

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 529**

51 Int. Cl.:

**C07D 307/56** (2006.01)

**C07D 307/58** (2006.01)

**C07D 307/64** (2006.01)

**C07D 307/68** (2006.01)

**A01N 43/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2013 PCT/EP2013/060624**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013 WO13174925**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2013 E 13724829 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2852582**

54 Título: **Nuevos análogos de la estrigolactona y su utilización para el tratamiento de plantas**

30 Prioridad:

**23.05.2012 FR 1254700**

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

**15.11.2016**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (INRA) (33.3%)  
147, rue de l'Université  
75007 Paris, FR;**

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%) y  
UNIVERSITE DE PARIS 11-PARIS SUD (33.3%)**

72 Inventor/es:

**BOYER, FRANÇOIS-DIDIER;  
RAMEAU, CATHERINE;  
PILLOT, JEAN-PAUL;  
SERVAJEAN, VINCENT;  
DE SAINT GERMAIN, ALEXANDRE;  
BEAU, JEAN-MARIE;  
POUVREAU, JEAN-BERNARD y  
CLAVE, GUILLAUME**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 589 529 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

Nuevos análogos de la estrigolactona y su utilización para el tratamiento de plantas

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos aptos para controlar la ramificación de las plantas superiores, una composición que comprende dichos compuestos y su utilización para el tratamiento de las plantas superiores, principalmente con el objetivo de controlar su ramificación, por una inhibición selectiva o global del crecimiento de yemas en la planta. Esta inhibición puede ser temporal, de forma que se controle el periodo de desarrollo de estas yemas, o permanente, con el fin por ejemplo de favorecer el crecimiento de otras partes de la planta en detrimento de la(s) inhibida(s).

10 Los compuestos según la invención encuentran aplicaciones principalmente en el campo agrícola, para el cultivo de plantas, tales como las plantas alimentarias, leguminosas, plantas forestales, plantas ornamentales, etc. para las que el control del número de ramificaciones, de la iniciación de las yemas y/o del periodo de ramificación puede mejorar el rendimiento y/o la calidad de la producción (tamaño del fruto, calidad de la madera, etc.). Por plantas superiores se entienden los vegetales pluricelulares, vasculares, provistos de raíces y de una parte aérea. Por cultivo se entiende tanto el cultivo en campo como en plantación para los bosques o como el cultivo *in vitro*, fuera del suelo o cualquier otro.

Las plantas cultivadas, ya sea por sus flores, sus frutos, sus semillas o por sus partes vegetativas son objeto de numerosos controles y tratamientos, de forma que se obtengan el mejor rendimiento posible y la mejor cualidad.

20 Así, por ejemplo, se trata de controlar los periodos de floración de forma que se evite que las yemas florales se inicien durante los periodos de riesgo grande de heladas. Igualmente, cuando se desean obtener frutos de gran tamaño o, más generalmente, plantas más vigorosas, se procede a una poda de la planta de forma que se limite el número de ramificaciones y así el número de órganos "pozo" que son los frutos en periodo de crecimiento o de las semillas en curso de llenado. La utilización de abonos permite igualmente optimizar los rendimientos.

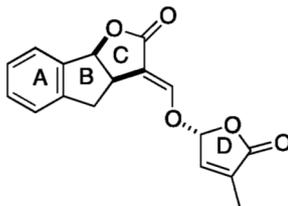
25 Dichos controles y tratamientos necesitan de un conocimiento, además de sobre la planta misma, de las condiciones en las que está cultivada: naturaleza del suelo, clima, etc., principalmente para saber cuándo y cómo podar las plantas. Además, la poda es un procedimiento manual tedioso, costoso, que necesita de la intervención de personas cualificadas.

Para subsanar estos inconvenientes, se han propuesto por la técnica anterior procedimientos de tratamiento químico de las plantas para controlar su crecimiento, por inhibición total o parcial, definitiva o temporal, del crecimiento de las ramificaciones, de forma que se optimice principalmente el rendimiento de estas plantas.

30 En particular, se ha propuesto en el documento de patente FR-A-2930402 poner las plantas que se van a tratar en contacto con una disolución que contenga una estrigolactona, natural o sintética, de forma que se inhiba o se limite el crecimiento de todas o parte de las ramificaciones.

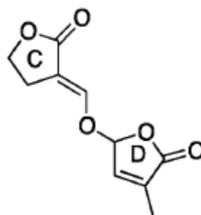
35 Las estrigolactonas son hormonas vegetales de la familia de los apocarotenoides. Están compuestas principalmente de un esqueleto con cuatro ciclos denominados A, B, C y D, más precisamente de una lactona tricíclica ABC unida mediante un enlace de éter de enol a un ciclo butirolactona, denominado ciclo D. Actualmente se conocen numerosas estrigolactonas naturales, tales como la sorgolactona, el 5-desoxi-estrigo, el estrigo, el orobanco, el 2'-epi-orobanco, el solanaco, el acetato de orobanquilo o el acetato de estrigo, y estrigolactonas de síntesis, tales como la GR24 o la GR5. Se han descrito aplicaciones de las estrigolactonas no solo para el control del crecimiento y de la estructura de las plantas superiores, sino también para inducir la germinación de las semillas de las plantas parásitas, tales como las orobancas. Así, con el fin de eliminar dichas plantas parásitas de los suelos agrícolas, se ha propuesto tratar dichos suelos con estrigolactonas, de forma que se induzca la germinación de las plantas parásitas en ausencia de las plantas huésped indispensables para su existencia, lo que lleva consigo su muerte.

Entre las estrigolactonas, la molécula denominada GR24, de fórmula:



45 en la que el ciclo A es un ciclo aromático,

y la molécula denominada GR5, de fórmula:

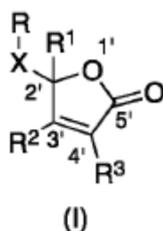


sin ciclos A y B,

5 han sido descritas en la técnica anterior como particularmente eficaces para reprimir la ramificación de las plantas superiores. Estos compuestos, además del hecho de ser poco fáciles de sintetizar, presentan sin embargo el inconveniente de ser relativamente citotóxicos.

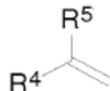
La presente invención tiene como objetivo proponer nuevos compuestos susceptibles de ser utilizados en procedimientos de tratamiento de las plantas, que sean al menos tan eficaces como las estrigolactonas naturales, y preferentemente que las estrigolactonas sintéticas propuestas por la técnica anterior, en cuanto al control del grado de ramificación de las plantas, siendo a la vez más sencillas de sintetizar y presentando principalmente una citotoxicidad menor.

A este efecto, se proponen según la invención nuevos compuestos que responden a la fórmula general (I):



en la que:

15 X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, NH o un radical N-alquilo,  
 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no representan ninguno de los dos un átomo de hidrógeno,  
 20 R<sup>3</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,  
 y R representa un radical fenilo monosustituido con un sustituyente Y elegido entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>, o un radical fenilo disustituido con un sustituyente Y y un sustituyente Z, eligiéndose Y y Z, idénticos o diferentes, cada uno entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>, o formando juntos un ciclo saturado o insaturado o aromático, conteniendo en su caso uno o varios heteroátomos, eventualmente sustituido, principalmente un ciclo de 5 a 8 átomos,  
 25 preferentemente de 6 átomos,  
 o representando R un radical:



30 en el que R<sup>4</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado,  
 y R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, en su caso sustituido, un grupo COR<sup>6</sup> o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, en los que R<sup>6</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado.

Cualquier forma isómera de estos compuestos en el carbono C<sub>2'</sub> (esteroisómeros 2'<sup>α</sup> y 2'<sup>β</sup>) y cualquier mezcla de dichas formas isómeras entran igualmente en el marco de la invención. A partir de una mezcla de isómeros, cada isómero se puede obtener por métodos clásicos en sí mismos por los expertos en la técnica.

En la fórmula (I) anterior, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son además intercambiables.

35 En la presente descripción se entiende por radical fenilo monosustituido un radical fenilo sustituido con un sustituyente o más, es decir un radical fenilo sustituido con al menos un sustituyente Y. Igualmente, se entiende por radical fenilo disustituido un radical fenilo sustituido con dos sustituyentes o más, es decir un radical fenilo sustituido con al menos un sustituyente Y y un sustituyente Z.

Los inventores han descubierto que estos compuestos particulares, análogos a las estrigolactonas en lo que se refiere al ciclo D, inéditos hasta el momento, eran particularmente activos para la represión de la ramificación de las plantas. Su eficacia, muy superior a la de las estrigolactonas naturales, es comparable a las de los otros compuestos análogos sintéticos propuestos por la técnica anterior, en particular el GR24 y GR5.

- 5 En particular, los inventores han descubierto que los análogos de las estrigolactonas que responden a la fórmula (I) eran capaces de inhibir el inicio de las yemas axilares, principalmente en el guisante (*Pisum sativum L.*) a una concentración inferior a la de las estrigolactonas naturales.

- 10 Los compuestos según la invención son además particularmente fáciles de preparar, principalmente en comparación con los análogos de las estrigolactonas de 4 ciclos. Igualmente presentan ventajosamente una estabilidad en medio acuoso muy superior a las de las estrigolactonas naturales, que de forma inherente son inestables en agua, en particular a pH superior a 7, pero también a la del GR24 y del GR5. Su citotoxicidad es además ventajosamente muy inferior a la de los compuestos sintéticos GR24 y GR5.

- 15 De forma particularmente ventajosa, los compuestos según la invención solo actúan además débilmente sobre la germinación de las semillas de las plantas parásitas, principalmente del tipo orobanca. En particular, presentan una actividad al menos 10 a 100.000 veces menor que los compuestos GR24 y GR5 para la germinación de las semillas de orobancas ramosas (*Phelipanche ramosa*, *Orobanche minor* y *Orobanche cumana*) y de *Striga hermonthica*. La pululación de dichas plantas parásitas perjudiciales resulta ser un problema cada vez más presente tanto en las regiones templadas como en las regiones tropicales, se comprende fácilmente el interés de disponer de medios de tratamiento de los cultivos vegetales que no favorezcan la germinación de las semillas de estas plantas parásitas, contrariamente a las estrigolactonas naturales o a la mayor parte de sus análogos de síntesis descritos en la técnica anterior que sí que la inducen.

Según una característica preferida de los compuestos según la invención  $R^3$  representa un radical alquilo lineal de C1-C10, preferentemente un radical metilo.

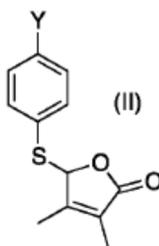
- 25  $R^1$  y  $R^2$  representan además cada uno preferentemente un átomo de hidrógeno o un radical alquilo lineal o ramificado de C1-C10.

De forma aún preferida,  $R^1$  representa un átomo de hidrógeno y  $R^2$  representa un radical alquilo lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente un radical metilo.

Preferentemente, X representa un átomo de azufre.

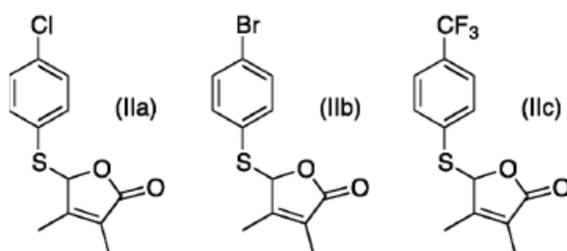
- 30 En modos de realización particulares de la invención, R representa un radical fenilo sustituido al menos en posición para-

Un compuesto particularmente preferido según la invención responde a la fórmula general (II):

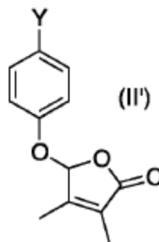


en la que Y se elige entre Cl, Br, I y  $CF_3$ , y en la que X es un átomo de azufre,  $R^1$  es un átomo de hidrógeno,  $R^2$  y  $R^3$  son ambos radicales metilo, y R es un radical fenilo monosustituido con el sustituyente Y en posición para-

- 35 Entre los compuestos que responden a la fórmula general (II) anterior, se pueden citar en particular el compuesto en el que Y es un átomo de cloro, que responde a la fórmula general (IIa) siguiente, el compuesto en el que Y es un átomo de bromo, que responde a la fórmula general (IIb) siguiente, y el compuesto en el que Y representa  $CF_3$ , que responde a la fórmula general (IIc) siguiente:

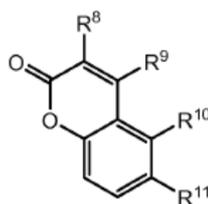


Otro compuesto según la invención responde a la fórmula general (II')



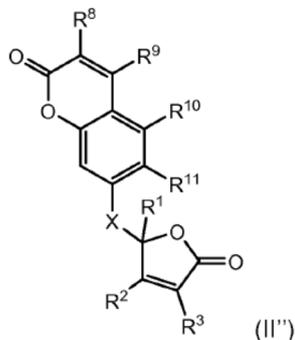
en la que Y se elige entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>, y en la que X es un átomo de oxígeno, R<sup>1</sup> es un átomo de hidrógeno, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son ambos radicales metilo, y R es un radical fenilo monosustituido con el sustituyente Y en posición para.

- 5 Otros compuestos particulares según la invención son tales que R representa un radical fenilo disustituido del tipo cumarina, de fórmula:



- 10 en la que R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, CHO, CN, NO<sub>2</sub>, un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, en su caso sustituido, o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, preferentemente de C1-C10.

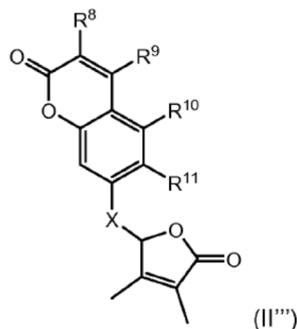
Dichos compuestos que responden así a la fórmula general (II'') siguiente:



en la que:

- 15 X representa un átomo de oxígeno, de azufre, NH o un radical N-alquilo,  
 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no representan ninguno de los dos un átomo de hidrógeno,  
 R<sup>3</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,  
 20 R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son como se han definido anteriormente.

