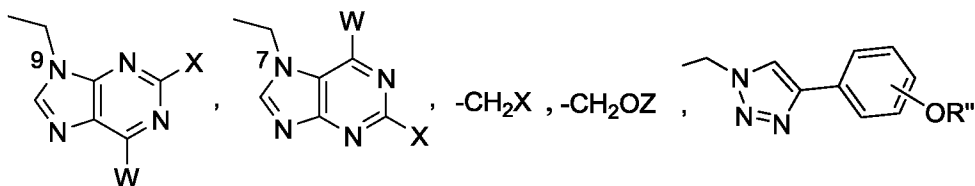
5 así como compuestos racémicos, estereoisómeros, sales o solvatos del mismo; donde

- R es un alquilo de 1 a 12 átomos de carbono, un alquenilo de 2 a 12 átomos de carbono, un alquinilo de 1 a 12 átomos de carbono, un arilalquilo donde el grupo arilo se selecciona de la lista que consiste en bencilo y fenetilo y el grupo alquilo presenta de 1 a 12 átomos de carbono, un heterocicloalquilo de 3 a 15 miembros que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo consiste en N, O₂ y S, -C(=O)R", -C(=O)OR", o bien el resto de bencensulfonilo indicado a continuación:



- o donde R' es H, OH, 3,5-diOH, 2-NO₂, 3-NO₂, 4-NO₂, 2-NH₂, 3-NH₂, 4-NH₂, 4-Me, 4-OMe (Ts), 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI o 3,5-diMe en un resto de bencensulfonilo;

- R''' se selecciona del grupo que consiste en:

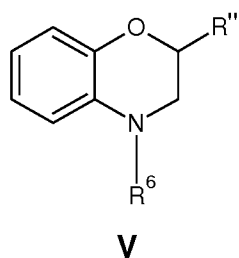


- o X y W representan cada uno, independientemente entre sí, un átomo electronegativo seleccionado del grupo formado por -Cl, -Br, e -I;
- o Z es un grupo de átomos que se encuentra integrado dentro de diversas funciones orgánicas tales como éteres de sililo de fórmula -Si(R⁴)₃, éteres de alquilo y arilalquilo, éteres de alcoximetilo y

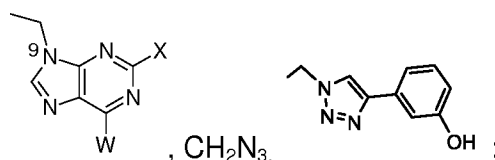
ariloxilo de fórmula $-\text{CH}_2\text{OR}^4$; ésteres de fórmula $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^4$; carbonatos de fórmula $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}^4$ y sulfonatos de fórmula $-\text{SO}_2\text{R}^4$.

- R''' puede ser H, grupos acilo de fórmula $-\text{C}(=\text{O})\text{R}^4$, de tal manera que el grupo $-\text{OC}(=\text{O})\text{R}^4$ puede ser un éster acetato, éster benzoato, éster pivalato (dimetilacetato), éster metoxiacetato, éster cloroacetato, éster levulinato (4-oxopentanoato),
- R^4 representa un grupo seleccionado del grupo constituido por alquilo sustituido o no sustituido, alquinilo sustituido o no sustituido, arilo sustituido o no sustituido, arilalquilo sustituido o no sustituido, y heterociclo.

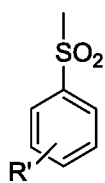
2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho compuesto comprende la fórmula estructural **V**:



Donde R''' se selecciona del grupo formado por:

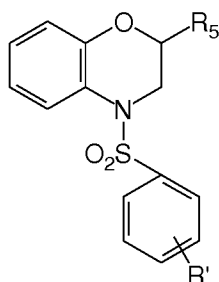


y donde R^6 se selecciona del grupo que consiste en un grupo metilo o en el siguiente grupo:



Donde R' es H, OH, 3,5-diOH, 2- NO_2 , 3- NO_2 , 4- NO_2 , 2- NH_2 , 3- NH_2 , 4- NH_2 , 4-Me, 4-OMe (Ts), 3,4-diOMe, 2-Cl, 3-Cl, 4-Cl, 2-Br, 3-Br, 4-Br, 2-I, 3-I, 4-I, 3,5-diCl, 3,5-diBr, 3,5-diI o 3,5-diMe en un resto de bencensulfonilo.

