

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 781**

51 Int. Cl.:

**C07D 207/333** (2006.01)

**A61K 31/40** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2013 PCT/EP2013/071445**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2013 E 13779187 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2016 EP 2909171**

54 Título: **Compuestos 3,4-bis(catecol)pirrol-N-sustituidos, su preparación y su utilización en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**16.10.2012 FR 1259868**

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

**17.04.2017**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (100.0%)  
3, rue Michel-Ange  
75016 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**COLLIN, PASCAL;  
EGOROV, MAXIM;  
DELPECH, BERNARD;  
BAKALA, JOANNA;  
ACHAB, MARIA;  
BIGNON, JÉRÔME;  
THOISON, ODILE y  
BENECHIE, MICHEL**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 608 781 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**

Compuestos 3,4-bis(catecol)pirrol-N-sustituídos, su preparación y su utilización en el tratamiento del cáncer.

5 La presente invención se refiere a nuevos compuestos 3,4-bis(catecol)pirrol-N-sustituídos, a sus preparación y utilización en el tratamiento del cáncer.

10 Las células tumorales tienen su origen en unas modificaciones cromosómicas innatas o adquiridas que son resultado de translocación, amplificación génica, inserción retroviral, mutación, delección genética, así como trastornos epigenéticos. Estas anomalías afectan numerosos genes implicados en el control del ciclo celular, de la apoptosis, del crecimiento y de la supervivencia, así como los genes de reparación, estabilización del ADN y de la desintoxicación.

15 La gran mayoría de la quimioterapia anticancerosa tradicional se basa principalmente en la utilización de fármacos cuyo modo de acción pasa por el bloqueo de la multiplicación celular, bien en fase S del ciclo celular atacando al ADN de la célula o en fase G2/M, atacando a los microtúbulos del huso mitótico necesario para la división celular. Otros agentes anticancerosos tienen como objetivo provocar una muerte celular programada por apoptosis, induciendo un estrés oxidativo. El inconveniente de estos enfoques es la relativa no especificidad de los medicamentos que no pueden salvar las células sanas. De ello se desprenden unos efectos secundarios múltiples. Más recientemente, se han desarrollado nuevos ejes terapéuticos que no utilizan una acción citotóxica, como medio de curación, sino más bien la utilización de un freno para ralentizar o parar el desarrollo tumoral. Esta quimioterapia diana tiene como objetivo los mecanismos íntimos de la proliferación celular, bloqueando la multiplicación de las células, por inhibición de las vías de transmisión de las señales de factores de crecimiento, o por inhibición de la angiogénesis.

25 Sin embargo, con estos nuevos tratamientos anticancerosos diana, han aparecido nuevas quimiorresistencias. Difieren de los mecanismos conocidos de quimiorresistencia relacionados principalmente con la expresión de sistema membranario de expulsión de fármacos: proteína ABC (ATP-Binding Cassette) que pertenece al sistema MDR1 (Multi Drug Resistance-1). En este caso, las células cancerosas desarrollan una quimiorresistencia estimulando la vía de supervivencia, asociada a la inhibición de las vías proapoptóticas. Esta vía de supervivencia se activa por los receptores de actividad tirosinocinasa (EGFR, PDGFR, IGFR), ellos mismos activados por los factores de crecimiento. Está constituida por las proteínas PI3K (Fosfatidil inositol 3 OH cinasa), PDK (fosfoinositido dependiente de tirosina cinasa), Akt (serina/treonina proteína cinasa PKB), PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), FOXO (forkhead box O), mTOR (mammalian target of rapamycin), asociadas a los oncógenos Src y Ras. De manera general, la vía de supervivencia tiene un efecto protector contra la apoptosis y puede inducir a la autofagia.

40 La relación entre la vía de supervivencia y la cancerogénesis está ahora bien establecida. En efecto, unas mutaciones en los genes que codifican la vía de supervivencia están presentes en más del 30% de los cánceres, incluyendo el 70% cánceres de mama: mutación activadora de los genes PIK3CA, PIK3CB, AKT1, AKT2, pérdida de función de PTEN y sobreexpresión de los oncógenos src y Ras, que regulan esta vía.

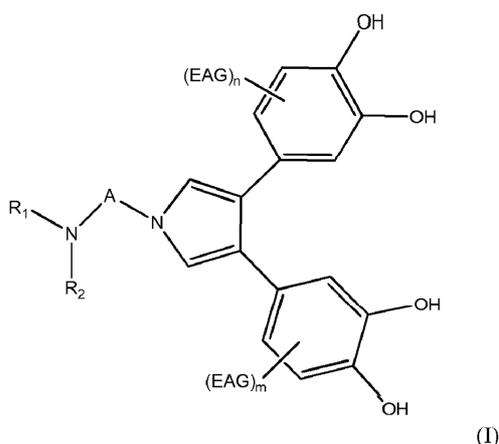
45 Así, desde hace algunos años, se han desarrollado unos compuestos inhibidores de esta vía de supervivencia para luchar eficazmente contra las células cancerosas que, en asociación con otros fármacos, bloquean la transmisión de las señales de los factores de crecimiento.

50 Los ensayos clínicos recientes han revelado que la inhibición de la vía de supervivencia bloqueaba la tumorigénesis. Así, la utilización de inhibidor de la vía de supervivencia como tratamiento anticanceroso se puede considerar como una nueva arma contra el cáncer.

55 Uno de los principales objetivos de la farmacología de los medicamentos anticancerosos es por lo tanto la búsqueda permanente de nuevos fármacos susceptibles de manifestar una mejor eficacia terapéutica, a través de las dianas moleculares específicas, asociada a la ausencia de quimiorresistencia así como a la ausencia de toxicidad sobre las células sanas.

Estos criterios fundamentales han sido adoptados para la selección de un nuevo medicamento antitumoral.

60 La presente invención se refiere a los nuevos compuestos 3,4-bis(catecol)pirrol-N-sustituídos de la fórmula general (I) siguiente, para su preparación, así como para su acción antimitótica y para su modo de acción frente a células cancerosas.

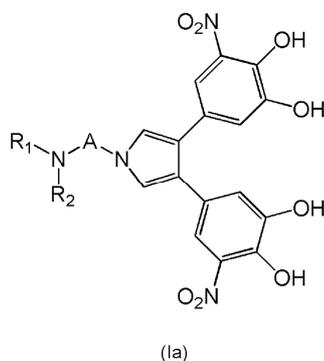


en la que:

- 5 - m es un número entero de 0 a 3, preferentemente de 0 a 2;
- n es un número entero de 0 a 3, preferentemente de 0 a 2;
- 10 - m + n ≥ 1
- EAG representa un grupo electroatrayente seleccionado independientemente entre un átomo de halógeno, un grupo NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CN, CO<sub>2</sub>H, (C=O)NR<sub>2</sub>, CH=NR, (C=S)OR, (C=O)SR, CS<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>R, SO<sub>2</sub>NR<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub>R, P(O)(OR)<sub>2</sub>, P(O)(R)<sub>2</sub>, B(OR)<sub>2</sub>, en los que R es un radical alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), un grupo fenilo o un átomo de hidrógeno;
- 15 - A representa una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada, que comprende de 1 a 10 átomos de carbono; y
- 20 - R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> representan cada uno, independientemente el uno del otro, un átomo de hidrógeno, un grupo CO-alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), fenilo o fenil-alquilo-(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), o R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman, juntos con el átomo de nitrógeno que los llevan, un heterociclo de 5 a 15 cadenas, eventualmente sustituido por un grupo alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>);

incluyendo sus esteroisómeros y sus mezclas, o una sal de ácido farmacéuticamente aceptable de los mismos.

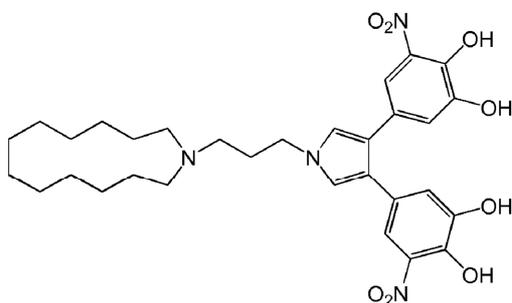
25 La presente invención se refiere en particular al compuesto de fórmula (Ia) así como a su utilización como medicamento para el tratamiento del cáncer.



30 En particular, los radicales R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman, junto con el átomo de nitrógeno que los lleva, un heterociclo saturado y que no comprende otro heteroátomo que el átomo de nitrógeno que lleva R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>. Más particularmente, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman, junto con el átomo de nitrógeno que los lleva, un heterociclo de 10 a 15 miembros, preferentemente de 13 miembros.

35 En particular, la cadena A es una cadena hidrocarbonada lineal saturada que comprende 3 a 6 átomos de carbono, preferentemente 3 átomos de carbono.

La presente invención se refiere en particular al compuesto de fórmula (1) o una sal de ácido farmacéuticamente aceptable de éste



(1)

5 así como a su utilización como medicamento en el tratamiento del cáncer.

Se subrayará que *in vitro*, el compuesto (1) utilizado en las concentraciones que enmarcan su IC50, no manifiesta ninguna citotoxicidad frente a células humanas normales.

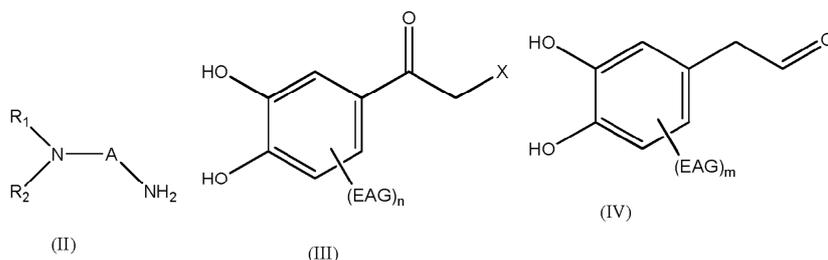
10 En particular, la sal de ácido farmacéuticamente aceptable preferida de la fórmula general (I), más particularmente el compuesto (1a) y preferiblemente el compuesto (1), es un clorhidrato.