Más particularmente, compuestos ventajosos según la invención responden a la fórmula general (II'''):



en la que X, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> son tales como se han definido anteriormente.

5 Un compuesto particular según la invención es tal que R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> representan todos ellos cada uno un átomo de hidrógeno.

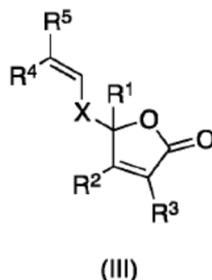
En modos de realización diferentes de la invención, R representa un radical:



en el que R<sup>4</sup> representa un radical alquilo o un radical alquenilo lineales o ramificados, de C1-C15,

10 y R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10, preferentemente de C1-C5, en su caso sustituido, un grupo COR<sup>6</sup> o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, en los que R<sup>6</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5.

Así, entran en el marco de la invención los compuestos de fórmula general (III):



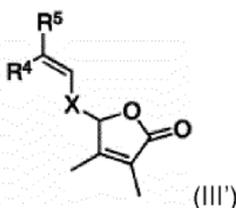
en la que R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son tales como se han definido anteriormente.

15 Compuestos particulares según la invención responden a la fórmula general (III) anterior, en la que R<sup>4</sup> representa un radical alquilo o un radical alquenilo lineales o ramificados, preferentemente de C1-C15, y R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, preferentemente insaturado, de C1-C10, preferentemente de C1-C5, sustituido, preferentemente en su extremo libre, con un grupo electroattractor. Ejemplos de dichos grupos electroattractores son CHO, CN, NO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>R<sup>7</sup>, en el que R<sup>7</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5.

20

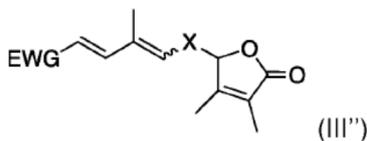
Los compuestos de la fórmula (III) anterior en los que R<sup>3</sup> representa un radical metilo se muestran particularmente ventajosos desde el punto de vista de la eficacia de la inhibición de la iniciación de las yemas axilares. Ventajosamente, R<sup>1</sup> representa además un átomo de hidrógeno y/o R<sup>2</sup> representa igualmente un radical metilo.

Compuestos que responden a la fórmula general (III') siguiente se muestran así particularmente ventajosos:



25

y más particularmente los compuestos de fórmula general (III'') siguiente:

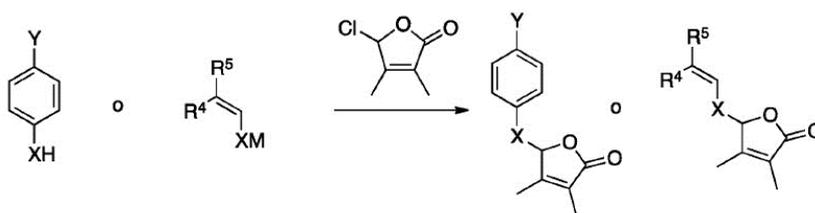


en la que EWG representa un grupo electroattractor elegido entre CHO, CN, NO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>R<sup>7</sup>, donde R<sup>7</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5,

5 y X representa O, NH o S.

Los compuestos según la invención se pueden obtener por cualquier vía de síntesis adecuada. El experto en la técnica sabrá determinar las etapas, las condiciones operatorias y los precursores que deben utilizarse en función de la estructura particular del compuesto de fórmula general (I) previsto.

10 Un procedimiento de síntesis de los compuestos según la invención que responden a las fórmulas generales (II), (II') o (III') anteriores puede responder al esquema de reacción siguiente:



en el que M representa un metal alcalino, por ejemplo un átomo de sodio o de potasio.

Cualquier otro modo de síntesis que el experto en la técnica sabrá identificar a partir de sus conocimientos generales entra igualmente en el marco de la invención.

15 Otro aspecto de la invención es una composición que comprende un compuesto tal como se ha definido anteriormente, que se puede utilizar en particular para el tratamiento de las plantas superiores con el fin de controlar su crecimiento y su estructura, más particularmente su ramificación.

Preferentemente, la concentración de dicho compuesto en esta composición está comprendida entre 0,1 nM y 10 μM, preferentemente entre 0,1 y 1.000 nM, preferentemente aún entre 1 y 100 nM.

20 Un tercer aspecto de la invención es la utilización de un compuesto tal como se ha definido anteriormente y/o de una composición que lo comprende, para el tratamiento de una planta superior con el fin de controlar su crecimiento y su estructura.

Más particularmente, se pone en contacto de la planta una cantidad adaptada de un compuesto según la invención de forma que se inhiba la formación de al menos una ramificación.

25 Por inhibir, se entiende en la presente descripción reprimir definitiva o temporalmente el crecimiento de una yema. Así, según la invención, se puede suprimir una ramificación inhibiendo definitivamente el crecimiento de la yema correspondiente o poner en latencia dicha yema de forma que se retrase en el tiempo su crecimiento.

Por ramificación se entiende la excrecencia nacida de una yema axilar situada en la axila de la hoja, ya sea una rama, una flor o una inflorescencia.

30 La inhibición puede ser global, es decir afectar a todas las yemas axilares en el momento del tratamiento de la planta o dirigida, es decir afectar únicamente a las yemas a las que se dirige específicamente el tratamiento.

Las plantas tratadas pueden estar cultivadas tanto en invernaderos como en campos, *in vitro* o incluso sin tierra.

35 Se entiende por una cantidad adaptada, una cantidad al menos suficiente para actuar sobre el crecimiento y la estructura de la planta que se va a tratar. Esta cantidad es evaluada para cada caso particular, en función principalmente de la naturaleza de la planta que se va a tratar y del grado de control de la ramificación deseada, por ejemplo según que se pretenda inhibir definitiva o temporalmente el crecimiento de la yema.

Según la invención, se puede aplicar una composición que comprende un compuesto según la invención sobre una porción al menos parcial de la parte aérea de la planta. Por ejemplo, se puede aplicar, por vaporización o por depósito, dicha composición sobre las yemas axilares de la planta que se desea reprimir, de forma que se controle el

crecimiento de las yemas así tratadas, o más generalmente sobre la parte de la planta de la que se desea controlar el crecimiento. De otra forma, es posible inyectar la composición que comprende un compuesto según la invención en una parte aérea de dicha planta, por ejemplo, al nivel mismo de las yemas incluso, o de los tallos que llevan las yemas que se quieren reprimir, de forma que se controle el crecimiento de la planta situada por encima de la zona de inyección.

En otro modo de realización, la invención prevé aportar una composición que comprende el compuesto según la invención por al menos una raíz de dicha planta, de forma que se controle la ramificación y/o la altura de la planta. Esto puede ser realizado mediante un enriquecimiento del suelo en el compuesto según la invención, de forma que disminuya de forma no selectiva el número de tallos o que se frene su crecimiento. En efecto, los inventores han observado que la señal de represión SMS del crecimiento de las ramificaciones migra en el sentido raíz-tallo, lo que hace pensar que es transportada por la savia bruta del xilema.

Ventajosamente, la concentración en compuesto según la invención en la composición es como mínimo de 0,1 nM y variará según que se desee inhibir definitiva o temporalmente el crecimiento de la yema, siendo la concentración además función de la naturaleza de la planta que se va a tratar. De forma general, la concentración en compuesto en la composición variará entre 0,1 nM y 10  $\mu$ M, preferentemente entre 0,1 y 1.000 nM, preferentemente aún entre 1 y 100 nM.

Igualmente, el número de días de tratamiento puede variar en función de la planta, de su edad en el momento del tratamiento, del efecto deseado, definitivo o no, etc.

Las características y ventajas del procedimiento según la invención aparecerán más claramente a la luz de los ejemplos de realización siguientes, suministrados de modo únicamente ilustrativo y nunca limitativo de la invención, con el apoyo de las figuras 1 a 17, en las que:

- la figura 1 es una curva que muestra los resultados de un análisis de estabilidad química en disolución acuosa (50  $\mu$ g/mL del compuesto en metanol/agua: 1/4, pH 6,7, 21°C), para el compuesto (IIa) según la invención y el compuesto comparativo GR24, representándose el % de compuesto no degradado en la disolución en función del tiempo;
- la figura 2 es una curva que muestra los resultados de un análisis de estabilidad química en disolución acuosa (50  $\mu$ g/mL del compuesto en metanol/agua: 1/4, pH 6,7, 21°C), para los compuestos respectivos (IIa) y (IIIb) según la invención y el compuesto comparativo GR24, representándose el % de compuesto no degradado en la disolución en función del tiempo;
- la figura 3 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, de los compuestos según la invención (IIa), (II'd) y (II'e) y el compuesto comparativo GR24, en dosis comprendidas entre 10 nM y 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante;
- la figura 4 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, de los compuestos según la invención (IIa), (IIb), (IIc), (II'd), (II'e) y (II'f) en dosis comprendidas entre 100 nM y 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante;
- la figura 5 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, de los compuestos según la invención (IIa), (IIIa), (IIIb), (IIIc) y del compuesto comparativo GR24, en dosis respectivas de 100 nM y 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- la figura 6 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, del compuesto según la invención (IIIb) y del compuesto comparativo GR24, en dosis respectivas de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo y un control negativo "NT" representa una planta no tratada;
- la figura 7 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, del compuesto según la invención (IIa) y de los compuestos comparativos GR24, Comp. 3 y Comp. 4 en dosis respectivas de 10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo y un control negativo "NT" representa una planta no tratada;

- 5 - la figura 8 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, del compuesto según la invención (IIa) y de los compuestos comparativos GR24, Comp. 5 y Comp. 6 en dosis respectivas de 10 nM y 100 nM sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo y un control negativo "NT" representa una planta no tratada;
- 10 - la figura 9 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 4, 8 días después del tratamiento en el nudo 4, del compuesto (IIa) y del compuesto comparativo GR24, en dosis comprendidas entre 0,1 nM y 100 nM sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante;
- 15 - la figura 10 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, del compuesto según la invención (IIIa) y del compuesto comparativo GR24, en una dosis de 1  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms1* del guisante;
- 20 - la figura 11 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la ramificación medida en los nudos 3 a 5, 8 días después del inicio de un cultivo hidropónico de mutantes *rms1* del guisante, en presencia de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y del compuesto comparativo GR24, en una dosis de 1  $\mu$ M; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 25 - la figura 12 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la altura de la planta, 8 días después del inicio de un cultivo hidropónico de mutantes *rms1* del guisante, en presencia de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y del compuesto comparativo GR24, en una dosis de 1  $\mu$ M; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 30 - la figura 13 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la ramificación medida en los nudos 3 a 4, 8 días después del inicio de un cultivo hidropónico de mutantes *rms1* del guisante, en presencia del compuesto según la invención (II'g) y del compuesto comparativo GR24, en una dosis de 3  $\mu$ M; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 35 - la figura 14 muestra un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la altura de la planta, 8 días después del inicio de un cultivo hidropónico de mutantes *rms1* del guisante, en presencia del compuesto según la invención (II'g) y del compuesto comparativo GR24, en una dosis de 3  $\mu$ M; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 40 - la figura 15 representa un gráfico de barras que muestra la actividad, expresada en términos de la longitud de la yema/ramificación medida en el nudo 3, 8 días después del tratamiento en el nudo 3, de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y del compuesto comparativo GR24, en dosis respectivas de 100 nM y 3  $\mu$ M sobre la represión de la ramificación del mutante *rms4* del guisante; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 45 - la figura 16 muestra un gráfico de barras que representa el número de yemas muertas para grupos de 48 plantas mutantes *rms4* del guisante, 8 días después del tratamiento en el nudo 3 con los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb), y el compuesto comparativo GR24, en dosis de 3  $\mu$ M; un control negativo "CTL 0" representa una muestra constituida por el disolvente solo;
- 50 - y la figura 17 es un gráfico de barras que muestra, para los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y para el compuesto comparativo GR24, la concentración EC50 en un ensayo de germinación de plantas parásitas: *Orobanche cumana*, *Orobanche minor*, *Striga hermonthica*, *Phelipanche ramosa* (*patovar pv T y pv C*).

#### 55 **Ejemplo 1. Síntesis de ejemplos de los compuestos según la invención y de ejemplos de compuestos comparativos**

##### 1/ Material y métodos

Los espectros de infrarrojo han sido registrados en película sobre una ventana de diamante. Los datos se dan en  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ).

60 Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  han sido registrados en disoluciones en  $\text{CDCl}_3$ , usando el disolvente prótico  $\text{CHCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}} = 7,24$  ppm) o  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{C}} = 77,23$  ppm) como referencia interna y se dan en ppm.

Los espectros de masas han sido determinados por ionización por electronebulización (ESI).

Todas las reacciones han sido seguidas por cromatografía en capa delgada (CCM sobre placas de aluminio de 0,2 mm recubiertas previamente de gel de sílice, usando luz UV y una disolución etanólica al 5% en ácido fosfomolibdico y calor como agente revelador.

- 5 La cromatografía ultrarrápida ha sido realizada sobre gel de sílice 60, 40-63  $\mu\text{m}$  (malla de 400-230), con acetato de etilo (AcOEt) y heptano como eluyentes.

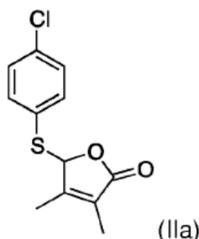
Los reactivos y disolventes disponibles comercialmente se han purificado y secado cuando ha sido necesario por métodos clásicos.

- 10 La dimetilformamida DMF y el diclorometano  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se han secado por destilación sobre hidruro de calcio, la acetona por destilación sobre  $\text{CaSO}_3$  anhidro.