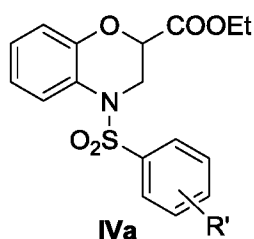
3. El compuesto de acuerdo a la reivindicación 1, donde dicho compuesto comprende la formula:



- 5 donde R₅ se selecciona de la lista que consiste en -CO₂Et, -CH₂OH, -CH₂Cl y -CH₂Ts.

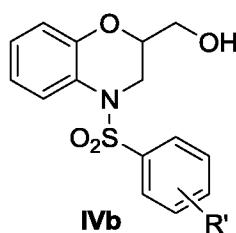
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:

10



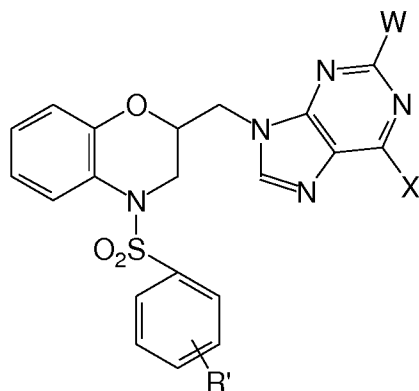
5. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil.

- 15 6. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:



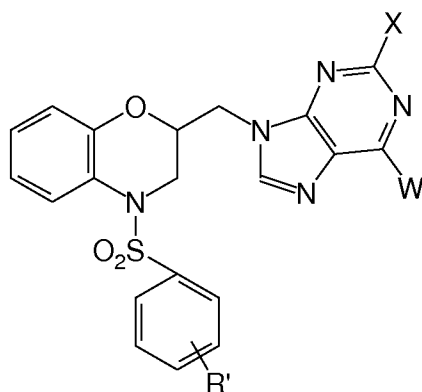
7. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil.

- 20 8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:

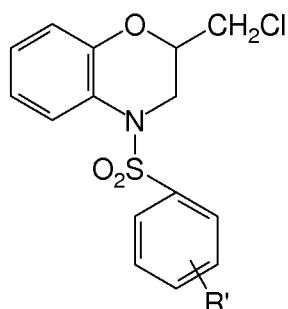


9. Compuesto según la reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4 metil, W es Cl o Br y X es H o Cl.

5 10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:

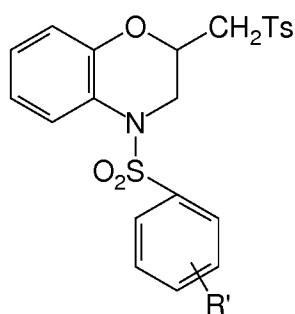


10 11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:



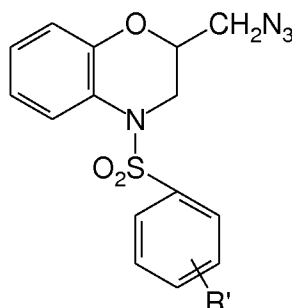
12. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil.

15 13. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho compuesto comprende la siguiente formula estructural:



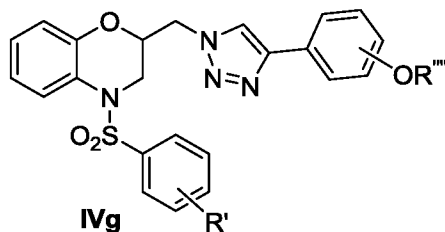
14. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil.

- 5 15. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho compuesto comprende la siguiente fórmula estructural:



16. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil.

- 10 17. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho compuesto comprende la siguiente fórmula estructural:



- 15 18. Compuesto según reivindicación anterior caracterizado porque R' es 4-metil y OR''' es 3-OH.

19. El compuesto según la reivindicación 7, donde W es Cl, X es Cl y R' es 4-metil.

- 20 20. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

21. Uso de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

5 22. Uso según la reivindicación 20, donde el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de mama, colon, colorrectal, melanoma y pulmón.

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 19, donde dicho compuesto es el compuesto definido en la reivindicación 18.

10

24. El uso según la reivindicación 21 donde dicho compuesto es el compuesto definido en la reivindicación 18 y el cáncer se selecciona de la lista que consiste en cáncer de mama o melanoma, preferiblemente melanoma metastásico.