15 La presente invención se extiende también a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), más particularmente el compuesto (1a) y preferiblemente el compuesto (1), con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 La presente invención se refiere a la utilización de los compuestos (I), más particularmente (1a) u (1) como medicamento en el tratamiento del cáncer, en particular el cáncer de pulmón, de mama, de hígado, de estómago, de colon, de ano, de esófago, de laringe, de nasofaringe, de páncreas, de próstata, de riñón, de vejiga, de duodeno, de endometrio, de pleura, de piel, de testículos, de ovarios, de útero, de cerebro, de huesos, de boca, de ojos, o los cánceres hematopoyéticos tales como las leucemias, las leucemias mieloides, los linfomas, el cáncer de la médula ósea o también los tumores de origen neuroectodérmico tales como los glioblastomas.

25 La invención se refiere también a un procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I), más particularmente (1a) y (1) que comprende:

30 a) la reacción entre una amina de fórmula (II) siguiente, un halogenuro de fórmula (III) siguiente, y un aldehído de fórmula (IV) siguiente,



35 en las que n y m, EAG, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y A son tales como se definen anteriormente en referencia a la fórmula general (I), y X representa un átomo de halógeno, para proporcionar un compuesto de fórmula (I).

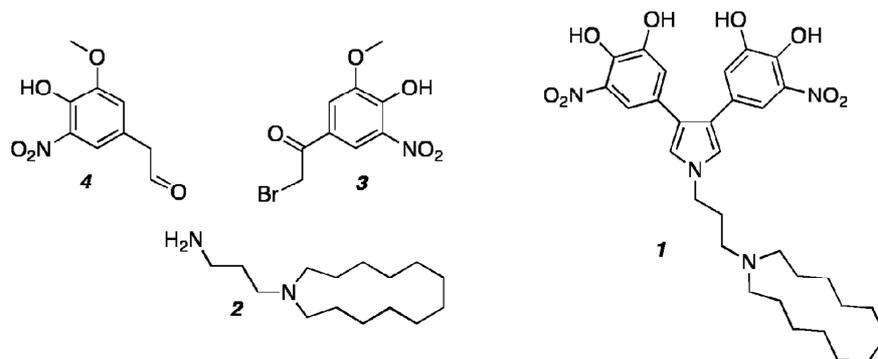
b) eventualmente la formación de una sal farmacéuticamente aceptable a partir del compuesto de fórmula (I) obtenida en la etapa a) anterior.

40 En este procedimiento de preparación, el halogenuro (III) y la amina (II) son en primer lugar puestos a reaccionar juntos antes de añadir el aldehído (IV). Preferentemente, el radical X del halogenuro (III) es un átomo de cloro, de bromo o de yodo.

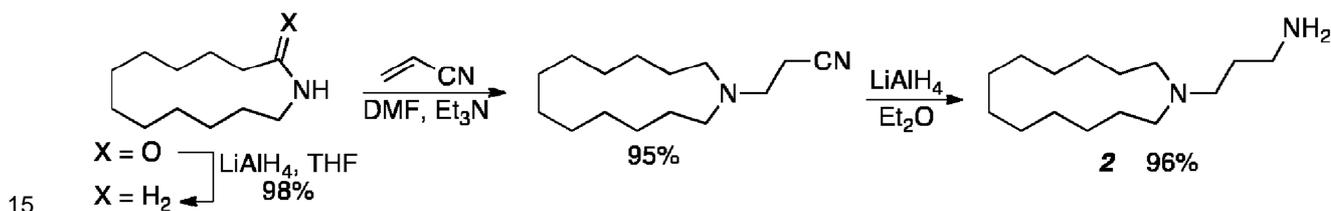
**Resultados**

Síntesis química

- 5 El compuesto 5,5'-(1-(3-(azaciclotridecan-1-il)propil)-1H-pirrol-3,4-diil)bis(3-nitrobenzo-1,2-diol) (1) se ha preparado mediante la condensación del halogenuro de fenacilo 3 con la amina primaria 2 y el fenilacetaldehído 4, representados a continuación:

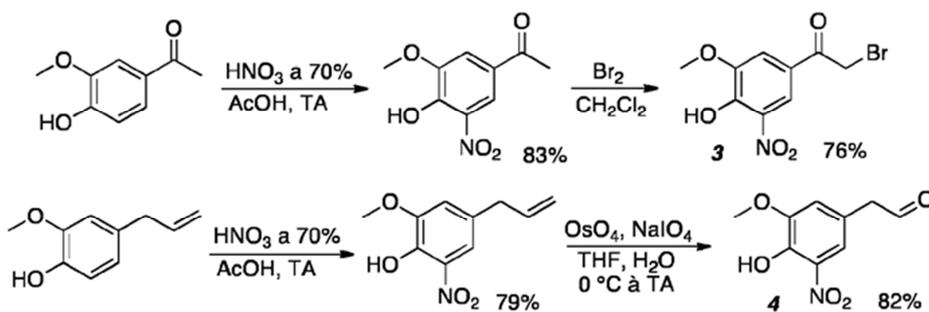


- 10 El N-(3-aminopropil)azaciclotridecano (2) ((a) G. Koren-Goldshlager, Y. Kashman, M. Schleyer, J. Nat. Prod., 1998, 61, 282-284; (b) D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002, 67, 245-258) se ha obtenido a partir del lauro lactamo comercial según el esquema 1 siguiente:



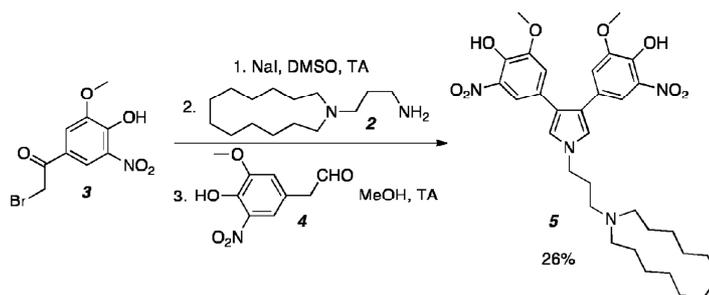
Esquema 1

- 20 Los compuestos 3 (J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zürcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989, 72, 952-968) y 4 se han preparado según el esquema 2 siguiente:



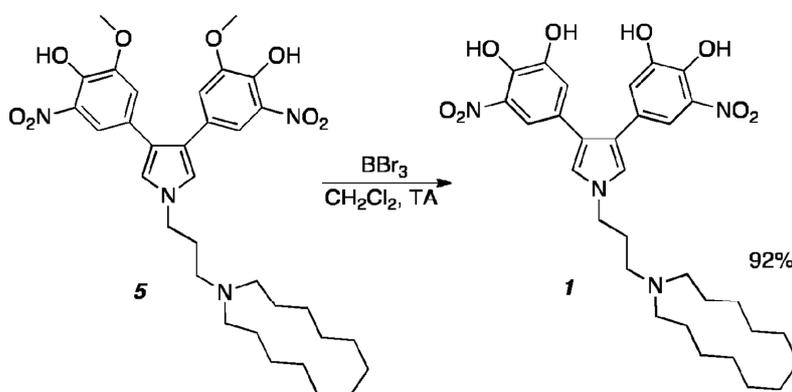
Esquema 2

- 25 Un método de formación monotipo se ha desarrollado para la síntesis del pirrol 5 partiendo de la amina 2, del halogenuro 3 y del fenilacetaldehído 4 (Esquema 3).



Esquema 3

- 5 Mediante el tratamiento del compuesto 5 con una solución de  $\text{BBr}_3$  en el diclorometano, se ha obtenido el producto demetilado (1) (Esquema 4).



Esquema 4

10

Se ha obtenido el clorhidrato correspondiente mediante tratamiento con una solución de HCl en el metanol.

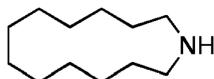
#### Parte experimental

15

#### Preparación de la 3-(azacyclotridecan-1-il)propan-1-amina (2)

Azacyclotridecano ((a) J. E. Baldwin, H. R. Vollmer, V. Lee, Tetrahedron Lett., 1999, 40, 5401-5404; (b) M. H. Weston, K. Nakajima, T. G. Back, J. Org. Chem., 2008, 73, 4630-4637).

20

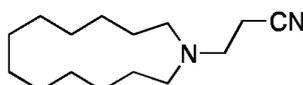


25

A una solución de azacyclotridecan-2-ona (4,3 g; 21,8 mmoles) en el THF (100 ml) a TA bajo argón, se le añade gradualmente  $\text{LiAlH}_4$  (1,5 g; 39,5 mmoles) después la mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 16h. Se añade después una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gradualmente a  $0^\circ\text{C}$  para neutralizar el exceso de  $\text{LiAlH}_4$ , después se añade una mezcla éter/pentano 1:1 (200 ml) y un exceso de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sólido para absorber toda la fase acuosa. La fase orgánica se decanta después y el precipitado se lava tres veces con una mezcla éter/pentano 1:1. El disolvente se elimina bajo presión reducida para proporcionar el azacyclotridecano (3,9 g; 98%) en forma de un aceite incoloro. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 2,62 (4 H; t;  $J = 5,1$  Hz); 1,57-1,25 (20 H; m). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 47,9; 27,9; 26,5; 26,0; 25,4; 24,6.

30

#### 3-(Azacyclotridecan-1-il)propanenitrilo

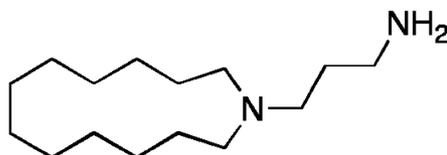


35

A una solución de azacyclotridecano (3,8 g; 20,7 mmoles) y de trietilamina (50  $\mu\text{l}$ ; 0,35 mmoles) en el DMF (15 ml) bajo argón, se le añade el acrilonitrilo (7,7 ml; 115 mmoles) y la mezcla de reacción se agita durante 16h a  $70^\circ\text{C}$ . La

mezcla de reacción se extrae con éter, la fase orgánica se lava con salmuera, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se evapora bajo presión reducida para proporcionar el 3-(azaciclotridecan-1-il)propanonitrilo en forma de aceite incoloro (4,64 g; 95%).  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 2,76 (2 H; t;  $J = 7,2$  Hz); 2,50-2,35 (6 H; m); 1,55-1,28 (20 H; m).  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 53,7; 49,7; 26,5; 26,2; 25,23; 25,18; 15,7.