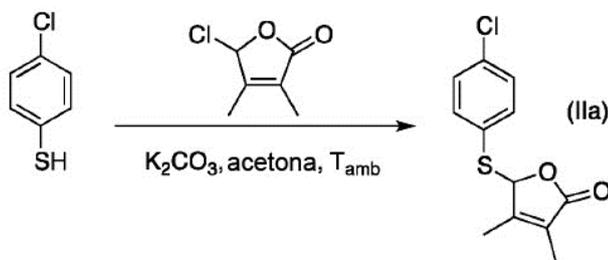
Salvo que se indique lo contrario, todos los demás reactivos se han obtenido a partir de fuentes comerciales y utilizados sin otra purificación.

## 2/ Compuesto (IIa)

El compuesto que responde a la fórmula (IIa), la 5-((4-clorofenil)tio)-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona:



- 15 ha sido sintetizado a partir de 4-clorotiofenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según el esquema de reacción siguiente:



de la forma siguiente.

- 20 A una disolución de 4-clorotiofenol comercial (400 mg, 2,76 mmoles) en acetona anhidra (10 mL) con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (459 mg, 3,31 mmoles), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2-(5H)-ona (405 mg, 2,6 mmoles) (preparada según el método de Canevet *et al.*, 1978) en acetona anhidra (5 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $\text{SiO}_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

- 25 Después de 1 día con agitación, se evapora la acetona. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre sílice (eluyente heptano(AcOEt 8:2) para suministrar el compuesto (IIa) en forma de un sólido blanco (361 mg, 1,42 mmoles, 51%).

PF: 74,5-76,9°C.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,34 (dt,  $J = 8,7, 2,1$  Hz, 2 H), 7,20 (dt,  $J = 8,7, 2,1$  Hz, 2 H), 5,83-5,82 (m, 1 H), 1,96 (t,  $J = 1,0$  Hz, 3 H), 1,64 (t,  $J = 1,0$  Hz, 3 H).

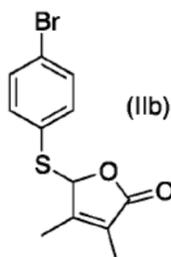
- 30 RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  172,6 (C), 155,2 (C), 135,4 (C), 135,2 (2CH), 129,2 (2CH), 128,2 (C), 126,2 (C), 88,1 (CH), 12,6 ( $\text{CH}_3$ ), 8,5 ( $\text{CH}_3$ ).

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 2.924, 1.758, 1.673, 1.476, 1.093, 985  $\text{cm}^{-1}$ .

HRMS (ESI):  $m/z$  calculado para el  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{ClO}_2\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 255,0247; encontrado: 255,0245.

## 3/ Compuesto (IIb)

El compuesto que responde a la fórmula (IIb), la 5-((4-clorofenil)tio)-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona:



- 5 ha sido sintetizado a partir de 4-bromotiofenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según un esquema de reacción similar al indicado anteriormente para el compuesto (IIa), de la forma siguiente.

A una disolución de 4-bromotiofenol comercial (283,6 mg, 1,5 mmoles) en acetona anhidra (15 mL) con  $K_2CO_3$  anhidro (337 mg, 3 mmoles, 3 eq.), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2-(5H)-ona (263,8 mg, 1,8 mmoles) en acetona anhidra (10 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $SiO_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

- 10 Después de 8 días con agitación, se evapora la acetona y se recoge el residuo con  $CH_2Cl_2$  para filtrarlo sobre celita. Después de evaporación, el sólido marrón resultante se purifica por cromatografía sobre sílice (introducción y elución con  $CH_2Cl_2$  columna de 2 cm de diámetro y 45 cm de altura de sílice) para suministrar el compuesto (IIb) en forma de un sólido transparente (152,4 mg, 0,51 mmoles, 34% de rendimiento).

PF: 91°C.

- 15 RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1,71 (s ancho, 3H), 2,03 (s ancho, 3H), 5,89 (s ancho, 1H), 7,38 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H), 7,46 (d,  $J = 8,2$  Hz, 2H).

RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125,5 MHz):  $\delta$  (ppm) 8,7 ( $CH_3$ ), 12,8 ( $CH_3$ ), 88,2 (CH), 123,8 (C), 126,6 (C), 129,0 (C), 132,4 (2CH), 135,5 (2CH), 155,1 (C), 172,7 (C).

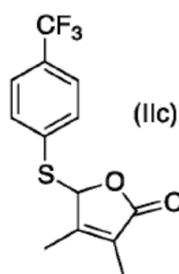
IR  $\nu_{max}$  (película): 1.760, 1.686, 1.673  $cm^{-1}$ .

- 20 MS (ES):  $m/z$  (%) 297,0 (99%,  $[M-H]^+$ ).

HRMS (ESI):  $m/z$  calculado para el  $C_{12}H_{12}O_2SBr$   $[M-H]^+$ : 296,9585, encontrado: 296,9592.

## 4/ Compuesto (IIc)

El compuesto que responde a la fórmula (IIc), la 3,4-dimetil-5-((4-trifluorometil)fenil)tio)-furan-2(5H)-ona:



- 25 ha sido sintetizado a partir de 4-(trifluorometil)tiofenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según un esquema de reacción similar al indicado anteriormente para el compuesto (IIa), de la forma siguiente.

A una disolución de 4-(trifluorometil)tiofenol comercial (267,3 mg, 1,5 mmoles) en acetona anhidra (15 mL) con  $K_2CO_3$  anhidro (337 mg, 3 mmoles, 3 eq.), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2-(5H)-ona (263,8 mg, 1,8 mmoles) en acetona anhidra (10 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $SiO_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

- 30 Después de 8 días con agitación, se evapora la acetona y se recoge el residuo con  $CH_2Cl_2$  para filtrarlo sobre celita. Después de evaporación, el aceite marrón resultante se purifica 2 veces por cromatografía sobre sílice (introducción y elución con  $CH_2Cl_2$  columna de 2 cm de diámetro y 45 cm de altura de sílice) para suministrar el compuesto (IIc) en forma de un aceite amarillo pálido transparente (112,8 mg, 0,39 mmoles, 26% de rendimiento).

RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1,75 (s ancho, 3H), 2,06 (s ancho, 3H), 5,99 (s ancho, 1H), 7,57 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,63 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125,5 MHz):  $\delta$  (ppm) 8,7 ( $\text{CH}_3$ ), 12,8 ( $\text{CH}_3$ ), 88,0 (CH), 122,1 (C), 125,7 ( $\text{CF}_3$ ), 126,0 (CH), 126,1 (CH), 126,8 (CH), 132,8 (2CH), 135,9 (C), 154,8 (C), 172,6 (C).

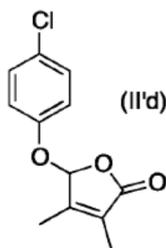
5 IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 1.766, 1.687, 1.672  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (ES):  $m/z$  (%) 287,0 (100%,  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ).

HRMS (ESI):  $m/z$  calculado para el  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{F}_3\text{S}$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 287,0354, encontrado: 287,0342.

5/ Compuesto (II'd)

El compuesto que responde a la fórmula (II'd), la 5-((4-clorofenoxi)-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona:



10

ha sido sintetizado a partir de 4-clorofenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según un esquema de reacción similar al indicado anteriormente para el compuesto (IIa), de la forma siguiente.

15 A una disolución de 4-clorofenol comercial (0,847 g, 6,59 mmoles) en acetona anhidra (50 mL) con  $\text{K}_2\text{CO}_3$  anhidro (1,821 g, 13,13 mmoles), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona (1,45 g, 9,89 mmoles) (preparada según el método de Canevet *et al.*, 1978) en acetona anhidra (20 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $\text{SiO}_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

Después de 2 días con agitación, se evapora la acetona. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre sílice (eluyente heptano/AcOEt 8:2) y después se recristaliza (hexano/AcOEt) para proporcionar el compuesto (II'd) en forma de un sólido blanco (793 mg, 3,33 mmoles, 50%).

20 PF: 84-85°C.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7,27 (dt,  $J = 9,0, 3,2$  Hz, 2 H), 7,06 (dt,  $J = 9,0, 3,0$  Hz, 2 H), 6,00-5,99 (s ancho, 1 H), 2,05 (t,  $J = 1,0$  Hz, 3 H), 1,87 (t,  $J = 1,0$  Hz, 3 H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  171,8 (C), 155,5 (C), 153,6 (C), 129,8 (2CH), 128,9 (C), 127,4 (C), 118,5 (2CH), 100,9 (CH), 11,8 ( $\text{CH}_3$ ), 8,7 ( $\text{CH}_3$ ).

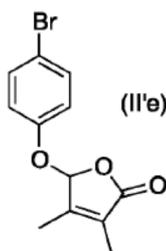
25 IR  $\nu_{\text{max}}$  (película): 1.773, 1.694, 1.490, 1.227, 974  $\text{cm}^{-1}$ .

MS (ES):  $m/z$  (%) 237,0 (100%,  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ), 273,0 (90%,  $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ ).

HRMS (ESI):  $m/z$  calculado para el  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{ClO}_3$   $[\text{M} - \text{H}]^-$ : 237,0318, encontrado: 237,0325.

6/ Compuesto (II'e)

El compuesto que responde a la fórmula (II'e), la 5-((4-bromofenoxi)-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona:



30

ha sido sintetizado a partir de 4-bromofenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según un esquema de reacción similar al indicado anteriormente para el compuesto (IIa), de la forma siguiente.

A una disolución de 4-bromofenol comercial (259,5 mg, 1,5 mmoles) en acetona anhidra (15 mL) con  $K_2CO_3$  anhidro (337 mg, 3 mmoles, 3 eq.), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2-(5H)-ona (245,0 mg, 1,67 mmoles) en acetona anhidra (10 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $SiO_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

- 5 Después de 17 días con agitación, se evapora la acetona y se recoge el residuo con  $CH_2Cl_2$  para filtrarlo sobre celita. Después de evaporación, el sólido marrón resultante se purifica por cromatografía sobre sílice (introducción y elución con  $CH_2Cl_2$  columna de 2 cm de diámetro y 45 cm de altura de sílice) para suministrar el compuesto (II'e) en forma de un sólido transparente (241,7 mg, 0,85 mmoles, 57% de rendimiento).

PF: 94°C

- 10 RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1,89 (s ancho, 3H), 2,07 (s ancho, 3H), 6,02 (s ancho, 1H), 7,03 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H), 7,43 (d,  $J = 9,0$  Hz, 2H).

RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125,5 MHz):  $\delta$  (ppm) 8,7 ( $CH_3$ ), 11,7 ( $CH_3$ ), 100,8 (CH), 116,3 (C), 118,9 (2CH), 127,3 (C), 132,8 (2CH), 153,5 (C), 156,0 (C), 171,7 (C).

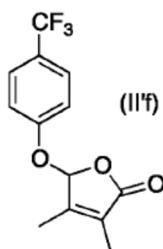
IR (película):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 1.772, 1.693, 1.582.

- 15 MS (ES):  $m/z$  (%) 281,0 (99%, [M-H]).

HRMS (ESI):  $m/z$  (280,9809, [M-H]); calculado para el  $C_{12}H_{10}O_3Br$ : 280,9813.

7/ Compuesto (II'f)

El compuesto que responde a la fórmula (II'f), la 3,4-dimetil-5-(4-trifluorometil)fenoxi)furan-2(5H)-ona:



- 20 ha sido sintetizado a partir de 4-(trifluorometil)fenol y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según un esquema de reacción similar al indicado anteriormente para el compuesto (IIa), de la forma siguiente.

A una disolución de 4-(trifluorometil)fenol comercial (243,2 mg, 1,5 mmoles) en acetona anhidra (15 mL) con  $K_2CO_3$  anhidro (337 mg, 3 mmoles, 3 eq.), colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2-(5H)-ona (263,4 mg, 1,8 mmoles) en acetona anhidra (10 mL). El avance de la reacción se sigue por CCM ( $SiO_2$ ; heptano/AcOEt 8:2).

- 25

Después de 8 días con agitación, se evapora la acetona y se recoge el residuo con  $CH_2Cl_2$  para filtrarlo sobre celita. Después de evaporación, el sólido marrón resultante se purifica por cromatografía sobre sílice (introducción y elución con  $CH_2Cl_2$  columna de 2 cm de diámetro y 45 cm de altura de sílice) para suministrar el compuesto (II'f) en forma de un sólido transparente.

- 30 PF: 97°C

RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz):  $\delta$  (ppm) 1,91 (s ancho, 3H), 2,09 (s ancho, 3H), 6,12 (s ancho, 1H), 7,22 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H), 7,61 (d,  $J = 8,6$  Hz, 2H).

RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 125,5 MHz):  $\delta$  (ppm) 8,7 ( $CH_3$ ), 11,7 ( $CH_3$ ), 100,1 (CH), 116,9 (2CH), 122,4 (C), 126,0 ( $CF_3$ ), 127,3 (2CH), 127,4 (C), 153,4 (C), 159,2 (C), 171,6 (C).

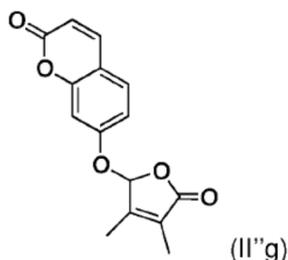
- 35 IR (película):  $\nu$  ( $cm^{-1}$ ) 1.768, 1.697, 1.614.

MS (ES):  $m/z$  (%) 271,1 (100%, [M-H]).

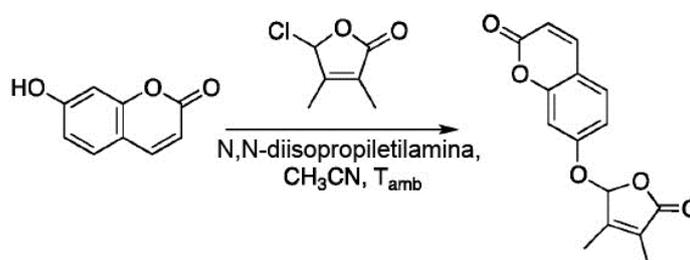
HRMS:  $m/z$  (271,0579, [M-H]); calculado para el  $C_{13}H_{10}O_3F_3$ : 271,0582.