15

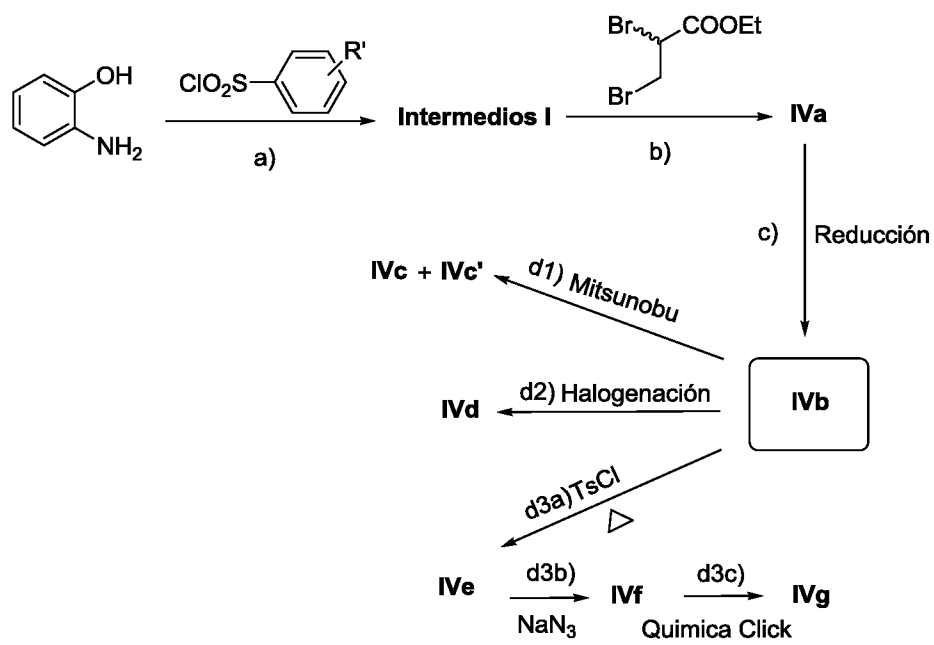


Figura 1

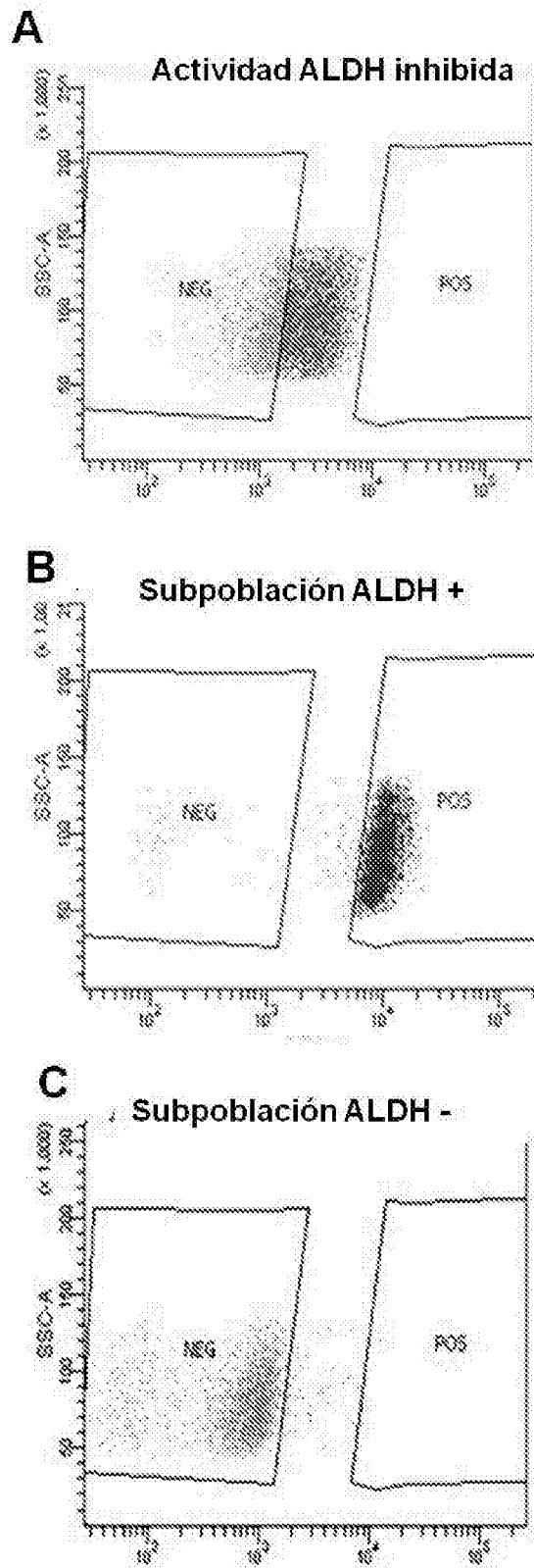


Figura 2

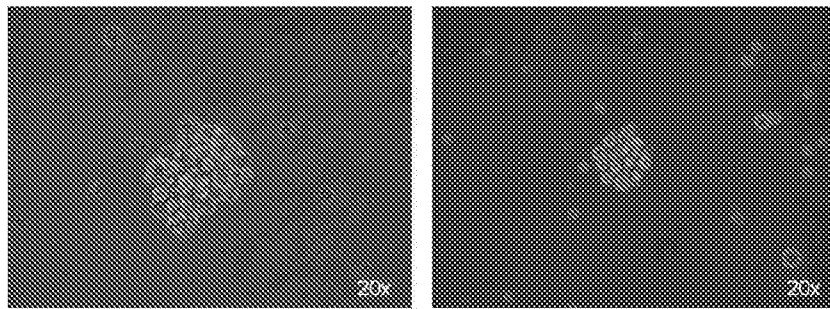
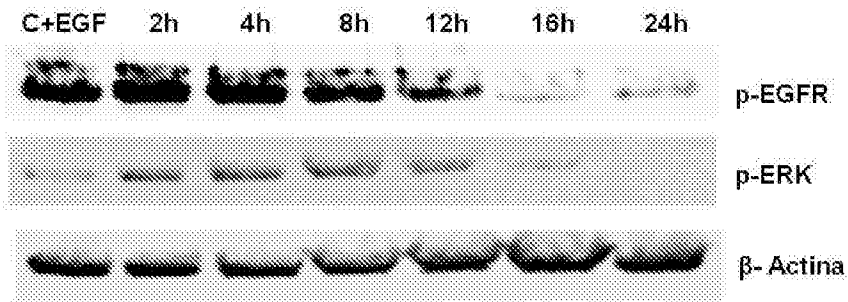


