(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 561 482**

(51) Int. Cl.:

C07C 219/08	(2006.01)	***C07D 317/24***	(2006.01)
A61K 31/164	(2006.01)	***C07D 327/10***	(2006.01)
A61K 31/232	(2006.01)	***C07F 9/113***	(2006.01)
A61K 31/357	(2006.01)	***C07F 9/6574***	(2006.01)
A61K 31/39	(2006.01)		
A61K 31/661	(2006.01)		
A61K 31/665	(2006.01)		
A61P 35/00	(2006.01)		
C07C 233/20	(2006.01)		
C07C 69/587	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2008** **E 08714624 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2121576**

(54) Título: **Monoglicéridos de ácido graso poliinsaturado, derivados, y sus usos**

(30) Prioridad:

15.02.2007 US 889984 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.02.2016

(73) Titular/es:

CENTRE DE RECHERCHE SUR LES BIOTECHNOLOGIES MARINE (100.0%)
265, 2E RUE EST
RIMOUSKI, QUEBEC G5L 9H3, CA

(72) Inventor/es:

FORTIN, SAMUEL

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 482 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

Monoglicéridos de ácido graso poliinsaturado, derivados, y sus usos

Campo de la invención

El presente documento se refiere al campo de química medicinal. Más particularmente se refiere al campo de agentes activos usados como agente quimiopreventivo del cáncer y radiopotenciador para radioterapia del cáncer.

Antecedentes de la invención

Se estima que ocurrirán 153.100 nuevos casos de cáncer y 70.400 muertes por cáncer en Canadá en 2006. Los hombres superan a las mujeres tanto en número de casos como de muertes, en 5% en incidencia y 11% en mortalidad. Tres tipos de cáncer dan cuenta de por lo menos el 55% de los nuevos casos en cada sexo; cánceres de próstata, pulmón y colorectal en hombres; y cánceres de mama, pulmón y colorectal en mujeres. El veintinueve por ciento de muertes por cáncer en hombres y el 26% en mujeres son debidos sólo al cáncer de pulmón. En base a los actuales porcentajes de incidencia, el 38% de las mujeres canadienses y el 44% de los hombres desarrollarán cáncer durante sus vidas. En base a los actuales porcentajes de mortalidad, el 24% de mujeres y el 29% de los hombres, o aproximadamente 1 de cada 4 canadienses morirá del cáncer (Canadian cáncer society, **2006**).

En las últimas dos décadas la Division of Cancer Prevention del US National Cancer Institute ha organizado un programa de investigación y desarrollo para la evaluación clínica de potenciales agentes preventivos del cáncer. El NCI define la quimioprevención como un área innovadora de investigación del cáncer que se centra en la prevención del cáncer por medio de intervenciones farmacológicas, biológicas y nutricionales. Como se describió originalmente, esto implica la prevención primaria de iniciación y la prevención secundaria, retraso, o inversión de la promoción y progresión (Crowell J.A., et al., European Journal of Cancer 41, 2005).

Los estudios epidemiológicos han mostrado una correlación entre el alto consumo de grasa y un riesgo incrementado de cáncer de mama (Wynder EL, Cancer, 58, 1986). Además, tanto el tipo como la cantidad de grasa de la dieta parece afectar al desarrollo del cáncer de mama (Bartsch H, et al. Carcinogenesis 20, 1999). Una ingesta relativamente alta de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) n-6 se considera que es un factor de riesgo y está asociado a una etapa más avanzada de la enfermedad en el momento del diagnóstico (Nomura AM, et al., Breast Cancer Res Treat 18, 1991) y supervivencia reducida (Rohan TE, et al., Nutr Cancer, 20, 1993). En contraste, existe una relación inversa entre la incidencia de cáncer de mama y el nivel de consumo de pescado, lo que sugiere un papel protector para los PUFAs n-3 en el cáncer de mama humano.

Una dieta que contiene LA (PUFA n-6) estimuló el crecimiento y metástasis de células de cáncer de mama humano trasplantadas a ratones desnudos atímicos, mientras que EPA o DHA ejercieron efectos supresores comparado con ácido palmítico (PA). De este modo, de acuerdo con observaciones epidemiológicas, el La (PUFA n-6) acelera, mientras que el EPA y el DHA (PUFA n-3) suprimen el cáncer de mama comparado con la dieta de PA en sistemas experimentales (Rose DP, et al., JNCI 87, 1995) (Senzaki H, et al., Anticancer Res 18, 1998).