## 8/ Compuesto (II''g)

El compuesto que responde a la fórmula (II''g), la 7-[3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona]oxi-cumarina:



5 ha sido sintetizado a partir de la 7-hidroxycumarina y de la 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según el siguiente esquema de reacción:



de la manera siguiente.

10 A una disolución de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona (352 mg, 2 mmoles) (preparada según el método de Canevet *et al.* (1978)) en acetonitrilo anhidro (10 mL) colocada a temperatura ambiente en atmósfera de argón, se le añade 7-hidroxycumarina sólida comercial o fácilmente accesible según el método de Timonen *et al.* (2011) (CAS RN: 93-35-6, 300 mg, 1,85 mmoles). A continuación se añade N,N-diisopropiletilamina (697 μL, 4 mmoles). El avance de la reacción se sigue por CCM (SiO<sub>2</sub>; heptano/AcOEt 1:1).

15 Después de 12 horas de agitación, se evapora el acetonitrilo. El producto bruto se purifica por cromatografía sobre sílice (eluyente: heptano/AcOEt 6:4) para suministrar el compuesto (II''g) en forma de un sólido blanco (423 mg, 1,55 mmoles, rendimiento: 84%).

PF: 176,2°.

RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 1,85 (t, J = 1,2 Hz, 3H), 2,04 (t, J = 0,9 Hz, 3H), 6,08 (s, 1 H), 6,24-6,27 (d, J = 9,5 Hz, 1 H), 6,98-7,01 (m, 2H), 7,37-7,39 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 7,58-7,61 (d, J = 9,6 Hz, 1 H).

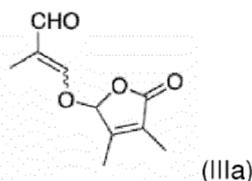
20 RMN de <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,7 (CH<sub>3</sub>), 11,7 (CH<sub>3</sub>), 99,9 (CH), 104,6 (CH), 113,5 (CH), 114,8 (CH), 114,9 (CH), 127,5 (C), 129,3 (CH), 143,1 (CH), 153,3 (C), 155,5 (C), 159,5 (C), 160,7 (C), 171,4 (C).

IR  $\nu_{\max}$  (película): 661, 750, 834, 886, 975, 1.052, 1.088, 1.131, 1.162, 1.195, 1.236, 1.285, 1.318, 1.361, 1.387, 1.505, 1.565, 1.615, 1.624, 1.689, 1.745, 1.781, 3.081 cm<sup>-1</sup>.

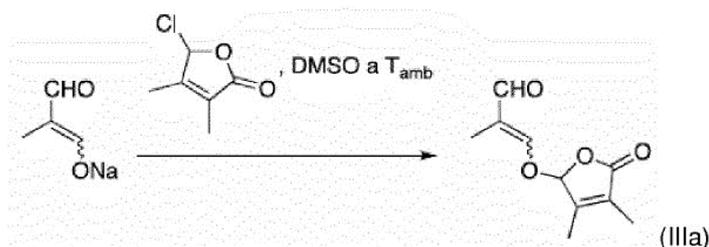
HRMS (ESI): *m/z* calculado para el C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 273,0718, encontrado: 273,0753.

## 9/ Compuesto (IIIa)

25 El compuesto que responde a la fórmula (IIIa), el 3-((3,4-dimetil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)oxi)-2-metilacrilaldehído:



ha sido sintetizado a partir de la sal de sodio del metilmalondialdehído y de 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona, según el esquema de reacción siguiente:



5 Para ello, se mezclan y se agitan a temperatura ambiente durante 14 horas, la sal de sodio del metilmalondialdehído (obtenido según la publicación de Nair *et al.*, 1981) (244 mg, 2,6 mmoles), la 5-cloro-3,4-dimetilfuran-2(5H)-ona (165 mg, 1,13 mmoles) y sulfóxido de dimetilo (2 mL). La finalización de la reacción se controla por CCM (heptano/EtOAc, 8/2 v/v). A continuación se añade agua a la mezcla hasta la disolución completa de las sales, luego se extrae la fase acuosa 3 veces con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se secan con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtran y se evaporan a presión reducida hasta obtener un residuo seco.

10 El producto bruto se purifica por cromatografía sobre gel de sílice con un gradiente lineal de 0-50% v/v de AcOEt en heptano para obtener el compuesto (IIIa) buscado (202 mg, 1,03 mmoles, rendimiento de 91%) en forma de sólido blanco.

Rf = 0,13 (heptano/EtOAc, 8/2 v/v)

RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 9,36 (s, 1H), 7,18 (s, 1H), 6,01 (s, 1H), 2,08 (s, 3H), 1,94 (s, 3H), 1,73 (s, 3H).

15 RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 191,5 (CH), 170,9 (C), 161,4 (CH), 152,6 (C), 128,2 (C), 123,3 (C), 101,8 (CH), 11,4 (CH<sub>3</sub>), 8,8 (CH<sub>3</sub>), 6,6 (CH<sub>3</sub>).

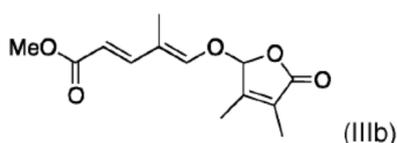
IR ν<sub>max</sub> (película): 1.771, 1.684, 1.652, 1.168, 978 cm<sup>-1</sup>.

MS (ESI): m/z = 197 (MH<sup>+</sup>, 100%).

HRMS (ESI, modo positivo): calculado para el C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub> [M+H<sup>+</sup>]: 197,0814. Encontrado: 197,0809.

20 10/ Compuesto (IIIb)

El compuesto que responde a la fórmula (IIIb), el 5-((3,4-dimetil-5-oxo-2,5-dihidrofuran-2-il)oxi)-4-metilpenta-2,4-dienoato:



se sintetiza a partir del compuesto (IIIa) anterior, según el esquema de reacción siguiente.

25 El compuesto (IIIa) (100 mg, 0,5 mmoles) se disuelve en tolueno seco (10 mL). Se añade metil(trifenilfosforanilideno)acetato (203 mg, 0,61 mmoles) disponible comercialmente y la mezcla resultante se agita a reflujo durante 12 horas. La finalización de la reacción se controla por CCM (heptano/EtOAc, 7:3, v/v). A continuación, se concentra la mezcla de reacción a presión reducida y el residuo se purifica por cromatografía sobre una columna de gel de sílice con un gradiente lineal de EtOAc (0-20%) en heptano como fase móvil, para obtener el dienoato buscado (IIIb) en forma de un polvo blanco (77 mg, 305 μmoles, rendimiento = 80% después de eliminación del aldehído de partida (IIIa) que no había reaccionado).

30 RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 7,23 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 6,69 (s, 1H), 5,85 (s, 1H), 5,79 (d, J = 15,4 Hz, 1H), 3,72 (s, 3H), 1,99 (s, 3H), 1,87 (s, 3H), 1,73 (s, 3H).

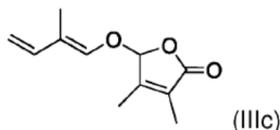
RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 171,2, 167,7, 153,0, 148,3, 144,9, 127,8, 117,4, 115,1, 101,6, 51,5, 11,4, 9,4, 8,6.

35 IR ν<sub>max</sub> (película, cm<sup>-1</sup>): 1.767, 1.718, 1.639, 1.317, 1.154, 979.

HRMS (ESI, modo positivo): m/z = 253,1076 [M+H]<sup>+</sup>, calculado para el C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O<sub>5</sub> = 253,1031.

## 11/ Compuesto (IIIc)

El compuesto que responde a la fórmula (IIIc), la (E)-3,4-dimetil-5-((2-metilbuta-1,3-dien-1-il)oxi)furan-2(5H)-ona:



se sintetiza a partir del compuesto (IIIa) anterior, según el esquema de reacción siguiente.

- 5 Se disuelve bromuro de metil-trifenilfosfonio (1,25 g, 3,5 mmoles) en THF seco (4 mL) y se enfría a  $-50^{\circ}\text{C}$ . Se añade gota a gota butil-litio (2,25 mL, 3,6 mmoles, 1,6M en hexano) y la mezcla resultante se calienta hasta  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 45 minutos y se enfría a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Se añade gota a gota una disolución de (IIIa) (400 mg, 2,04 mmoles) en THF (4 mL) y la mezcla se agita durante 2 horas 30 minutos a  $-50^{\circ}\text{C}$ . A continuación, la mezcla de reacción se deja calentar hasta  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de verterla en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y de tampón de fosfato (pH 7) (v/v, 1/1). La mezcla se extrae 3 veces con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , las fases orgánicas juntas se lavan con agua, se secan a presión reducida y el residuo resultante se purifica por cromatografía sobre columna de gel de sílice con un gradiente lineal de EtOAc (0-50%) en heptano como fase móvil, para obtener el dieno buscado (IIIc) en forma de un aceite amarillo pálido (150 mg, 773  $\mu\text{moles}$ , rendimiento = 38%).

15 RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6,34 (s, 1H), 6,69 (s, 1H), 6,22 (dd,  $J = 17,2, 10,7$  Hz, 1H), 5,77 (s, 1H), 5,08 (d,  $J = 17,2$  Hz, 1H), 4,94 (d,  $J = 10,7$  Hz, 1H), 1,98 (s, 3H), 1,85 (s, 3H), 1,71 (s, 3H).

RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 171,6, 154,2, 142,4, 135,5, 127,4, 119,2, 111,0, 101,8, 11,4, 9,04, 8,4.

IR  $\nu_{\text{max}}$  (película,  $\text{cm}^{-1}$ ): 1.766, 1.150, 960.

HRMS (ESI, modo positivo):  $m/z = 195,1020$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calculado para el  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_3 = 195,1021$ .

## 12/ Compuesto comparativo 1 – GR24

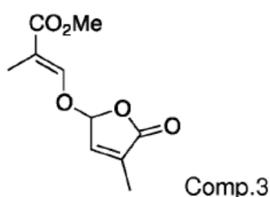
- 20 El GR24 ha sido preparado según el método conocido por sí mismo descrito en Mangnus *et al.*, 1992.

## 13/ Compuesto comparativo 2 – GR5

El GR5 ha sido sintetizado según el método conocido por sí mismo descrito en Johnson *et al.*, 1981.

## 14/ Compuesto comparativo 3 – Comp. 3

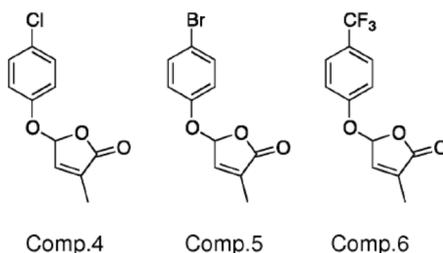
El compuesto comparativo Comp. 3, de fórmula general:



- 25 que se diferencia de los compuestos según la invención, en particular de los compuestos que responden a la fórmula (III) en que  $\text{R}^1$  y  $\text{R}^2$  representan ambos un átomo de hidrógeno, se prepara según el protocolo descrito en el documento de patente WO 2010/137662.

## 15/ Compuestos comparativos 4 a 6 – Comp. 4, Comp. 5, Comp. 6

- 30 Los compuestos comparativos Comp. 4, Comp. 5, Comp. 6 de fórmulas generales respectivas:



que se diferencian de los compuestos según la invención, en particular de los compuestos que responden a la fórmula (II') en que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan ambos un átomo de hidrógeno, se preparan según los protocolos descritos en el documento de patente WO 2012/043813 y en la publicación de Fukui *et al.* (2011).

### Ejemplo 2 – Estudios de estabilidad en medio acuoso

#### 5 1/ Compuesto (IIa)

La estabilidad en medio acuoso del compuesto (IIa) según la invención y la del GR24 como compuesto comparativo han sido evaluados de la forma siguiente.

Cada compuesto ha sido diluido en acetona (1 mL), después 50 µL de cada disolución se han diluido con metanol (175 µL) y agua (750 µL) para obtener una concentración en compuesto de 50 µg/mL.

#### 10 La disolución acuosa así obtenida se ha incubado a 21°C en viales de HPLC.

Se ha añadido indanol (25 µL de una disolución de 1 mg/mL en acetona) a cada disolución para servir de patrón interno.

#### 15 La degradación de cada compuesto en el tiempo se ha seguido mediante el análisis de las muestras retiradas de la disolución a diferentes intervalos de tiempo, por cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC) mediante una columna Acquity HPLC HSS C<sub>18</sub> (1,8 µm, 2,1 x 50 mm), eluida en primer lugar con una disolución de acetonitrilo al 5% en agua que contenía 0,1% de ácido fórmico, durante 0,5 minutos y después con un gradiente de 5% a 100% de acetonitrilo en agua que contenía 0,1% de ácido fórmico durante 6,5 minutos y con 100% de acetonitrilo que contenía 0,1% de ácido fórmico durante 3 minutos. La columna se ha mantenido a una temperatura de 40°C, con un caudal de 0,6 mL/minuto.

#### 20 Los compuestos eluidos de la columna han sido detectados con un detector de matriz de fotodiodos.

La cantidad relativa de compuesto no degradado en la disolución ha sido determinada por comparación con el patrón interno.

Los resultados obtenidos se muestran en la curva de la figura 1 en % de compuesto no degradado en la disolución en función del tiempo de incubación.

#### 25 En ella se observa claramente que el compuesto (IIa) presenta una estabilidad química en disolución acuosa muy elevada, y muy superior a la del GR24.

#### 2/ Compuestos (IIa) y (IIIb)

En un segundo experimento, se ha evaluado la estabilidad en medio acuoso de los compuestos (IIa) y (IIIb) según la invención y la del GR24 como compuesto comparativo según el protocolo descrito anteriormente.

#### 30 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 2 en % de compuesto no degradado en la disolución en función del tiempo de incubación.

Los resultados obtenidos, incluidos en duraciones de incubación más largas en este caso, confirman que el compuesto (IIa) presenta una estabilidad química en disolución acuosa muy elevada y muy superior a la del GR24. La estabilidad en medio acuoso del compuesto (IIIb) es además mejor aún que la del compuesto (IIa).