Figura 3

A



B

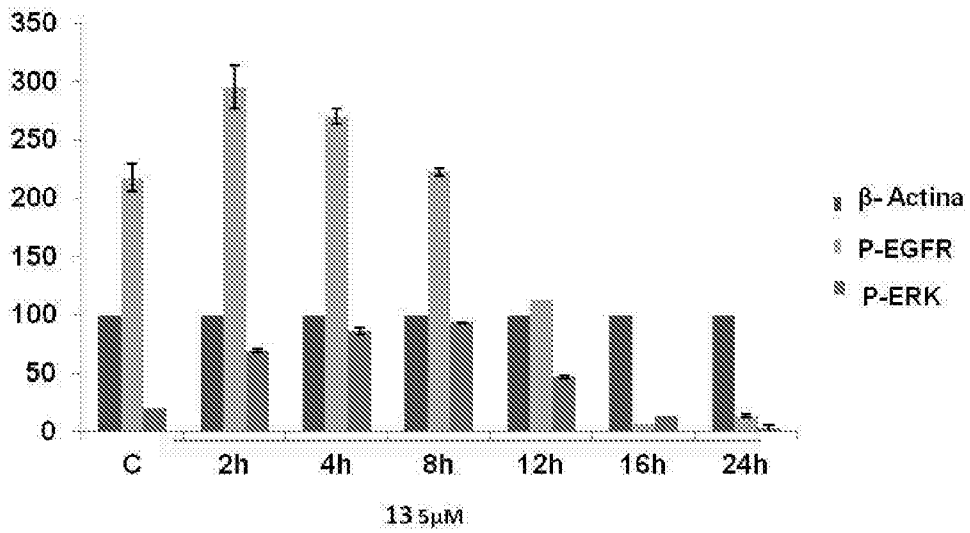


Figura 4

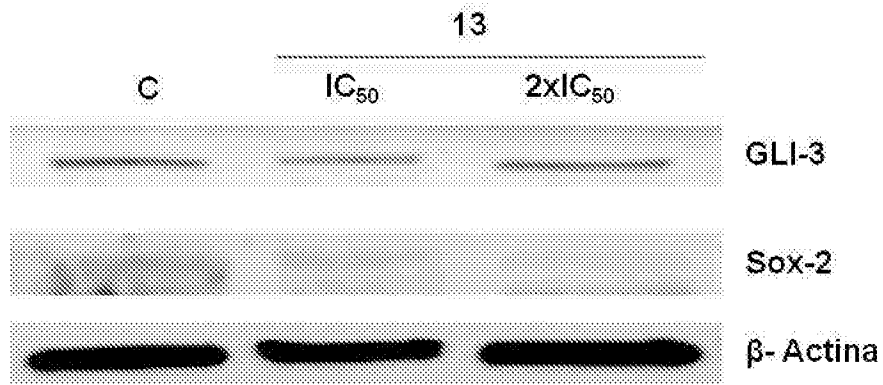