5 3-(Azaciclotridecan-1-il)propan-1-amina (2) ((a) G. Koren-Goldshlager, Y. Kashman, M. Schleiter, J. Nat. Prod., 1998, 61, 282-284; (b) D. E. Williams, K. S. Craig, B. Patrick, L. M. McHardy, R. van Soest, M. Roberge, R. J. Andersen, J. Org. Chem., 2002, 67, 245-258).

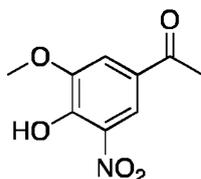


10 A una solución de 3-(azaciclotridecan-1-il)propanonitrilo (0,5 g; 2,1 mmoles) en éter (15 ml) a  $0^\circ\text{C}$  bajo argón, se le añade gradualmente  $\text{LiAlH}_4$  (0,3 g; 7,9 mmoles) y la mezcla de reacción se agita a  $33^\circ\text{C}$  durante 15 min. Se añade después una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  gradualmente a  $0^\circ\text{C}$  para neutralizar el exceso de  $\text{LiAlH}_4$ , después  $\text{K}_2\text{CO}_3$  sólido se añade para absorber toda la fase acuosa. La fase orgánica se decanta y el precipitado se lava tres veces con éter. El disolvente se elimina bajo presión reducida para proporcionar 2 (0,49 g, 96%) en forma de aceite incoloro.  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz)  $\delta$  (ppm) 2,74 (2 H; t;  $J = 7,0$  Hz); 2,40-2,28 (6 H; m); 1,57 (2 H; quint;  $J = 7,0$  Hz); 1,44-1,32 (22 H; m).  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 125 MHz)  $\delta$  (ppm) 54,4; 52,8; 41,2; 31,7; 26,7; 26,5; 26,3; 25,8; 25,6.

20 Preparación de la 2-bromo-1-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)etanona (3)

1-(4-Hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)etanona ((a) L. E. Kiss, H. S. Ferreira, L. Torrão, M. J. Bonifácio, P. N. Palma, P. Soares-da-Silva, D. A. Learnmonth, J. Med. Chem., 2010, 53, 3396-3411; (b) X. Lu, S. Wan, J. Jiang, X. Jiang, W. Yang, P. Yu, L. Xu, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, Y. Wang, Eur. J. Med. Chem., 2011, 46, 2691-2698).

25

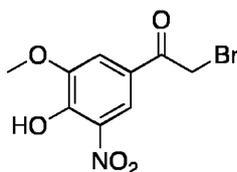


30 A una solución de 4'-hidroxi-3'-metoxiacetofenona (10 g; 60,2 mmoles) en ácido acético (140 ml) a TA, se le añade  $\text{HNO}_3$  a 70% (4,2 ml; 66,3 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 30 min y los cristales amarillos se filtran, se lavan con éter y se secan para proporcionar la 1-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)etanona (10,5 g; 83%), p.f.  $158-159^\circ\text{C}$  (lit.  $159-161^\circ\text{C}$ , etanol, X. Lu, S. Wan, J. Jiang, W. Yang, P. Yu, L. Xu, Z. Zhang, G. Zhang, L. Shan, Y. Wang, Eur. J. Med. Chem., 2011, 46, 2691-2698).  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 11,09 (1 H; s), 8,30 (1 H; d;  $J = 1,5$  Hz); 7,75 (1 H; d;  $J = 1,5$  Hz); 4,01 (3 H; s); 2,62 (3 H; s).  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 194,9; 150,4; 150,1; 133,0; 128,3; 117,7; 115,3; 56,9; 26,0. IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3228; 3091; 2988; 2925; 1676; 1612; 1535; 1413; 1378; 1350; 1329; 1218; 1136; 1047; 869; 735; 709; SMHR (ES) ( $m/z$ ) [M-H]<sup>-</sup> calculado para  $\text{C}_9\text{H}_8\text{NO}_5$  210,0402; encontrado 210,0404.

35

2-Bromo-1-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)etanona (3) (J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zürcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989, 72, 952-968).

40



45 A una solución de 1-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)etanona (9,6 g; 45,5 mmoles) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200 ml) a TA, se le añade gradualmente bromo (2,4 ml; 46,8 mmoles) y la mezcla de reacción se agita durante 10 min. Durante este periodo, el color del bromo desaparece totalmente. Se añade entonces pentano (400 ml). Después de 10 min, los cristales amarillos se filtran bajo una campana, se lavan con una mezcla pentano/éter 1:1, y se secan para proporcionar 3 (10 g; 76%), p.f.  $143-145^\circ\text{C}$  (lit.  $147-149^\circ\text{C}$ ; J. Borgulya, H. Bruderer, K. Bernauer, G. Zürcher, M. Da Prada, Helv. Chim. Acta, 1989, 72, 952-968).  $\text{RMN}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 11,18 (1 H; s), 8,36 (1 H; d;  $J = 1,8$  Hz); 7,77 (1 H; d;  $J = 1,8$  Hz); 4,44 (2 H; s); 4,03 (3 H; s).  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 188,7; 150,7; 150,6; 133,0; 125,0; 118,3; 115,9; 57,0; 29,4. IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3366; 3093; 2991; 2942; 1765; 1689; 1608; 1535; 1386;

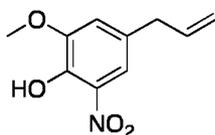
50

1246; 1151; 1060; 912; 887; 850; 762. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[M-H]^-$  calculado para  $C_9H_7BrNO_5$  287,9508; encontrado 287,9480.

Preparación del 2-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)acetaldehído (4)

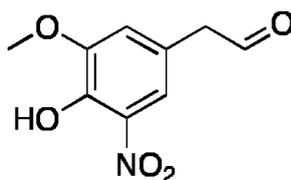
5

4-Alil-2-metoxi-6-nitrofenol (D. E. Lewin, A. Lowy, J. Am. Chem. Soc., 1933, 55, 1995-2000).



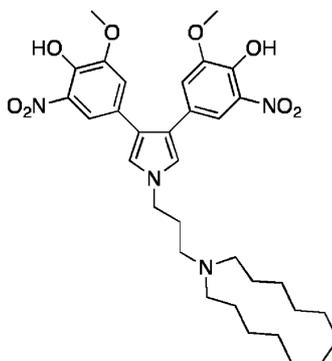
10 A una solución de eugenol (6,76 g; 41,2 mmoles) en ácido acético (100 ml) a TA, se le añade  $HNO_3$  a 70% (2,8 ml; 44,2 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 15 min, se extrae con éter, se lava vigorosamente con salmuera y finalmente con un tampón fosfato (pH = 7). La solución eterada se diluye con el mismo volumen de pentano, se filtra sobre gel de sílice y se evapora bajo presión reducida para proporcionar el 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (6,36 g, 79%) en forma de aceite rojo oscuro. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 10,61 (1 H; sl), 7,48 (1 H; d;  $J = 1,5$  Hz); 6,96 (1 H; d;  $J = 1,5$  Hz); 5,91 (1 H; m); 5,20-5,08 (2 H; m); 3,92 (3 H; s); 3,35 (2 H; d;  $J = 6,6$  Hz).  
 15 RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 149,8; 144,8; 135,9; 133,6; 131,2; 118,6; 117,1; 115,0; 56,7; 39,4. IR (neat)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  3225; 3080; 2976; 2939; 1639; 1539; 1428; 1390; 1326; 1259; 1133; 1061; 916; 763. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[M+Na]^+$  calculado para  $C_{10}H_{11}NNO_4$  232,0586; encontrado 232,0578.

20 2-(4-Hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)acetaldehído (4)



25 A una solución de 4-alil-2-metoxi-6-nitrofenol (2,0 g; 9,6 mmoles) en THF (23 ml) y agua (8 ml) a 0°C, se le añade una solución de tetróxido de osmio 0,166 M (23 mg; 0,09 mmoles) en una mezcla THF/agua 7:5 (0,55 ml). Después de 5 min, se añade  $NaIO_4$  (4,8 g; 22 mmoles). La mezcla de reacción se agita durante 1h a 0°C, se deja volver gradualmente a TA durante 1h, se extrae con una mezcla  $CH_2Cl_2$ /éter 1:1 y la fase orgánica se lava una vez con salmuera, se seca sobre  $Na_2SO_4$ , y se evapora bajo presión reducida a 25°C. El residuo se disuelve en el volumen mínimo de  $CH_2Cl_2$  y se añade una mezcla pentano/éter 1:1. El disolvente se evapora bajo presión reducida a 25°C  
 30 hasta la formación de cristales amarillos; se añade pentano y la solución se concentra otra vez. Los cristales se filtran para proporcionar 4 (1,66 g, 82%), p.f. 130-132°C. RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 10,71 (1 H; s), 9,80 (1 H; t;  $J = 1,8$  Hz); 7,57 (1 H; d;  $J = 1,8$  Hz), 6,97 (1 H; d;  $J = 1,8$  Hz), 3,96 (3 H; s); 3,74 (2 H; d;  $J = 1,8$  Hz). RMN  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 197,8; 150,4; 145,8; 133,8; 123,1; 119,0; 116,6; 56,8; 49,5. IR (neat)  $\nu_{max}$   $cm^{-1}$  3226; 1720; 1583; 1449; 1333; 1264; 1238; 1134; 1064; 921; 764. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[M-H]^-$  calculado para  $C_9H_8NO_5$  210,0402;  
 35 encontrado 210,0399.