### 35 Ejemplo 3 – Estudio de la citotoxicidad *in vitro*

La citotoxicidad del compuesto (IIa) según la invención y la del GR24 y del GR5 como compuestos comparativos han sido evaluadas *in vitro* a concentraciones de 10<sup>-4</sup>M y 10<sup>-5</sup>M en células MRC5 en DMSO de la manera siguiente.

#### 40 Se han cultivado células MRC5 (fibroblastos de pulmón humano) en medio Eagle modificado de Dulbecco (DNEM) suplementado con: 25 mM de glucosa, 10% (v/v) de suero de ternera fetal, 100 UI de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycinina y 1,5 µg/mL de fungizona, y se han conservado en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Se han sembrado placas de 96 pozos con 2.100 células MRC5 por pozo en 200 µL de medio. Después de 24 horas, se ha añadido durante 72 horas cada uno de los compuestos disueltos en DMSO, a una concentración final de 10<sup>-4</sup>M o 10<sup>-5</sup>M en un volumen de DMSO fijo. Los controles han recibido un volumen igual de DMSO.

#### 45 El número de células viables se ha medido a 490 nm con el reactivo MTS (Promega) y se ha calculado para cada compuesto la concentración que produce 50% de inhibición del crecimiento celular, IC<sub>50</sub>.

Los resultados en términos de porcentaje de inhibición del crecimiento celular ( $\pm$  error estándar) se muestran en la tabla 1 siguiente.

	Porcentaje de inhibición del crecimiento de células MRC5	
	$10^{-4}$ M	$10^{-5}$ M
GR5	$66 \pm 1$	$0 \pm 2$
GR24	$97 \pm 1$	$0 \pm 11$
(IIa)	$11 \pm 5$	$7 \pm 4$

Tabla 1 – Porcentaje de inhibición del crecimiento de células MRC5 del compuesto según la invención (IIa) y de los compuestos comparativos GR5 y GR24 a las concentraciones de  $10^{-4}$ M y  $10^{-5}$ M.

- 5 Los resultados anteriores muestran claramente que a la concentración  $10^{-4}$ M el compuesto según la invención (IIa) presenta una citotoxicidad netamente menor que la de los compuestos comparativos GR5 y GR24.

#### Ejemplo 4 – Estudio de la actividad biológica sobre la inhibición de la ramificación en guisantes.

- 10 A este efecto se han utilizado mutantes *ramosus* (*rms1*) hiperramificados del guisante (*Pisum sativum* L.), conocidos por presentar un número de ramificaciones muy superior al número de ramificaciones en el guisante salvaje y principalmente en todos los nudos de la planta. De forma general, en el guisante, las dos primeras escamas se consideran los dos primeros nudos, siendo el nudo cotiledonar el nudo 0.

El mutante *rms1* es un mutante de biosíntesis de la señal denominada SMS, que reprime la ramificación de la planta.

Se han realizado ensayos de actividad sobre la inhibición de la ramificación de la forma siguiente.

- 15 Para el ensayo se han usado mutantes de guisante *rms1* (*ccd8*) descritos en Beveridge *et al.* 1997, deficientes en estrigolactonas, (línea celular M3T884 obtenida de la variedad Térèse).

##### 1/ Experimento 1

Se ha evaluado la actividad de los compuestos (IIa), (II'd) y (II'e) según la invención y del compuesto comparativo GR24 para dosis respectivas de 10 nM, 100 nM y 1  $\mu$ M por tratamiento en el nudo 3.

- 20 Para ello se han utilizado disoluciones que contenían cada compuesto de ensayo en 1% de acetona, 4% de polietilenglicol 1450 y 50% de etanol.

Se han sembrado 24 plantas por tratamiento. 8 días después de la siembra se ha realizado el tratamiento sobre la yema axilar en el nudo 3, por aplicación de 10  $\mu$ L de cada disolución de ensayo directamente sobre la yema, por medio de una micropipeta. Se han quitado las excrecencias laterales en los nudos 1 y 2 para favorecer el crecimiento de las yemas axilares en los nudos superiores.

- 25 Se ha medido la iniciación de las yemas axilares en el nudo 3, 8 días después del tratamiento por medio de un pie de rey digital.

Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se ilustran en la figura 3. El testigo sin tratamiento (0 nM) se ha representado igualmente en esta figura.

- 30 En ella se observa que el compuesto (IIa) presenta a las concentraciones mayores una actividad de inhibición del crecimiento de las yemas superior a la del compuesto comparativo GR24. Los compuestos (II'd) y (II'e) presentan igualmente una actividad de inhibición del crecimiento de las yemas en el nudo 3, a la concentración de 1  $\mu$ M.

##### 2/ Experimento 2

- 35 Se ha evaluado la actividad de los compuestos (IIa), (IIb), (IIc), (II'd), (II'e) y (II'f) según la invención para dosis respectivas de 100 nM y 1  $\mu$ M por tratamiento en el nudo 3.

Para ello se han utilizado disoluciones que contenían cada compuesto de ensayo en 1% de acetona, 4% de polietilenglicol 1450 y 50% de etanol.

- 40 Se han sembrado 24 plantas por tratamiento. 8 días después de la siembra se ha realizado el tratamiento sobre la yema axilar en el nudo 3, por aplicación de 10  $\mu$ L de cada disolución de ensayo directamente sobre la yema, por medio de una micropipeta. Se han quitado las excrecencias laterales en los nudos 1 y 2 para favorecer el crecimiento de las yemas axilares en los nudos superiores.

Se ha medido la iniciación de las yemas axilares en el nudo 3, 8 días después del tratamiento por medio de un pie de rey digital.

5 Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se muestran en la figura 4. El testigo sin tratamiento (0 nM) se ha representado igualmente en esta figura.

En ella se observa que el conjunto de compuestos según la invención presenta una actividad de inhibición del crecimiento de las yemas en el nudo 3. Los compuestos que comprende un átomo de azufre en la molécula (compuestos (IIa), (IIb) y (IIc)) han mostrado ser los más activos.

### 3/ Experimento 3

10 Se ha evaluado la actividad de los compuestos (IIa), (IIIa), (IIIb) y (IIIc) según la invención, así como del GR24 como compuesto comparativo, para dosis respectivas de 100 nM y 1 µM por tratamiento en el nudo 3, según el protocolo descrito anteriormente con referencia al experimento 2.

Como control negativo, denominado "CTL 0", se ha ensayado una muestra constituida únicamente por el disolvente y sin compuesto activo.

15 Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se muestran en la figura 5.

Se observa que los compuestos (IIa) y (IIIb) según la invención presentan una actividad similar a la del compuesto comparativo GR24. Los compuestos (IIIa) y (IIIc), aunque ligeramente menos activos, presentan sin embargo una actividad elevada en términos de inhibición del crecimiento de las yemas.

### 20 4/ Experimento 4

En este experimento se ha evaluado la actividad del compuesto (IIIa) según la invención, así como del GR24 como compuesto comparativo, para dosis respectivas de 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM por tratamiento en el nudo 3, según el protocolo descrito anteriormente con referencia al experimento 2, para dosis de 10 nM, 100 nM y 1 µM de los compuestos.

25 Como control negativo se ha ensayado igualmente una muestra constituida únicamente por el disolvente y sin compuesto activo ("CTL 0"). Además, se ha realizado un testigo no tratado ("NT").

Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se muestran en la figura 6.

30 En ella se observa que el compuesto (IIIb) según la invención presenta una actividad superior a la del compuesto comparativo GR24, en particular a las dosis menores.

### 5/ Experimento 5

35 Se ha realizado un ensayo de evaluación dosis-respuesta de la actividad de los compuestos por depósito en el nudo 3 según el protocolo descrito anteriormente con referencia al experimento 2, para el compuesto según la invención (IIa) y para los compuestos comparativos GR24, Comp. 3 y Comp. 4. Se han ensayado concentraciones de 10 nM, 100 nM y 1 µM.

Como control negativo se ha ensayado igualmente una muestra constituida únicamente por el disolvente y sin compuesto activo ("CTL 0"). Además, se ha realizado un testigo no tratado ("NT").

40 Los resultados obtenidos (datos medios de 24 plantas) se muestran en la figura 7. En ella se observa que el compuesto según la invención (IIa) presenta una actividad superior a la de los compuestos comparativos propuestos por la técnica anterior, Comp. 3 y Comp. 4, y esto para todas las dosis ensayadas.

### 6/ Experimento 6

45 Se ha realizado un ensayo de evaluación dosis-respuesta de la actividad de los compuestos por depósito en el nudo 3 según el protocolo descrito anteriormente con referencia al experimento 2, para el compuesto según la invención (IIa) y para los compuestos comparativos GR24, Comp. 5 y Comp. 6. Se han ensayado concentraciones de 10 nM y 100 nM.

Como control negativo se ha ensayado igualmente una muestra constituida únicamente por el disolvente y sin compuesto activo ("CTL 0"). Además, se ha realizado un testigo no tratado ("NT").

Los resultados obtenidos (datos medios de 24 plantas) se muestran en la figura 8. En ella se observa que el compuesto según la invención (IIa) presenta una actividad superior a la de los compuestos comparativos propuestos por la técnica anterior, Comp. 5 y Comp. 6, y esto para todas las dosis ensayadas.

7/ Experimento 7

- 5 Se ha evaluado la actividad del compuesto (IIa) según la invención sobre el crecimiento de las yemas en el nudo 4 para dosis respectivas de 0,1 nM, 1 nM, 10 nM y 100 nM, por tratamiento en el nudo 4. El compuesto GR24 ha sido ensayado con las mismas concentraciones como compuesto comparativo.

Para ello se han utilizado disoluciones que contenían cada compuesto de ensayo en 1% de acetona, 4% de polietilenglicol 1450 y 50% de etanol.

- 10 Se han sembrado 24 plantas por tratamiento. 8 días después de la siembra se ha realizado el tratamiento sobre la yema axilar en el nudo 4, por aplicación de 10 µL de cada disolución de ensayo directamente sobre la yema, por medio de una micropipeta. Se han quitado las excrecencias laterales en los nudos 1 y 2 para favorecer el crecimiento de las yemas axilares en los nudos superiores.

- 15 Se ha medido la iniciación de las yemas axilares en el nudo 4, 8 días después del tratamiento por medio de un pie de rey digital.

Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se muestran en la figura 9. El testigo sin tratamiento (0 nM) se ha representado igualmente en esta figura.

- 20 En ella se observa que el compuesto (IIa) según la invención presenta, después del tratamiento en el nudo 4, una actividad de inhibición del crecimiento de las yemas en el nudo 4 que es equivalente a la del GR24 a las concentraciones mayores y ligeramente mejor a la concentración menor, de 0,1 nM.

8/ Experimento 8

- 25 Se ha evaluado la actividad del compuesto (IIIa) según la invención sobre el crecimiento de las yemas en el nudo 3 para una dosis de 1.000 nM, por tratamiento en el nudo 3. El compuesto GR24 ha sido ensayado a la misma concentración como compuesto comparativo.

Para ello se han utilizado disoluciones que contenían cada compuesto de ensayo en 1% de acetona, 4% de polietilenglicol 1450 y 50% de etanol.

- 30 Se han sembrado 24 plantas por tratamiento. 8 días después de la siembra se ha realizado el tratamiento sobre la yema axilar en el nudo 3, por aplicación de 10 µL de cada disolución de ensayo directamente sobre la yema, por medio de una micropipeta. Se han quitado las excrecencias laterales en los nudos 1 y 2 para favorecer el crecimiento de las yemas axilares en los nudos superiores.

Se ha medido la iniciación de las yemas axilares en el nudo 3, 8 días después del tratamiento, por medio de un pie de rey digital.

- 35 Los resultados, expresados en longitud de la yema/ramificación 8 días después del tratamiento para cada compuesto, para cada concentración ensayada, se muestran en la figura 10. El testigo sin tratamiento (0 nM) se ha representado igualmente en esta figura.

En ella se observa que el compuesto (IIIa) según la invención presenta, después del tratamiento en el nudo 3, una actividad de inhibición del crecimiento de las yemas en el nudo 3 que, aunque inferior a la del GR24, es totalmente importante.

40 **Ejemplo 5 – Ensayo de cultivo hidropónico en guisantes**

Para este ejemplo se utilizaron mutantes *ramosus (rms1)* hiperramificados de guisante (*Pisum sativum L.*)

- 45 Más particularmente, se utilizaron plantas mutantes hiperramificadas *rms1 (ms1-10)*. La disolución nutritiva (100%) ha sido preparada añadiendo en 1.000 L de agua los macronutrientes siguientes: HNO<sub>3</sub> (0,28 L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (120 g), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (40 g), Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (140 g), KNO<sub>3</sub> (550 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> (0,05 g), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (15 g), MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O (2 g), ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1 g), CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O (0,25 g), Sequestrene® (10 g) (disolución de Fe-EDTA). Las semillas de guisantes se han puesto a germinar en arena húmeda durante 6 días y después se han colocado en los orificios de una cubierta (35 orificios/cubierta, 20 mm de diámetro) de una maceta de PVC opaco que contenía la disolución de cultivo hidropónico (47 L, pH 5,8).

- 50 En un primer experimento, se añadieron a la disolución de cultivo hidropónico acetona o el compuesto de ensayo (disuelto en acetona) para obtener una concentración final de 0 ó 1 µM de compuesto de ensayo y 0,01% de acetona.

La disolución de cultivo hidropónico se aireó continuamente por medio de una bomba de acuario y se reemplazó cada semana. 8 días después del inicio del tratamiento, se midieron las longitudes de las yemas/ramificaciones (nudos 1 a 6) con un pie de rey electrónico.

5 Este experimento ha sido realizado para los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb), así como para el compuesto GR24 como compuesto comparativo. Igualmente se ha realizado un testigo negativo ("CTRL 0") correspondiente a un tratamiento con el disolvente solo.