Figura 5

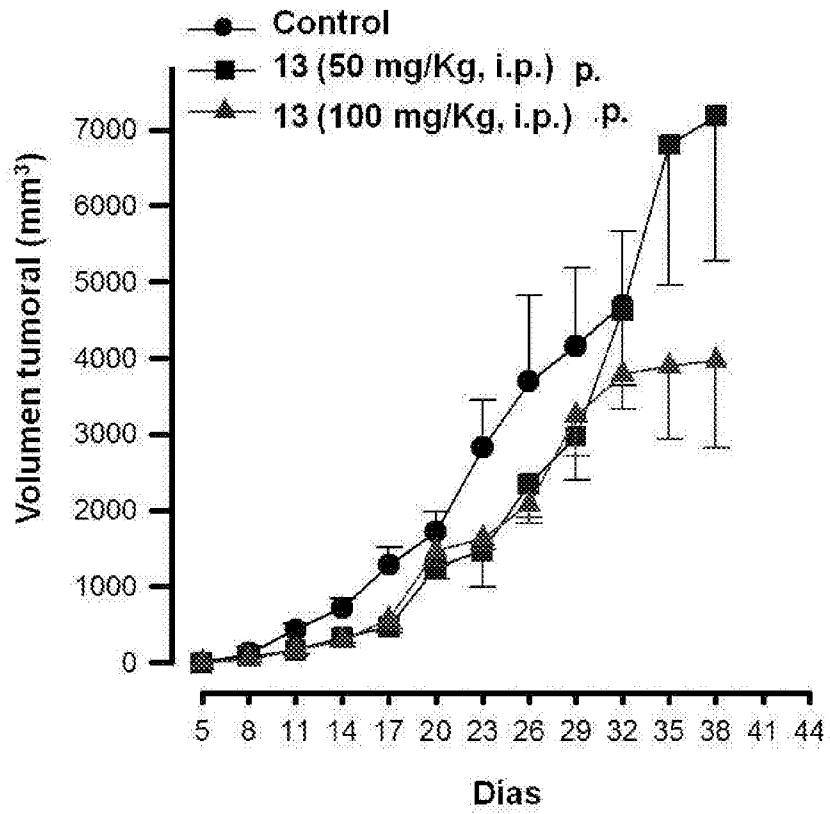


Figura 6

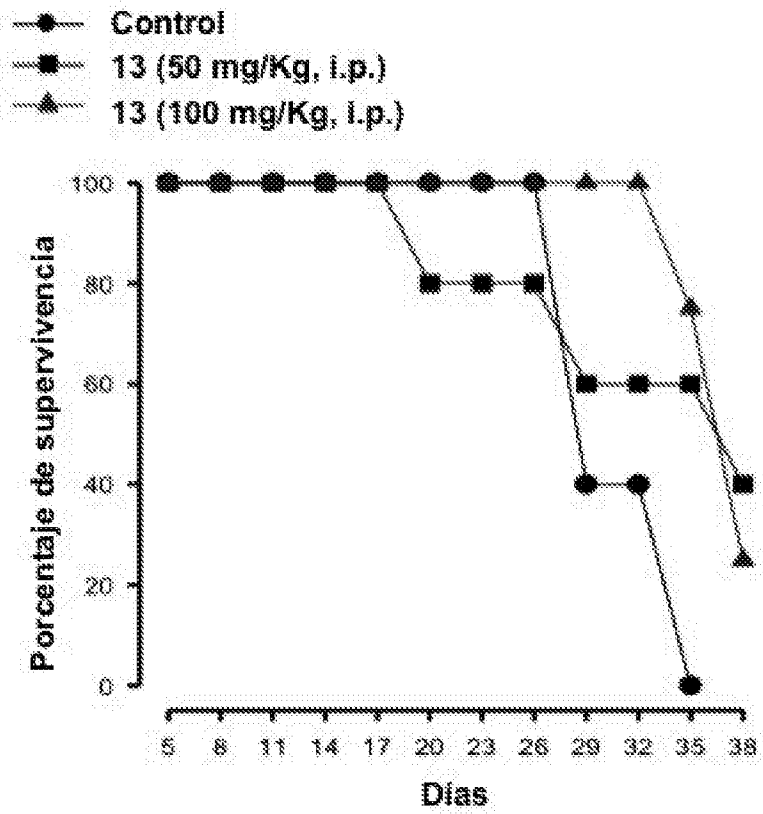


Figura 7