5-(1-(3-(Azaciclotridecan-1-il)propil)-4-(4-hidroxi-3-metoxi-5-nitrofenil)-1H-pirrol-3-il)-3-nitrobenzo-1,2-diol (5)

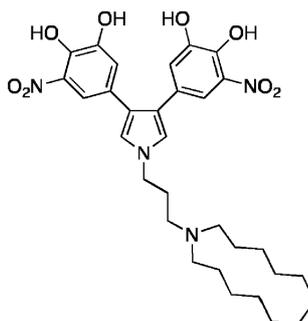


40

El bromuro de fenacilo 3 (1,23 g; 4,2 mmoles) y  $NaI$  (3,2 g; 21 mmoles) se añaden a una solución de la amina 2 (1 g, 4,2 mmoles) en el DMSO (20 ml) a TA bajo argón y la mezcla de reacción se agita durante 15 min a TA. Una solución de aldehído 4 (900 mg, 4,3 mmoles) en metanol (60 ml) se añade después y la mezcla de reacción se agita

durante 16 h a TA. Se extrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y la fase orgánica se lava con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , salmuera, se seca sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se evapora bajo presión reducida y se cromatografía sobre gel de sílice (gradiente de elución de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  80:1) para proporcionar 5 (682 mg, 26%) en forma de un sólido rojo amorfo. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 500 MHz)  $\delta$  (ppm) 7,65 (2 H; d;  $J = 2,0$  Hz); 7,01 (2 H; d;  $J = 2,0$  Hz); 6,87 (2 H; s); 4,05 (2 H; t;  $J = 7,0$  Hz); 3,77 (6 H; s); 2,70-2,43 (6 H; m); 2,15 (2 H; quint;  $J = 7,5$  Hz); 1,66-1,34 (20 H; m). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 149,7; 144,8; 133,9; 126,7; 121,0; 120,7; 118,7; 114,5; 56,8; 53,0; 51,7; 47,7; 27,9; 25,7; 25,6; 25,5; 25,2; 23,9. IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3255; 2930; 2859; 1552; 1522; 1464; 1337; 1240; 1156; 919; 732. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_4\text{O}_8$  625,3237; encontrado 625,3228.

10 5,5'-(1-(3-(Azaciclotridecan-1-il)propil)-1H-pirrol-3,4-diil)bis(3-nitrobenzeno-1,2-diol) (1)



Al compuesto 5 (50 mg; 0,080 mmoles) bajo argón a TA, se le añade  $\text{BBr}_3$  (solución 1 M en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 2 ml; 2 mmoles). La mezcla heterogénea se agita durante 30 min a TA. Se añade una mezcla  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /pentano 1:1 (30 ml) y, después de 5 min, se separa el precipitado, se lava con la misma mezcla de disolventes y se disuelve en el volumen mínimo de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /etanol 10:1. La solución se introduce en una columna de gel de sílice, se eluye con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /etanol 20:1 y se evapora bajo presión reducida para proporcionar 1 en forma de sólido amorfo rojo-naranja (44 mg; 92%). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 7,44 (2 H; d;  $J = 1,8$  Hz); 7,00 (2 H; s); 6,97 (2 H; d;  $J = 1,8$  Hz); 4,12 (2 H; t;  $J = 6,3$  Hz); 3,30-3,12 (6 H; m); 2,32 (2 H; quint;  $J = 6,0$  Hz); 1,85-1,70 (4 H; m); 1,60-1,39 (16 H; m). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 147,5; 141,9; 134,7; 127,0; 121,4; 121,3; 120,5; 113,5; 52,4; 52,0; 46,1; 25,9; 25,3; 24,6; 24,2; 23,9; 21,2. IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3379; 2932; 1621; 1555; 1471; 1300; 1236; 803; 762; 667. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_8$  597,2924; encontrado 597,2938.

25 Clorhidrato 1•HCl

A una solución de 1 en un volumen mínimo de diclorometano, se le añade una solución de HCl 2 M en el metanol (5 eq.) diluido en éter. El precipitado formado se filtra y se seca entonces. P.f. 179-184°C (dec). RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 300 MHz)  $\delta$  (ppm) 7,19 (2 H; d;  $J = 3,0$  Hz); 7,06 (2 H; s); 6,90 (2 H; d;  $J = 3,0$  Hz); 4,00 (2 H; t;  $J = 6,0$  Hz); 3,15-2,97 (6 H; m); 2,24 (2 H; quint;  $J = 6,0$  Hz); 1,75-1,58 (4 H; m); 1,44-1,28 (16 H; m). RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ ; 75 MHz)  $\delta$  (ppm) 148,0; 140,4; 137,7; 126,7; 121,3; 120,5; 120,1; 113,5; 51,9; 51,2; 46,7; 25,9; 25,7; 24,9; 24,7; 24,4; 20,9. IR (neat)  $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$  3111; 2930; 2861; 1552; 1463; 1293; 1233; 1061; 866; 801; 762. SMHR (ES) ( $m/z$ )  $[\text{M}-\text{HCl}-\text{H}]^+$  calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_8$  595,2768; encontrado 595,2773.

35 Estudio biológico *in vitro*

Se ha estudiado la actividad biológica del compuesto (1) *in vitro* sobre 3 líneas celulares cancerosas diferentes:

- HCT-116 (carcinoma colorrectal)
- U87 (glioblastoma)
- K562 (leucemia mieloide)

así como sobre 3 tipos celulares normales no cancerosas:

- HUVEC (células endoteliales umbilicales vasculares humanas).
- NHDF (fibroblastos de dermis humana)
- HFDPC (células papilares dérmicas derivadas de folículos de cabello humano).

Las células seleccionadas para este estudio se han incubado a 37°C en presencia del compuesto (1) añadido en el medio de cultivo a diferentes concentraciones y a diferentes tiempos.

El conjunto de los experimentos realizados ha permitido determinar el grado de toxicidad del compuesto ensayado, estudiar su efecto sobre el desarrollo del ciclo celular así como su capacidad para inducir una respuesta autofágica y una muerte celular por apoptosis. Se ha estudiado su modo de acción para determinar su diana molecular.

#### 5 1. Estudio del efecto del compuesto (1) sobre el crecimiento celular

10 El efecto del compuesto (1) sobre el crecimiento de las células HCT-116, U87 y K562 se ha evaluado con la ayuda de un ensayo de crecimiento celular (CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay, Promega). Las curvas de crecimiento así como los valores de IC50 (concentración del compuesto que induce la disminución del crecimiento celular del 50%) determinadas después de 72h de tratamientos de las células con el compuesto (1) se presentan en la figura 1. Son de 30 nM para las células HCT-116, 45 nM para las células U87 y 70 nM para K562.

15 El efecto del compuesto (1) sobre el crecimiento celular se ha descrito de manera más detallada en la línea celular HCT-116. Este estudio se ha realizado en función de la concentración y del tiempo de exposición de las células a la molécula ensayada (24h, 48h, y 72h) mediante el recuento del número de células vivas después de la exclusión de las células muertas por coloración con azul de tripano.

20 La figura 2 representa el efecto del compuesto (1) sobre el número y la viabilidad de las células HCT 116 en función de su concentración y del tiempo de tratamiento.

25 Los resultados presentados en la figura 2a muestran que el número de células disminuye en función de la concentración y del tiempo de tratamiento con el compuesto (1). El compuesto (1) a la concentración de 25 nM manifiesta ya una actividad a partir de 24 horas de tratamiento, reduciendo el número de células del 40%, yendo hasta más del 80% de inhibición a partir de 48 horas para las concentraciones superiores a IC50. Este efecto inhibidor está no obstante asociado a una ausencia de modificación de la viabilidad celular (figura 2b). Esto indica que la acción del compuesto (1) es citoestático y no citotóxico.

30 Con el fin de determinar la especificidad de acción del compuesto (1) sobre las células cancerosas, se ha evaluado su efecto frente a células normales humanas HUVEC, NHDF y HFDPC y las leyendas de célula cancerosa HCT-116, U87 y K652. Los resultados presentados en la figura 3 muestran que IC50 determinado después de 72h de tratamiento con el compuesto (1) es 2 µM para las células HUVEC, 5 µM para las células NHDF y 10 µM para HFDPC.

35 Los valores de IC50 son así hasta 300 veces más elevados para las células normales con respecto a las que se obtienen para las células cancerosas. Esto indica claramente que las células malignas son significativamente más sensibles a la acción del compuesto (1) con respecto a las células sanas.

#### 40 2. Estudio del efecto del compuesto (1) sobre el ciclo celular

El análisis por citometría de flujo (FC500, Beckman Coulter) de las células HCT-116 tratadas con el compuesto (1) ha mostrado que este compuesto bloquea la división celular en fase G0/G1. Este efecto es significativo después de 24 horas de exposición de las células al compuesto (1) utilizado a las concentraciones de 30 y 50 nM (figura 4).

#### 45 3. Estudio del efecto del compuesto (1) sobre la expresión de las proteínas p21 y p27 implicadas en la parada del ciclo celular

50 A partir de los resultados anteriores que muestran una parada del ciclo en G0/G1, asociada a una disminución del número de células en ausencia de toxicidad, se ha evaluado la expresión de las proteínas p21 y p27 asociadas a la parada del ciclo celular en G0/G1. El gen de la proteína p27 está descrito como siendo regulado por FOXO3, mientras que el de la proteína p21 está controlado por el factor de transcripción p53, estimulado entre otro por el estrés oxidativo. Las células HCT 116 se trataron mediante el compuesto (1) durante 24h. Los extractos celulares se analizaron después por transferencia Western. Los resultados presentados en la figura 5 muestran un aumento de la expresión de la proteína p27 tras un tratamiento con el compuesto (1) a las concentraciones de 25 y 50 nM. El compuesto (1) no tiene ningún efecto significativo sobre la expresión de la proteína p21.

#### 55 4. Estudio del efecto del compuesto (1) sobre la inducción de la apoptosis

60 A fin de confirmar que el compuesto (1) no induce la muerte celular por apoptosis, las células HCT-116 tratadas durante 24h se analizaron para evaluar la actividad de las caspasas 3 y 7 y la modificación del potencial transmembranario mitocondrial.

65 La actividad de las caspasas 3 y 7, enzimas marcadores de la apoptosis, se midió con la ayuda del ensayo Apo-ONE (Promega) después del tratamiento de las células HCT-116 con el compuesto (1) a las concentraciones variantes de 5 nM a 75 nM. Los resultados presentados en la figura 6a muestran la ausencia de variaciones en la actividad de estas enzimas tras el tratamiento con la molécula ensayada.