Los resultados (datos medios de 20 plantas) en términos por una parte de la longitud de las ramificaciones en los nudos 3 a 5, y por otra parte la altura de la planta se muestran respectivamente en las figuras 11 y 12.

10 Estos resultados demuestran la actividad de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) sobre el conjunto de las ramificaciones de los nudos 3 a 5. Igualmente se ha puesto en evidencia un efecto significativo sobre la altura de las plantas, comparable entre el compuesto comparativo GR24 y el compuesto según la invención (IIa), y mayor para el compuesto según la invención (IIIb).

15 El mismo experimento se ha realizado para el compuesto según la invención (II'g) y el compuesto comparativo GR24. A la disolución de cultivo hidropónico se le han añadido sulfóxido de dimetilo (DMSO) o el compuesto de ensayo, disuelto en DMSO, para obtener una concentración final de 0 o de 3  $\mu\text{M}$  del compuesto de ensayo y 0,01% de DMSO.

Los resultados (datos medios sobre 10 a 12 plantas) en términos por una parte de la longitud de las ramificaciones en los nudos 3 a 4, y por otra parte de la altura de la planta se muestran respectivamente en las figuras 13 y 14.

20 Estos resultados demuestran para el compuesto según la invención (II'g) una actividad sobre el conjunto de las ramificaciones de los nudos 3 a 4, así como un efecto sobre la altura de las plantas, que son ambos superiores a los del compuesto comparativo GR24.

#### **Ejemplo 6 – Estudio de la toxicidad en guisantes**

25 En este ejemplo se ha evaluado la toxicidad de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y del compuesto comparativo GR24, por depósito en el nudo 3 en plantas mutantes *rms4* hiperramificadas descritas en la publicación de Johnson *et al.* (1997) y que no responden a la acción hormonal de las estrigolactonas (línea M3T-946 obtenida de la variedad Térése.

El protocolo utilizado es conforme al descrito en el ejemplo 4 anterior. Se han ensayado concentraciones de 100 nM y 3  $\mu\text{M}$  de los compuestos. Igualmente se ha ensayado un control negativo constituido por el disolvente solo ("CTL 0").

30 Se ha determinado igualmente el número de yemas muertas a raíz del tratamiento con 3 nM de compuesto después de 8 días de tratamiento (en grupos de 48 plantas).

35 Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15 para la longitud de la yema/ramificación en el nudo 3 y en la figura 16 para el número de yemas muertas después del tratamiento. Estos resultados ponen en evidencia la ausencia de efecto de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) con respecto al control negativo y entre las dos dosis de tratamiento. De la misma manera, no hay ninguna diferencia significativa remarcable sobre el número de yemas muertas a raíz del tratamiento. En particular, el tratamiento para el compuesto (IIIb) no ha acarreado la muerte de ninguna yema.

#### **Ejemplo 7 – Estudio de la actividad germinativa sobre plantas parásitas**

40 En este ejemplo se ha evaluado la actividad germinativa de los compuestos según la invención (IIa) y (IIIb) y del compuesto comparativo GR24 sobre las plantas parásitas: *Orobanche cumana*, *Orobanche minor*, *Striga hermonthica* y *Phelipanche ramosa* (patovar pv T y pv C).

El protocolo del ensayo utilizado es el siguiente.

45 En este estudio se han utilizado dos poblaciones de *Phelipanche ramosa*, patovar (pv) C y T, descritas en la publicación de Benharrat *et al.* (2005). Se han recogido semillas de *Phelipanche ramosa* patovar C en Saint Martin de Faigneau, Francia, en orobancas que parasitan la colza de invierno (*Brassica napus L.*) en 2005 y semillas de *Phelipanche ramosa* patovar T en Sarthe, Francia, en orobancas que se desarrollan en cáñamo (*Cannabis sativa L.*) en 2007.

50 Se han recogido semillas de *Orobanche cumana* Wallr. a partir de orobancas que parasitan el girasol (*Helianthus annuus L.*) en Longeville-sur-mer, Francia, en 2009; se han obtenido semillas de orobanca de trébol (*Orobanche minor Sm.*) a partir del parásito del trébol rojo (*Trifolium pratense L.*) del Prof. K. Yoneyama (Universidad de Utsunomiya, Japón).

Se han recogido semillas de *Striga hermonthica* (Del.) Benth en Gadarif, Sudán del Este, en 1999.

Las semillas se han almacenado en seco en la oscuridad a 25°C.

Los compuestos que se van a estudiar se han puesto en suspensión en acetona a 10 mmol·L<sup>-1</sup> y después se han diluido en agua a 1 mmol·L<sup>-1</sup> (agua/acetona; v/v; 99/1). A continuación se han realizado diluciones de 1x10<sup>-3</sup> mol·L<sup>-1</sup> a 1x10<sup>-15</sup> mol·L<sup>-1</sup> en una mezcla de agua/acetona (v/v; 99/1). Las semillas de las plantas parásitas se han esterilizado en superficie según el protocolo descrito en la publicación de Vieira Dos Santos *et al.* (2003) y después se han vuelto a poner en suspensión en agua estéril (10 g·L<sup>-1</sup>) y se han distribuido en una placa de 96 pozos (a razón de 50 µL, es decir aproximadamente 100 semillas por pozo). Después de preacondicionamiento (7 días, 21°C, en oscuridad, placa cerrada herméticamente excepto para las semillas de *S. hermonthica* que se han preacondicionado a 30°C), se han añadido los compuestos de estudio y los volúmenes se han ajustado a 100 µL con agua (agua/acetona; v/v; 999/1).

En una placa, se ha aplicado un intervalo de concentraciones de 10<sup>-13</sup> mol·L<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> mol·L<sup>-1</sup> para GR24 y (IIa) y de 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-5</sup> mol·L<sup>-1</sup> para (IIIb). Se han realizado controles con una mezcla de agua/acetona (v/v; 999/1) y sin semillas.

Se han incubado las placas para permitir la germinación (21°C, en la oscuridad, o 30°C para *Striga hermonthica*). Después de 4 días, se contaron las semillas que habían germinado con un microscopio estereó (SZX10, Olympus). Se ha considerado que las semillas habían germinado cuando la radícula sobrepasaba el tegumento de la semilla. Cada ensayo de germinación ha sido repetido al menos 3 veces. Para cada compuesto ensayado, se han modelizado las curvas de dosis-respuesta ( $g = f(c)$ , donde g es el porcentaje de germinación y c la concentración (mol·L<sup>-1</sup>)) y la EC<sub>50</sub> (concentración eficaz mediana) a partir de una curva logística de 4 parámetros calculada con SigmaPlot® 10.0.

Para cada uno de los 3 compuestos ensayados, la concentración EC<sub>50</sub> para cada parásito así obtenido se muestra en la figura 17. En ella se observa que los compuestos según la invención presentan una actividad muy pequeña y muy inferior a la del GR24, sobre la germinación de las semillas de las plantas parásitas y esto para los 4 parásitos estudiados.

Se han determinado los porcentajes de germinación máxima inducida por los compuestos ensayados para cada planta parásita. Estos porcentajes se dan en la tabla 2 siguiente.

	GR24	(IIa)	(IIIb)
<i>Phelipanche ramosa pv C</i>	89 ± 6%	27 ± 4%	no
<i>Phelipanche ramosa pv T</i>	87 ± 7%	72 ± 2%	88 ± 6%
<i>Striga hermonthica</i>	57 ± 5%	no	no
<i>Orobanche minor</i>	81 ± 5%	no	60 ± 6%
<i>Orobanche cumana</i>	78 ± 5%	no	no

no: sin germinación significativa con respecto al control negativo (< 2%)

Tabla 2: Porcentaje de germinación máxima inducida por los compuestos para diferentes plantas parásitas.

Los compuestos según la invención presentan ventajosamente una actividad sobre la germinación de las plantas parásitas mucho menor que el compuesto comparativo propuesto por la técnica anterior, GR24.

El conjunto de los resultados anteriores demuestra que los compuestos según la invención, y principalmente los compuestos que responden a las fórmulas (IIa) y (IIIb), presentan una actividad biológica para el control de la ramificación que es comparable a las de las estrigolactonas naturales y a los análogos sintéticos de la técnica anterior GR24 y GR5, siendo a la vez mucho más fáciles de preparar que estos análogos sintéticos y presentando una citotoxicidad menor. Estos compuestos según la invención permiten además dissociar la actividad sobre la ramificación y sobre la germinación de la orobanque y de *Striga hermonthica*.

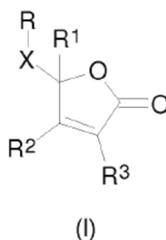
La descripción anterior muestra claramente que por sus diferentes características y sus ventajas, la presente invención alcanza los objetivos que estaban previstos. En particular, proporciona compuestos sencillos de sintetizar y que presentan una actividad biológica importante de inhibición de la ramificación en plantas superiores, aunque el tratamiento de dichas plantas por estos compuestos permite controlar su crecimiento y su estructura de forma totalmente óptima, por medio además de cantidades pequeñas del compuesto, con el fin de mejorar el rendimiento de los cultivos.

**Referencias bibliográficas**

- Benharrat *et al.* (2005) Virulence diversity among branched broomrape (*o-ramosa* l.) populations in France. *Agron. Sustainable Dev* 25 (1): 123-128.
- 5 Beveridge *et al.* (1997) The rms1 mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiol.* 115: 1.251-1.258.
- Canevet *et al.* (1978) Friedel-Crafts Reaction of Aromatic Derivatives with 1,4-Dicarbonyl-2,3-Ethylenic Compounds .2. Alkylations by Some 5-Hydroxy or 5-Chloro-2,5-Dihydro-2-Furannones - New Method for Synthesis of 1h-Indene-1-Carboxylic Acids. *Tetrahedron* 34: 1.935-1.942.
- 10 Dos Santos *et al.* (2003) Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobancha ramosa*. *Phytopathology* 93: 451-457.
- Fukui *et al.* (2011) New branching inhibitors and their potential as strigolactone mimics in rice. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21: 4.905-4.908.
- Johnson *et al.* (1981) The Preparation of Synthetic Analogs of Strigol. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*: 1.734-1.743.
- 15 Johnson *et al.* (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* 142: 1.014-1.026,
- Mangnus *et al.* (1992) Improved Synthesis of Strigol Analog GR24 and Evaluation of the Biological-Activity of Its Diastereomers. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1.230-1.235.
- 20 Nair *et al.* (1981) Degenerative chemistry of malondialdehyde – structure, stereochemistry, and kinetics of formation of enaminals from reaction with amino-acids. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 3.030-3.036.
- Timonen *et al.* (2011) Synthesis and anti-inflammatory effects of a series of novel 7-hydroxycoumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 46: 3.845-3.850.

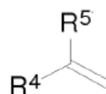
## REIVINDICACIONES

1.- Compuesto de fórmula general (I):



en la que:

- 5 X representa un átomo de oxígeno, un átomo de azufre, NH o un radical N-alquilo,  
 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,  
 10 R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no representan ninguno de los dos un átomo de hidrógeno,  
 R<sup>3</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,  
 15 y R representa un radical fenilo monosustituido con un sustituyente Y elegido entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>, o un radical fenilo disustituido con un sustituyente Y y un sustituyente Z, eligiéndose Y y Z, idénticos o diferentes, cada uno entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>, o formando juntos un ciclo saturado o insaturado o aromático, que contiene, en su caso, uno o varios heteroátomos, y eventualmente sustituido,  
 o R representa un radical:



- 20 en el que R<sup>4</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, y R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, en su caso sustituido, un grupo COR<sup>6</sup> o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, en los que R<sup>6</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado.  
 25

2.- Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que R<sup>3</sup> representa un radical alquilo lineal de C1-C10, preferentemente un radical metilo.

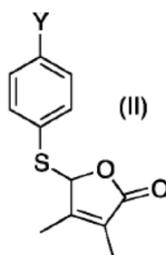
3.- Compuesto según una de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno o un radical alquilo lineal o ramificado de C1-C10.

30 4.- Compuesto según la reivindicación 3, caracterizado por que R<sup>1</sup> representa un átomo de hidrógeno y R<sup>2</sup> representa un radical alquilo lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente un radical metilo.

5.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que X representa un átomo de azufre o X representa un átomo de oxígeno.

35 6.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que R representa un radical fenilo sustituido al menos en posición para-.

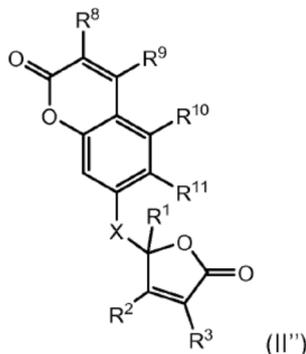
7.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, de fórmula general (II):



en la que Y se elige entre Cl, Br, I y CF<sub>3</sub>.

8.- Compuesto según la reivindicación 7, en el que Y es un átomo de cloro.

9.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, de fórmula general (II'')



5 en la que:

X representa un átomo de oxígeno, de azufre, NH o un radical N-alquilo,

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,

10

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> no representan ninguno de los dos un átomo de hidrógeno,

R<sup>3</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, de C1-C10,

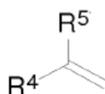
15

R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup>, idénticos o diferentes, representan cada uno un átomo de hidrógeno, Cl, Br, I, CF<sub>3</sub>, CHO, CN, NO<sub>2</sub>, un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, en su caso sustituido, o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>12</sup>, en el que R<sup>12</sup> representa un átomo de hidrógeno o un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, saturado o insaturado, preferentemente de C1-C10.

10.- Compuesto según la reivindicación 9, de fórmula general (II'') en la que R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>, R<sup>10</sup> y R<sup>11</sup> representan cada uno un átomo de hidrógeno.

20

11.- Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que R representa un radical:



25

en el que R<sup>4</sup> representa un radical alquilo o un radical alqueno lineales o ramificados de C1-C15,

y R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5, en su caso sustituido, un grupo COR<sup>6</sup> o un grupo CO<sub>2</sub>R<sup>6</sup>, en los que R<sup>6</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5.