El estudio del potencial transmembranario mitocondrial,  $\Delta\psi_m$ , se realizó por citometría de flujo, utilizando la sonda JC-1 (MitoProbe™ JC-1 assay, Molecular Probes). JC-1 es un compuesto aniónico lipófilo que penetra selectivamente en la mitocondria, cuyo color cambia del verde al rojo cuando el potencial transmembranario aumenta. Al contrario de las células sanas, las células en apoptosis presentan un bajo  $\Delta\psi_m$  que está asociado a una fuerte coloración verde de la sonda JC-2.

Los resultados presentados en la figura 6b muestran que el tratamiento de las células HCT-116 con el compuesto (1) a las concentraciones variantes de 25 nM a 100 nM no modifica significativamente el  $\Delta\psi_m$ . El conjunto de estos resultados indica que el compuesto (1) no induce la vía apoptótica dependiente de las caspasas (muerte celular programada de tipo I).

#### 5. Estudio de la autofagia

Con el objetivo de saber si la parada del ciclo celular inducido por el compuesto (1) conlleva una reacción autofágica, las células HCT-116 se trataron mediante el compuesto (1) a diferentes dosis durante 24 horas. Los extractos celulares se sometieron después al análisis por transferencia Western a fin de visualizar la expresión de la proteína LC2-II. En efecto, la proteína LC3 existe en la célula o bien en forma citosólica (LC3-I) o bien asociada a los fagosomas (LC3-II). Esta última es el marcador de la reacción autofágica.

Los resultados presentados en la figura 7 muestran claramente un aumento de la expresión de LC3-II en presencia del compuesto (1) utilizado a las concentraciones variantes de 5 nM a 100 nM.

#### 6. Estudio del modo de acción del compuesto (1)

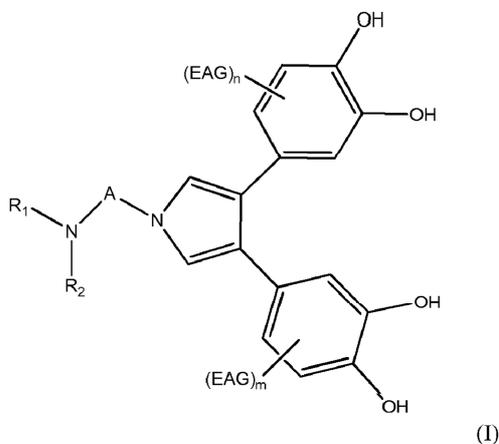
Debido a la parada del ciclo celular en fase G0/G1 asociada a una respuesta autofágica en ausencia de apoptosis tras el tratamiento con el compuesto (1), se ha estudiado la acción de este compuesto sobre la vía de supervivencia que implica PI3 quinasa – Akt – Foxo. Esta vía de señalización se encuentra muy frecuentemente desregulada (por estimulación) en un gran número de células cancerosas y contribuye a su supervivencia.

Los resultados presentados en la figura 8 muestran que el compuesto (1) bloquea esta vía de supervivencia. En efecto, las células HCT-116 se han expuesto durante 24h a la acción del compuesto (1) a las concentraciones que varían de 5 nM a 100 nM. El análisis de los extractos celulares por transferencia Western ha revelado que el compuesto (1) a partir de la concentración de 25 nM suprime totalmente la fosforilación de la serina 473 de la proteína Akt (figura 8a). Estimula la expresión de la proteína FOXO3 (figura 8b), cuya síntesis está reducida por la proteína Akt-fosforilada. Estimula la expresión de la proteína peroxirredoxina 1, cuyo gen está descrito como estando bajo el control del factor FOXO3 (figura 8c).

La proteína peroxirredoxina es una enzima que tiene una actividad peroxidasa, que controla la concentración de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) intracelular. Se ha evaluado por lo tanto el efecto del compuesto (1) sobre la concentración de  $H_2O_2$  intracelular, utilizando el DCF-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína, Sigma) como marcador de  $H_2O_2$  intracelular. El peróxido de hidrógeno es un segundo mensajero intracelular. Regula, según su concentración, numerosas funciones como la proliferación o la apoptosis. Una reducción de su concentración está asociada a una disminución de proliferación. Los resultados de análisis en citometría de flujo de las células HCT-116 tratadas por el compuesto (1) a la concentración de 50 nM muestran una disminución de aproximadamente el 50% de la concentración de  $H_2O_2$  intracelular después de 18 horas de tratamiento (figura 9a). El efecto observado depende de la dosis (figura 9b).

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula (I) siguiente:



5

en la que:

10

- m es un número entero de 0 a 3, preferentemente de 0 a 2;
- n es un número entero de 0 a 3, preferentemente de 0 a 2;
- $m + n \geq 1$

15

- EAG representa un grupo electroatrayente seleccionado independientemente de entre un átomo de halógeno, un grupo  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CF}_3$ ,  $\text{CCl}_3$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $(\text{C}=\text{O})\text{NR}_2$ ,  $\text{CH}=\text{NR}$ ,  $(\text{C}=\text{S})\text{OR}$ ,  $(\text{C}=\text{O})\text{SR}$ ,  $\text{CS}_2\text{R}$ ,  $\text{SO}_2\text{R}$ ,  $\text{SO}_2\text{NR}_2$ ,  $\text{SO}_3\text{R}$ ,  $\text{P}(\text{O})(\text{OR})_2$ ,  $\text{P}(\text{O})(\text{R})_2$ ,  $\text{B}(\text{OR})_2$ , en los que R es un radical alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), un grupo fenilo o un átomo de hidrógeno;

20

- A representa una cadena hidrocarbonada, saturada o insaturada, lineal o ramificada, que comprende de 1 a 10 átomos de carbono; y

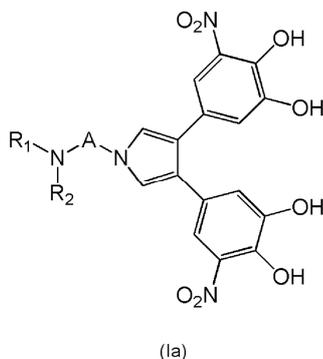
25

- $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  representan cada uno, independientemente uno de otro, un átomo de hidrógeno, un grupo CO-alquilo- $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ , alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ ), fenilo o fenil-alquilo- $(\text{C}_1\text{-C}_6)$ , o  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  forman, junto con el átomo de nitrógeno portador de los mismos, un heterociclo de 5 a 15 eslabones, eventualmente sustituido por un grupo alquilo ( $\text{C}_1\text{-C}_6$ );

30

comprendiendo sus esteroisómeros y sus mezclas, o una sal de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado por que se trata de un compuesto de la fórmula (Ia) siguiente:



35

en la que los radicales A,  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  presentan los significados proporcionados en la reivindicación 1,

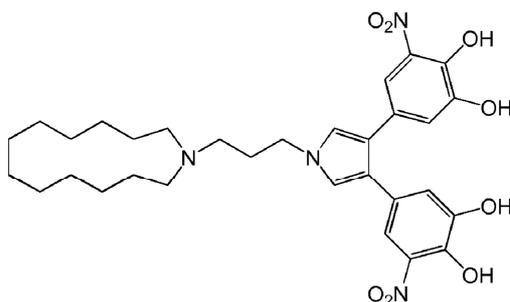
incluyendo sus esteroisómeros y sus mezclas, o una sal de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. Compuesto según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman, junto con el átomo de nitrógeno portador de los mismos, un heterociclo que está saturado y que no comprende otro heteroátomo que el átomo de nitrógeno portador de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub>.

5 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> forman, junto con el átomo de nitrógeno portador de los mismos, un heterociclo de 10 a 15 eslabones, preferentemente de 13 eslabones.

10 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que A es una cadena hidrocarbonada lineal saturada que comprende 3 a 6 átomos de carbono, preferentemente 3 átomos de carbono.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que corresponde al compuesto de la fórmula (1) siguiente:



(1)

o una sal de ácido farmacéuticamente aceptable del mismo.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que la sal de ácido farmacéuticamente aceptable es un clorhidrato.

8. Composición farmacéutica que comprende por lo menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y por lo menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

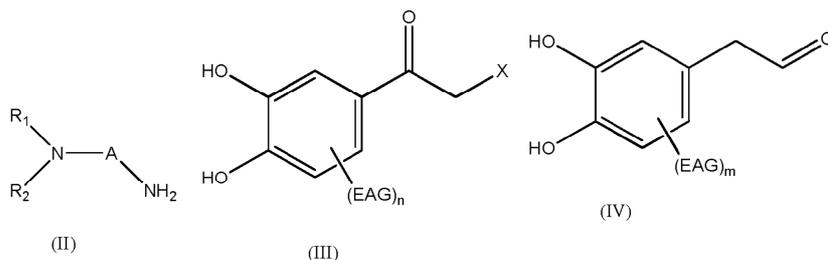
9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su utilización como medicamento.

10. Compuesto según la reivindicación 9, para su utilización como medicamento para el tratamiento del cáncer.

11. Compuesto para su utilización según la reivindicación 10, caracterizado por que el cáncer se selecciona de entre el cáncer de pulmón, de mama, de hígado, de estómago, de colon, de ano, de esófago, de laringe, de nasofaringe, de páncreas, de próstata, de riñón, de vejiga, de duodeno, de endometrio, de pleura, de piel, de testículos, de ovarios, de útero, de cerebro, de huesos, de boca, de ojos, o los cánceres hematopoyéticos tales como las leucemias, las leucemias mieloides, los linfomas, el cáncer de la médula ósea o además los tumores de origen neuroectodérmico tales como los glioblastomas.

12. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:

a) la reacción entre una amina de fórmula (II) siguiente, un halogenuro de la fórmula (III) siguiente, y un aldehído de fórmula (IV) siguiente,



en las que n y m, EAG, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y A son tales como se definen en la reivindicación 1 y X representa un átomo de halógeno, para proporcionar un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 1, y

b) eventualmente la formación de una sal farmacéuticamente aceptable a partir del compuesto de fórmula (I) obtenido en la etapa a) anterior.

5 13. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según la reivindicación 12, caracterizado por que el halogenuro (III) y la amina (II) en primer lugar se hacen reaccionar juntos antes de añadir el aldehído (IV).

14. Procedimiento de preparación de un compuesto de fórmula (I) según una de las reivindicaciones 12 y 13, caracterizado por que X es un átomo de cloro, de bromo o de yodo.