12.- Compuesto según la reivindicación 11, en el que R<sup>5</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado, preferentemente insaturado, de C1-C10, preferentemente de C1-C5, sustituido, preferentemente en su extremo libre, con un grupo electroattractor elegido preferentemente entre: CHO, CN, NO<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>R<sup>7</sup>, en el que R<sup>7</sup> representa un radical hidrocarbonado lineal o ramificado de C1-C10, preferentemente de C1-C5.

30

13.- Composición para el tratamiento de las plantas superiores, que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14.- Composición según la reivindicación 13, caracterizada por que la concentración de dicho compuesto está comprendida entre 0,1 y 1.000 nM, preferentemente entre 1 y 100 nM.

35

15.- Utilización de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para el tratamiento de una planta superior con el fin de controlar el crecimiento y la estructura de dicha planta.

16.- Utilización según la reivindicación 15, caracterizada por que se pone en contacto la planta con una cantidad adaptada de dicho compuesto de forma que se inhiba la formación de al menos una ramificación.

40

- 17.- Utilización según la reivindicación 16, caracterizada por que se aplica una composición que comprende dicho compuesto sobre una porción al menos parcial de la parte aérea de la planta.
- 18.- Utilización según una de las reivindicaciones 16 a 17, caracterizada por que se aplica una composición que comprende dicho compuesto sobre yemas axilares de la planta.
- 5 19.- Utilización según la reivindicación 16, caracterizada por que se inyecta una composición que comprende dicho compuesto en una parte aérea de dicha planta.
- 20.- Utilización según la reivindicación 16, caracterizada por que se aporta una composición que comprende dicho compuesto por al menos una raíz de dicha planta.
- 10 21.- Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 20, caracterizada por que la concentración de dicho compuesto en dicha composición está comprendida entre 0,1 y 1.000 nM, preferentemente entre 1 y 100 nM.

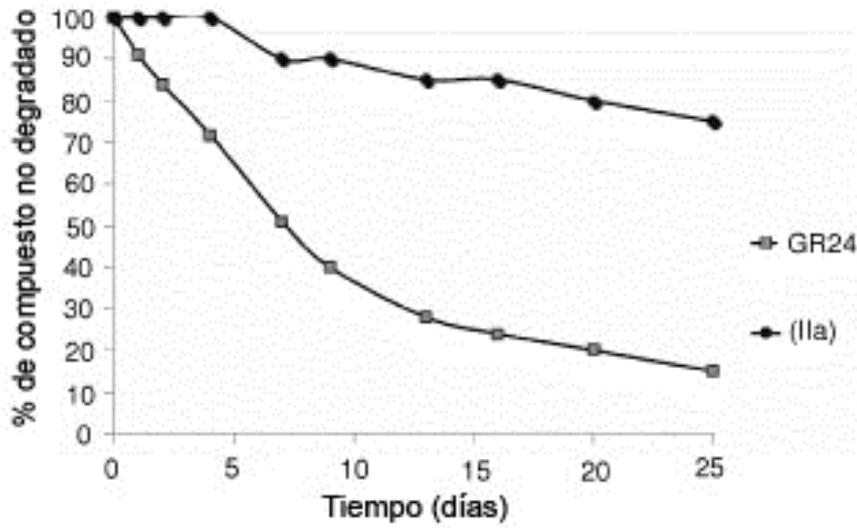


FIG. 1

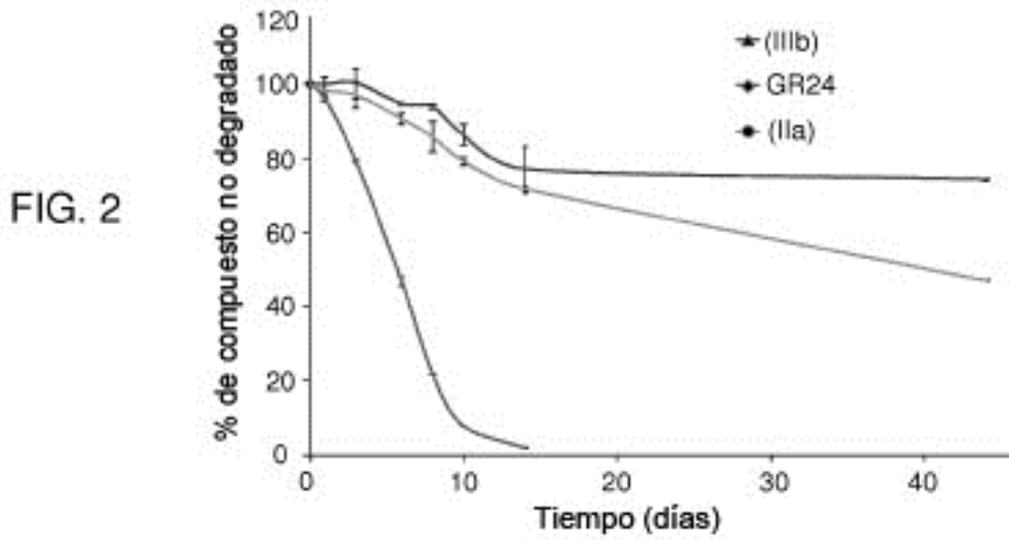


FIG. 2

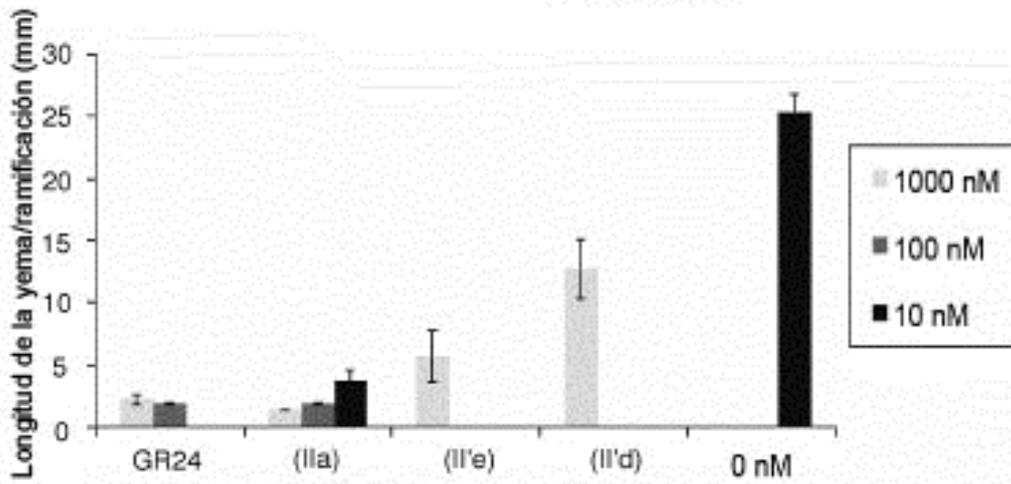


FIG. 3

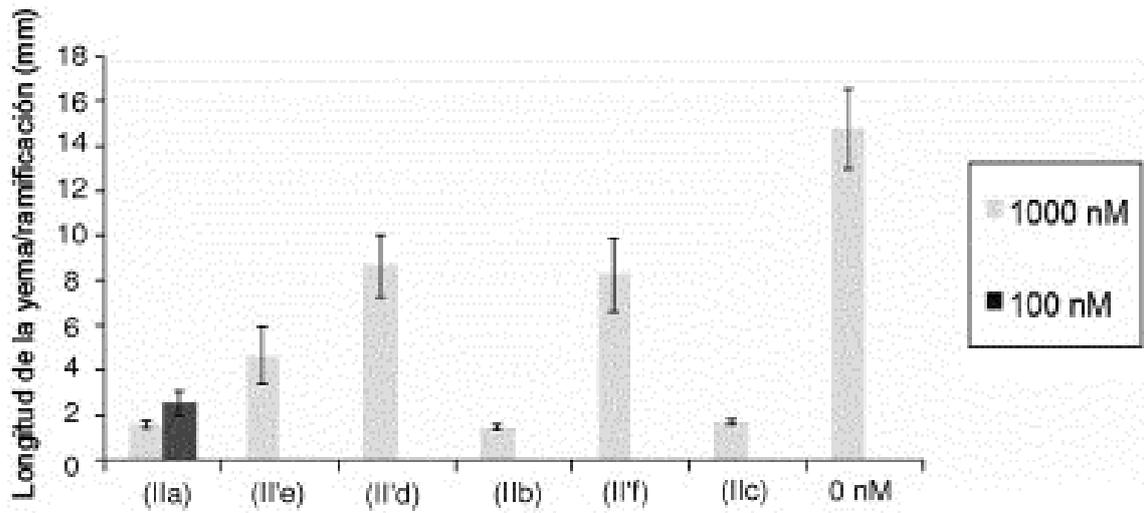


FIG. 4

FIG. 5

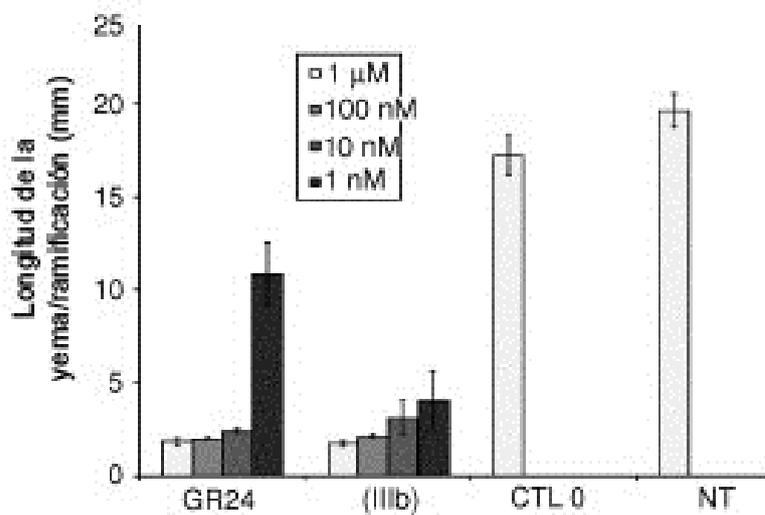
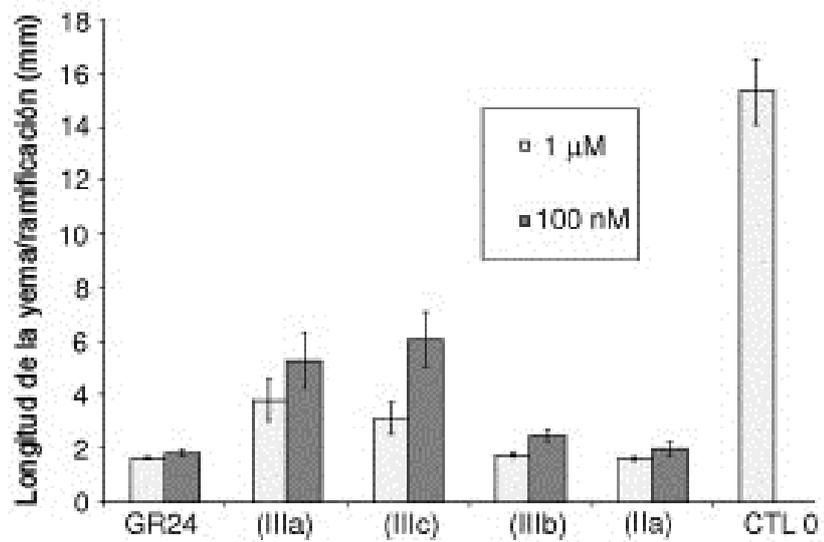