10

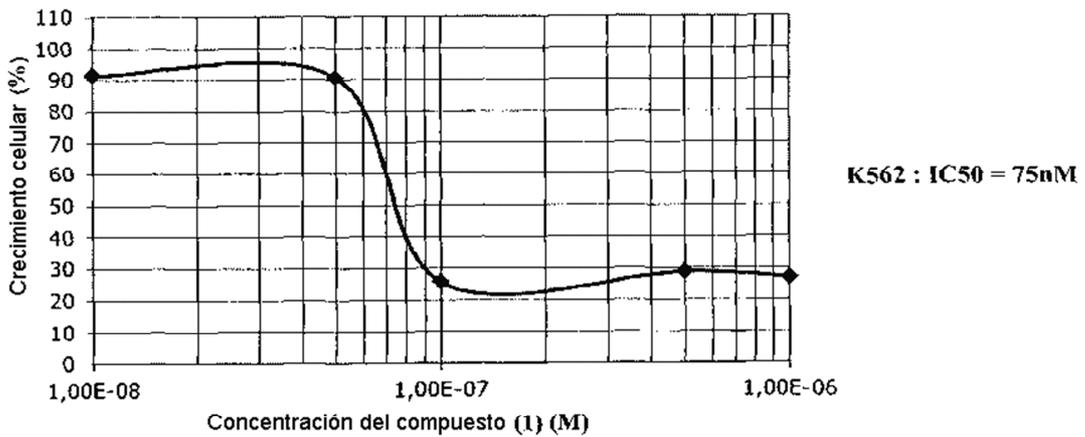
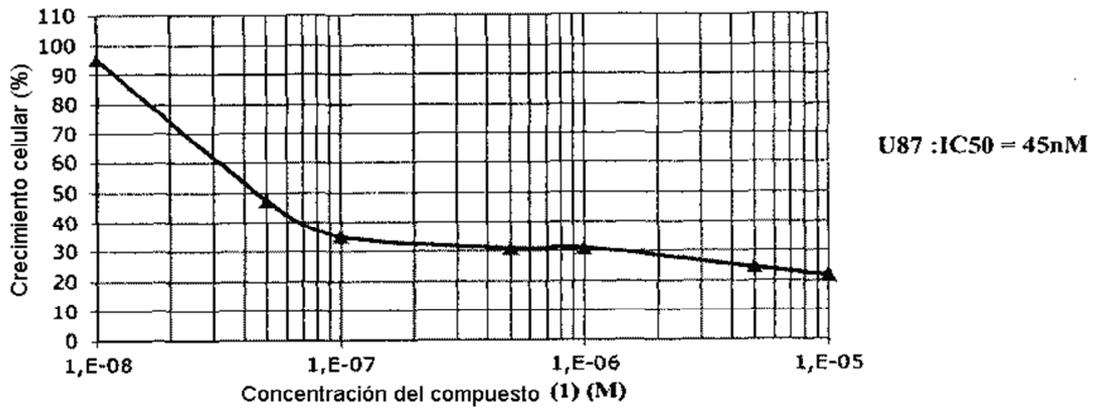
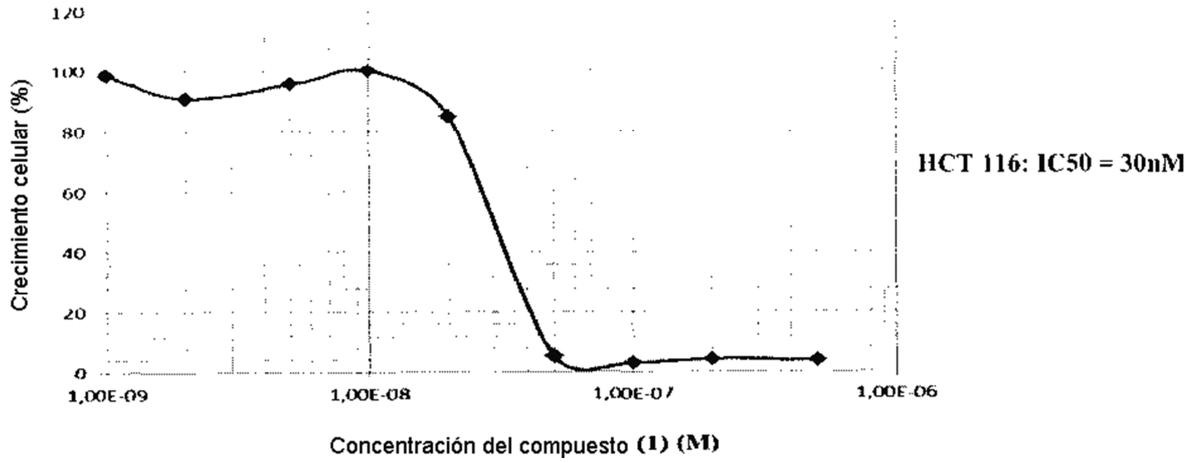


FIGURA 1

	24h	48h	72h
10nM	-12%	-18%	-20%
25nM	-40%	-62%	-50%
50nM	-44%	-83%	-91%
100nM	-44%	-83%	-92%
200nM	-45%	-86%	-94%

Figura 2a

	24h	48h	72h
	% de viabilidad	% de viabilidad	% de viabilidad
C	98	99	99
10nM	98	99	99
25nM	98	98	99
50nM	97	96	95
100nM	97	97	98
200nM	98	94	95