FIG. 6

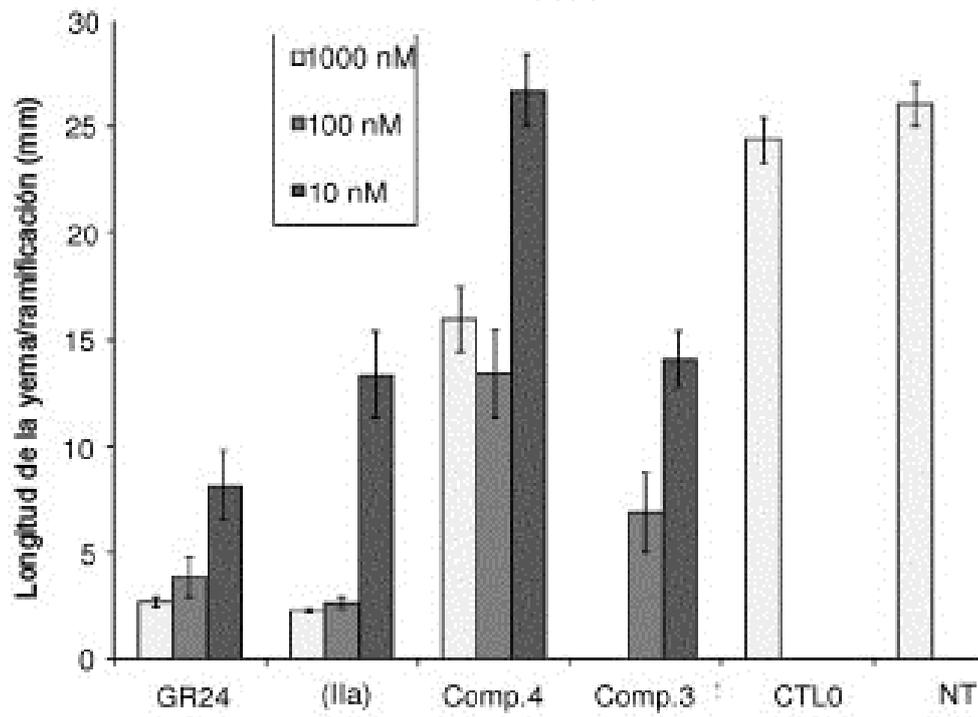


FIG. 7

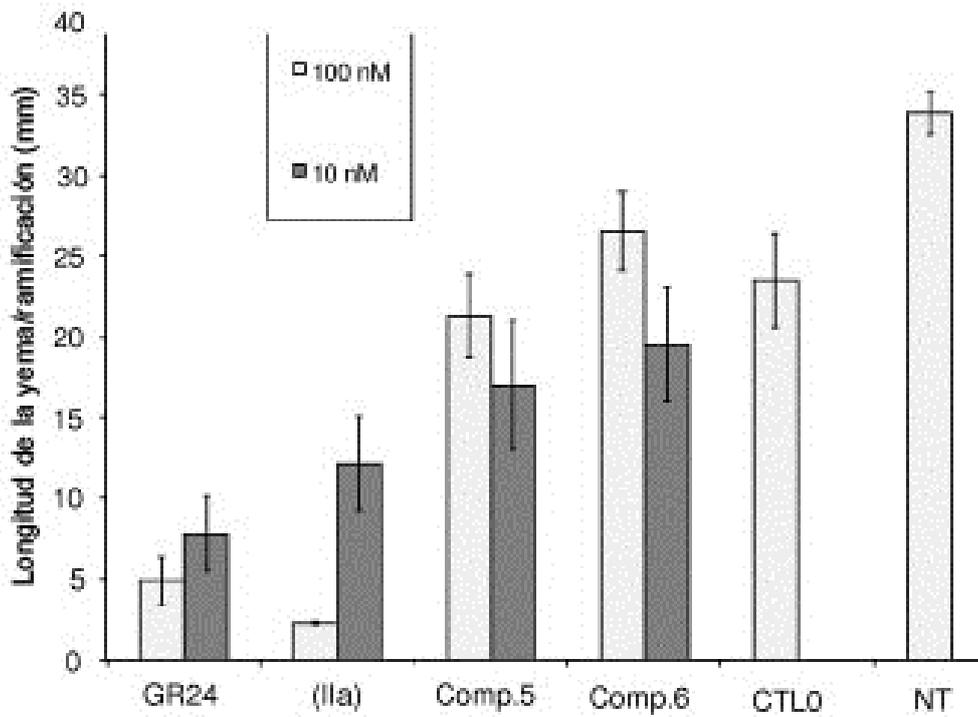


FIG. 8

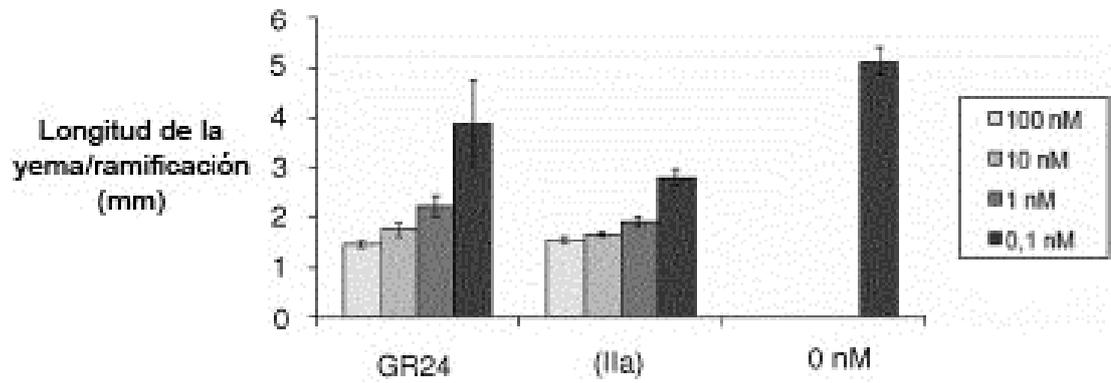


FIG. 9

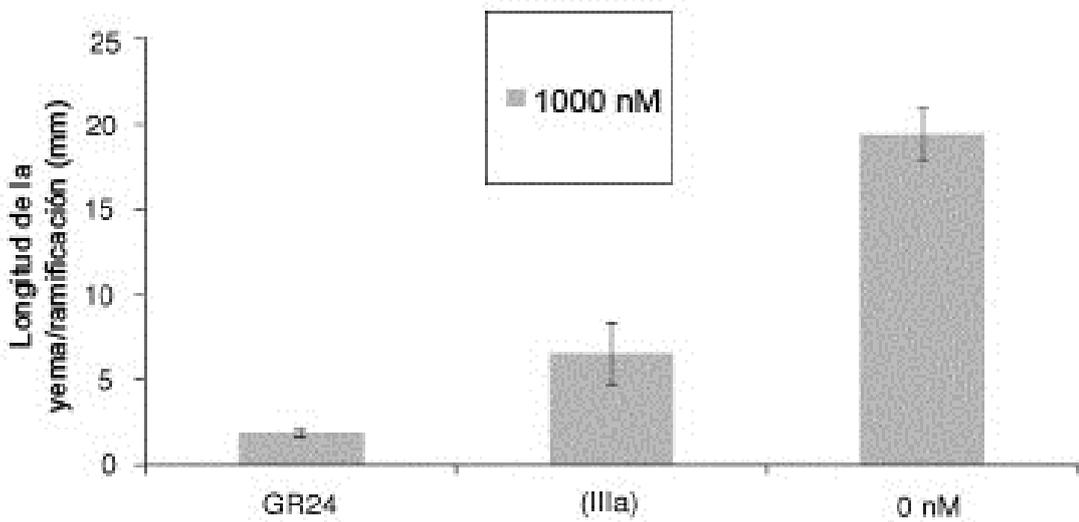


FIG. 10

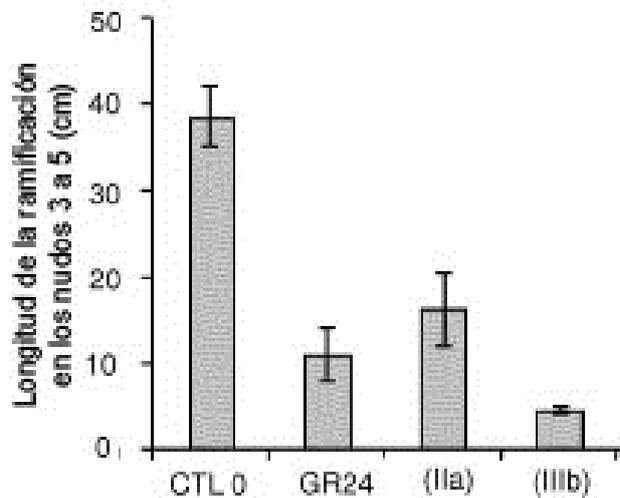


FIG. 11

FIG. 12

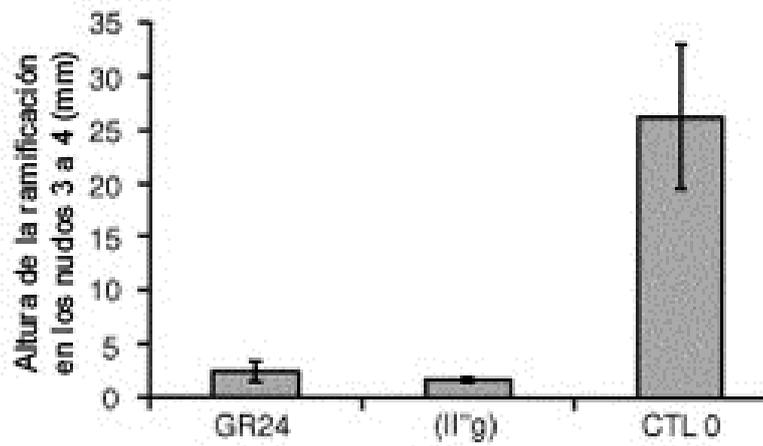
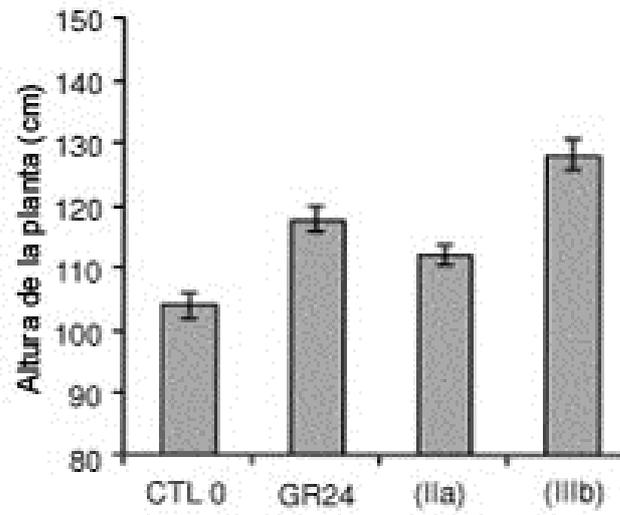
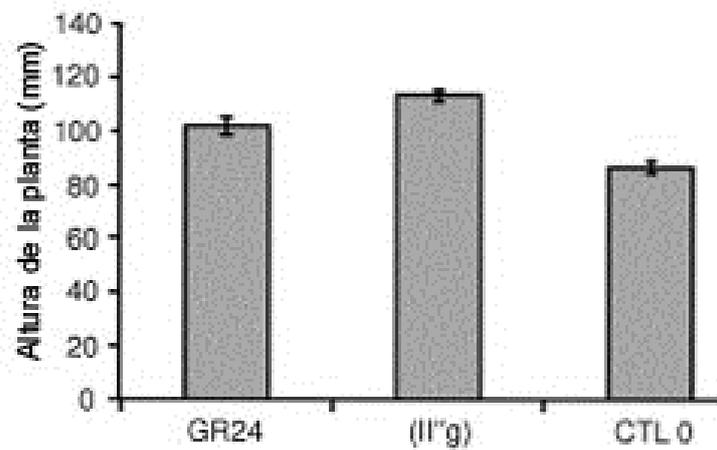


FIG. 13

FIG. 14



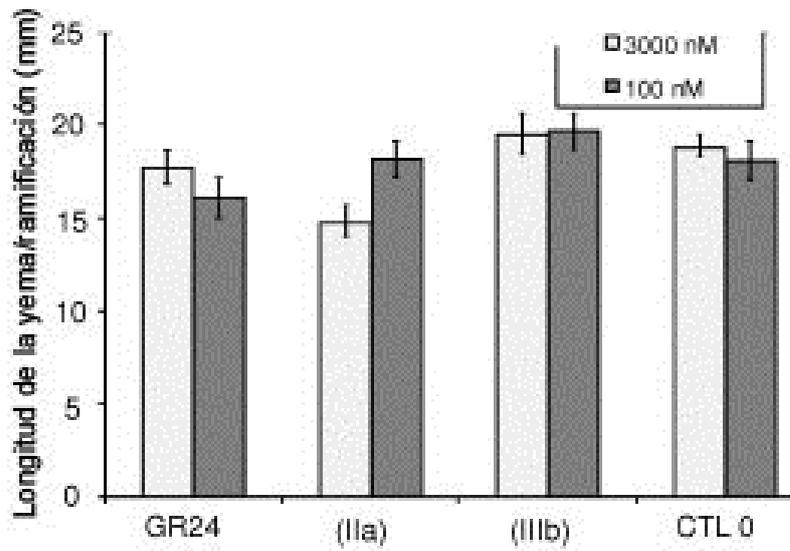


FIG. 15

FIG. 16

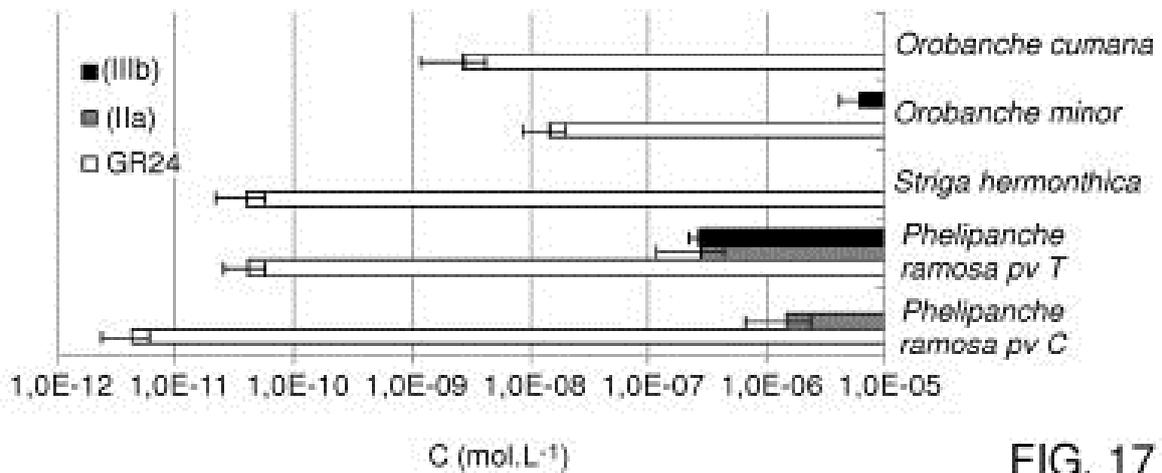
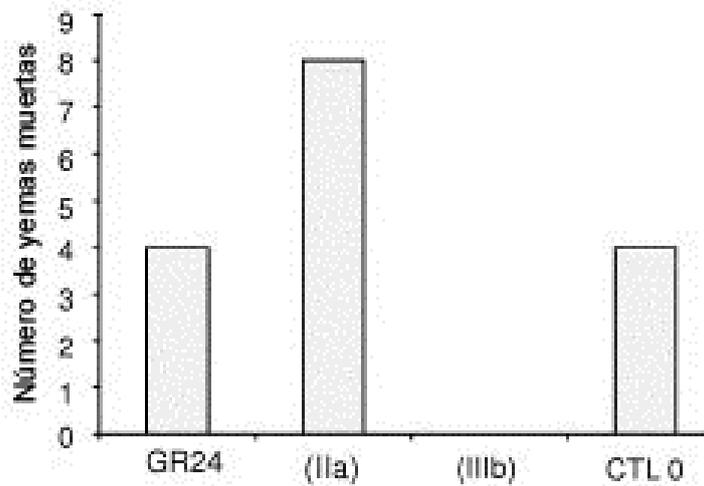


FIG. 17