Figura 2b

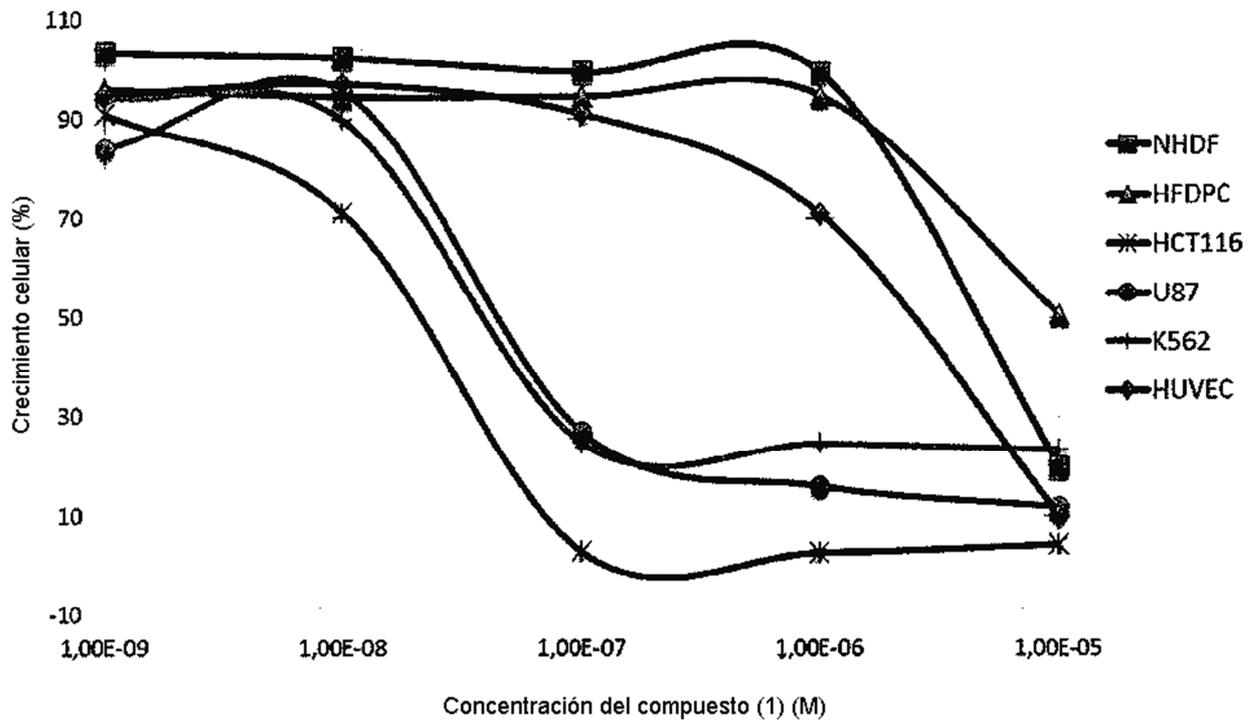


Figura 3

NT: no tratado

	GO/G1 %	S %	G2/M %
NT1	27	47	26
NT2	26	43	31
10 nM	28	47	25
30 nM	42	40	18
50nM	64	21	15

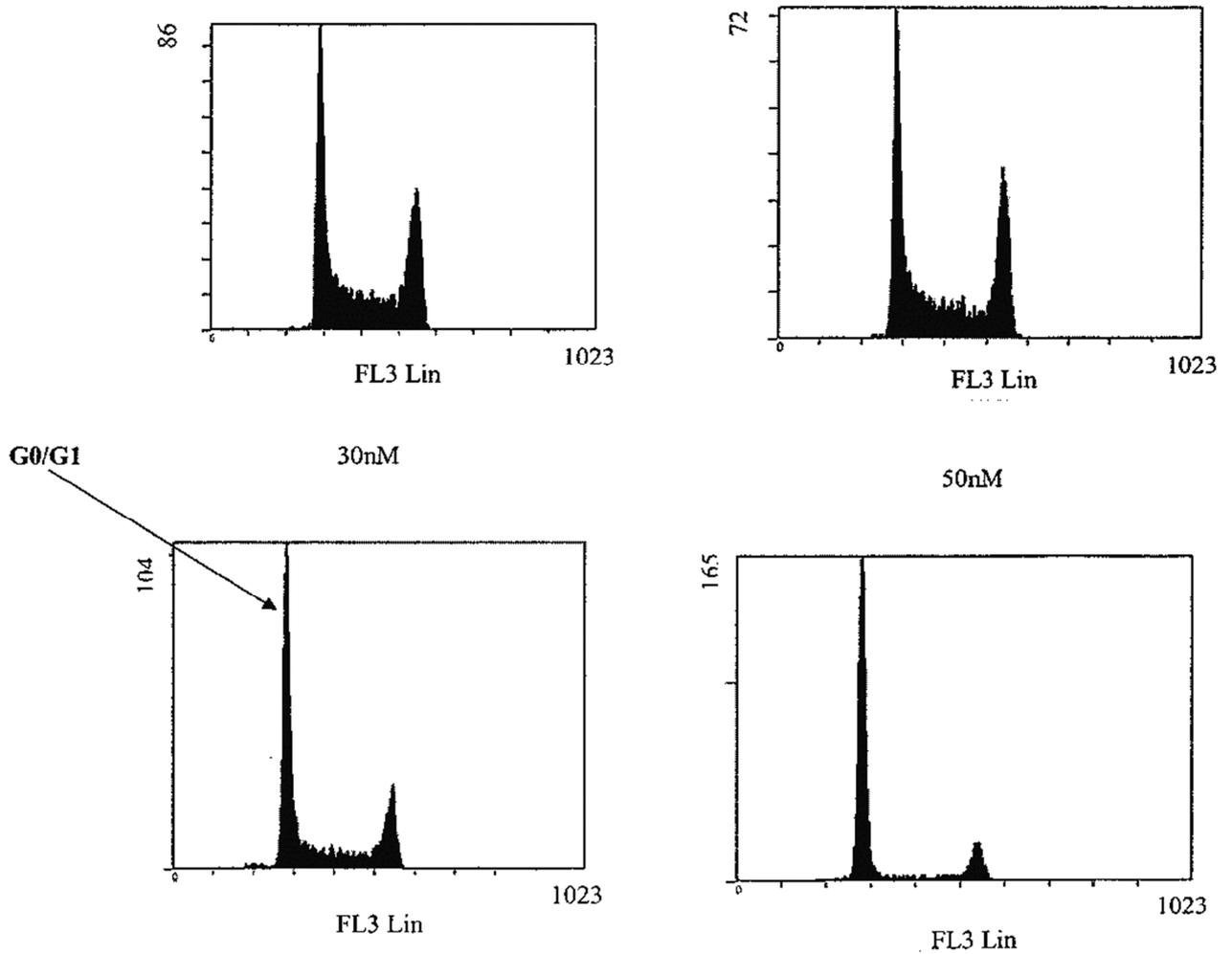


FIGURA 4

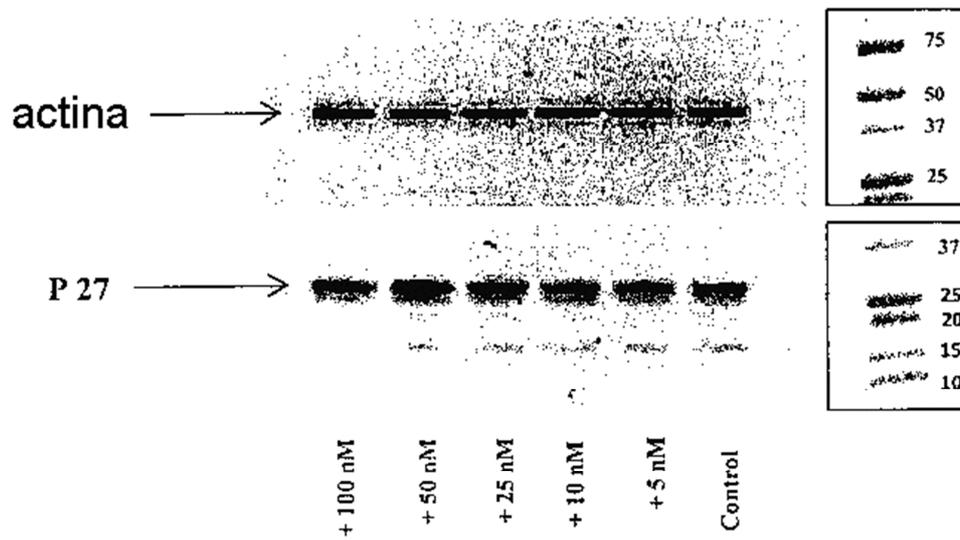
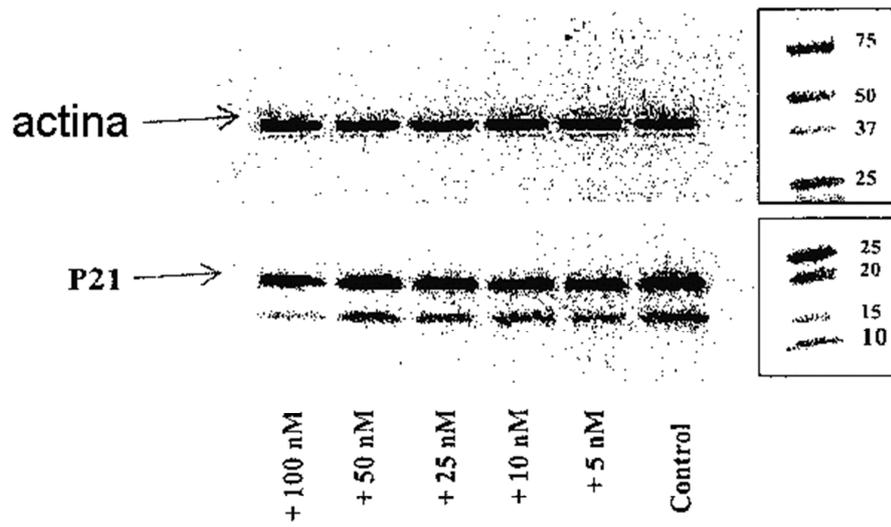


Figura 5

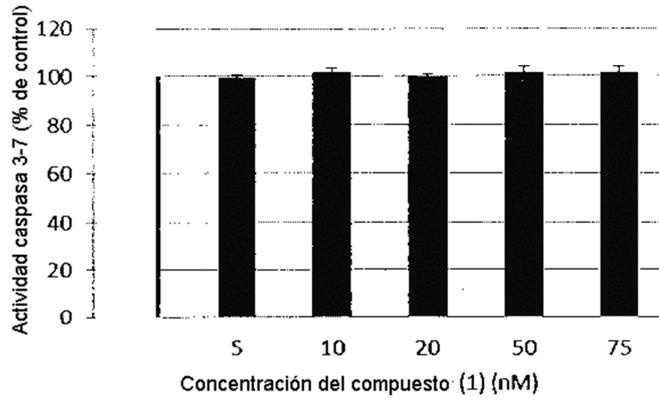


Figura 6a

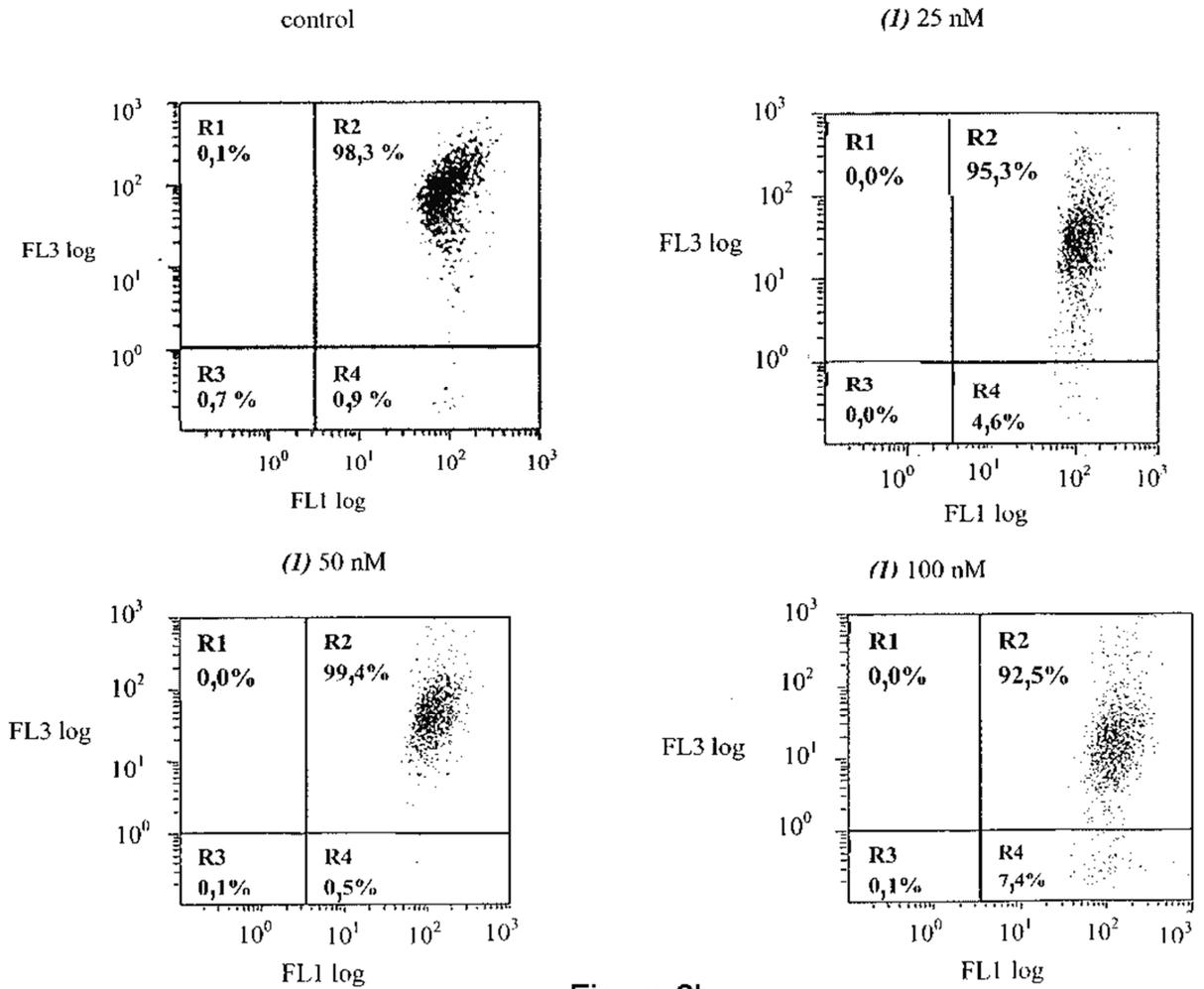


Figura 6b

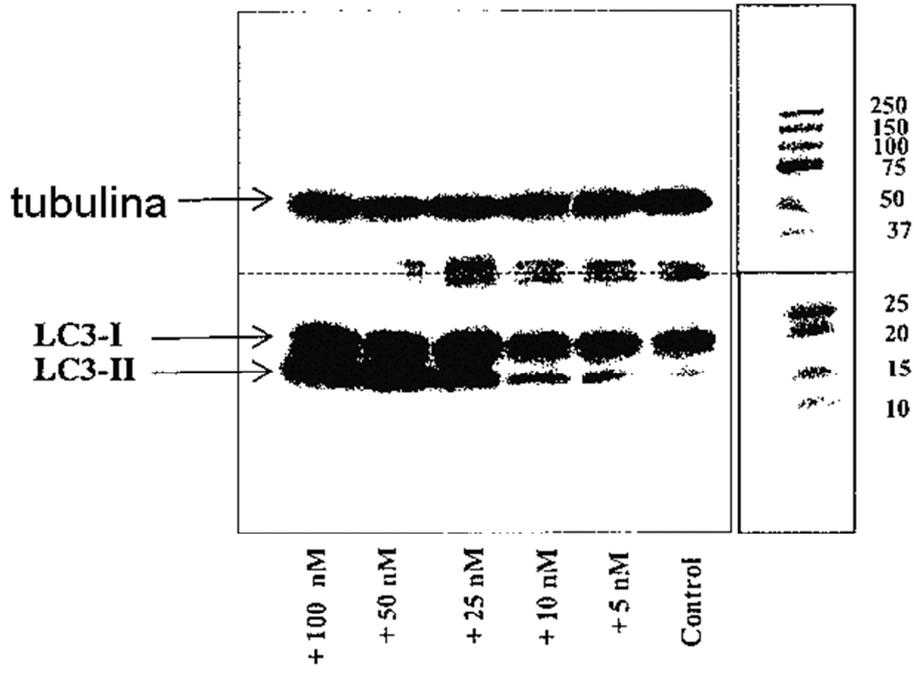


Figura 7

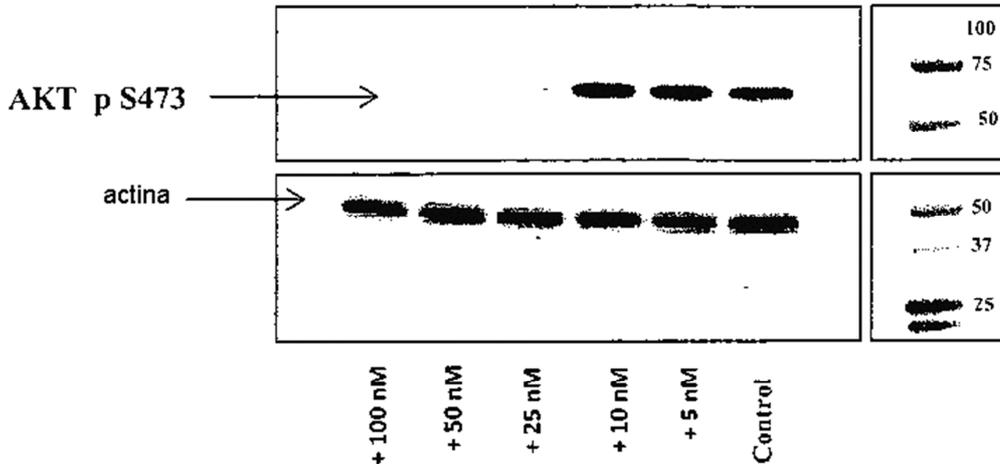


FIGURA 8a

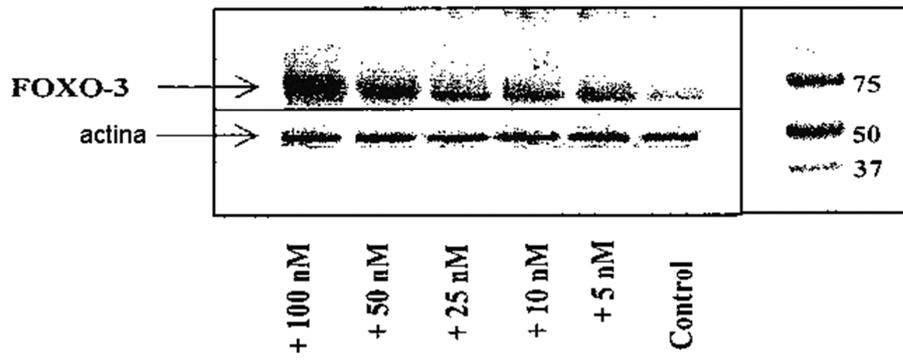


FIGURA 8b

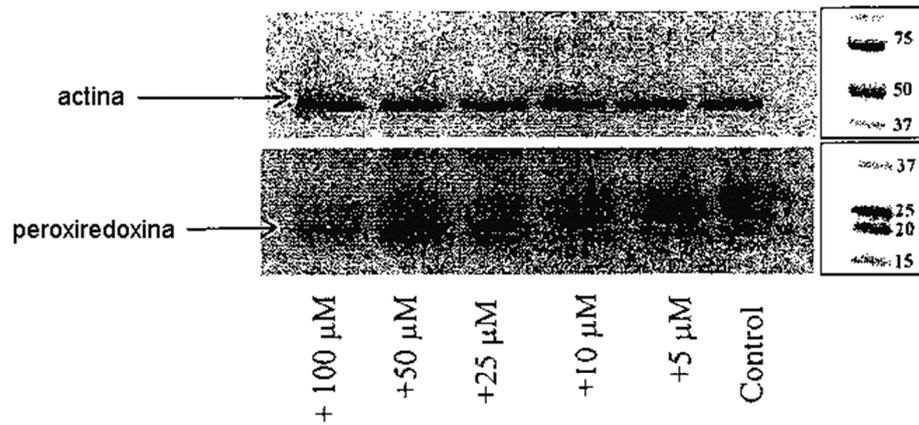


FIGURA 8c

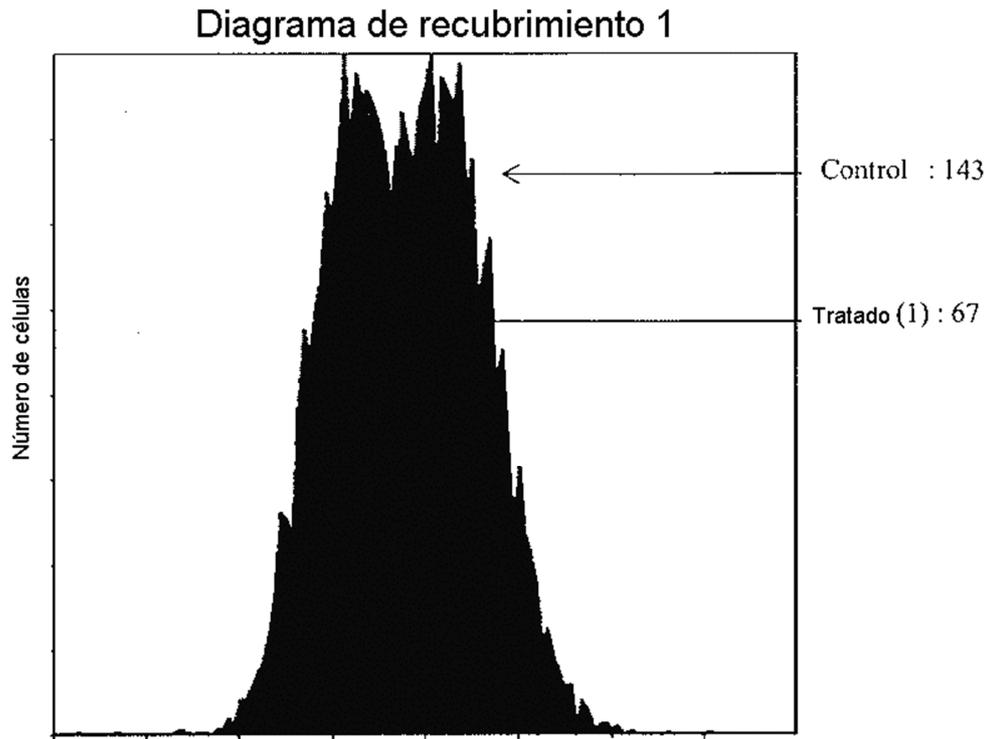


FIGURA 9a

DCF (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), HCT, 18h

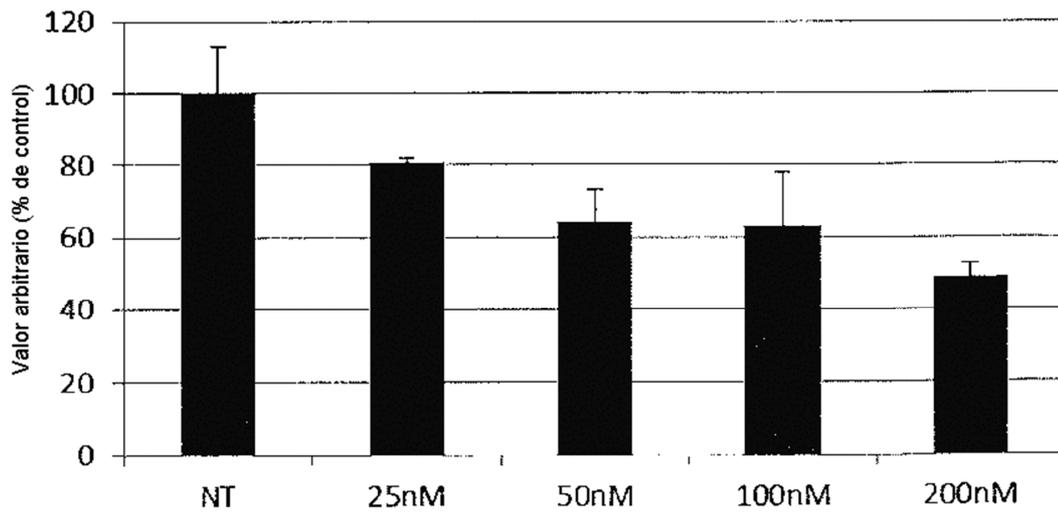


FIGURA 9b