Kafrawy et al. ("Docosahexaenoic acid in phosphatidylcholine mediates cytotoxicity more effectively than other omega-3 and omega-6 fatty acids" Cancer Letter, 1998, vol 132, páginas 23-29) describe moléculas que se han ensayado en un modelo in vitro de la línea celular de leucemia murina T27A. Estas moléculas son: di-C22:6 fosfatidilcolina, C18:0,C22:6 fosfatidilcolina, C18:1,C22:6 fosfatidilcolina, C18:3,C22:6 fosfatidilcolina, C20:4,C22:6 fosfatidilcolina y C20:5,C22:6 fosfatidilcolina,

Pacetti et al. ("High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry of phospholipid molecular species in egg from hens fed diets enriches in seal blabber oil", Journal of Chromatography, 2005, vol. 1097, no. 1-2, páginas 66-73) describe varios fosfolípidos encontrados en huevos. Estas moléculas se analizaron por HPLC/MS/MS y se describen basadas en la fragmentación en el espectrómetro de masas. No se describen en este artículo ni usos ni composiciones de estas moléculas.

El documento JP 7 149786 (SAGAMI CHEM RES, 13 June 1995) describe gliceroglicolípido que tiene fuerte acción de inhibición del promotor carcinógeno y baja citotoxicidad y es útil como inhibidor del promotor carcinógeno efectivo como un componente activo de un agente de prevención o tratamiento del cáncer.

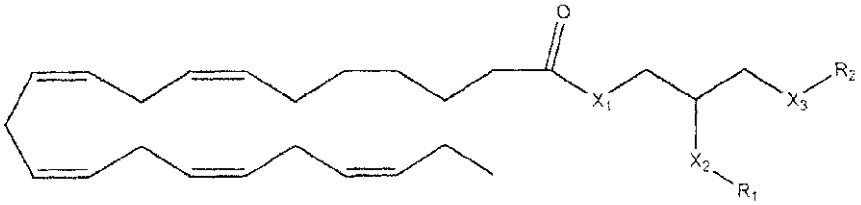
El objetivo principal del documento EP 1 402 894 A1 es proporcionar agentes para la supresión de la metástasis del cáncer. Las moléculas descritas en este documento son principalmente heterociclos de fosfato de cinco miembros de una cadena principal de glicerol esterificada con un ácido graso (palmítico, EPA y DHA) o un derivado de ciclopropano de un ácido graso monoinsaturado. Se describen también análogos de éteres o carbamatos del éster unido.

El documento WO 2004/000333 describe combinaciones de derivados de ácido graso y carboxiderivados de piridina, que incluyen ésteres de ácido graso con glicerol y 3-carboxiderivados de piridina tales como niacinamida. Estas combinaciones tienen actividad antiviral y antimicrobiana y se usan para el tratamiento de estados inflamatorios e infecciones.

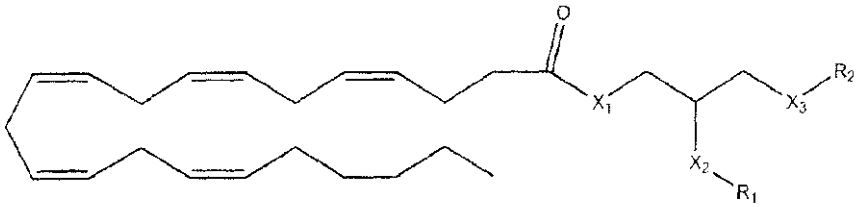
Vandevoorde et al. ("Influence of the degree of insaturation of the acyl side chain upon the interaction of analogues of 1-arachidonoylglycerol with monoacylglycerol lipase and fatty acid amine hydrolase", Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, vol 337, no. 1, páginas 104-109), describe una investigación acerca de la capacidad de trece compuestos para inhibir el metabolismo de 2-oleilglicerol por MAGL y anandamida por FAAH. Se ha mostrado que estas enzimas están implicadas en varios procedimientos fisiológicos importantes como el control de los estados emocionales, apetito, y percepción del dolor. Las trece moléculas ensayadas son sn-1-monoacilglicerido de C14:0, C16,0, C20,0, C20:1n9, C20:1n15, C20:2, C20:3, C20:3 (α-metil), C20:4, C20:4 (α-metil), C22:4, C22:4 (α-metil),

Sumario de la invención

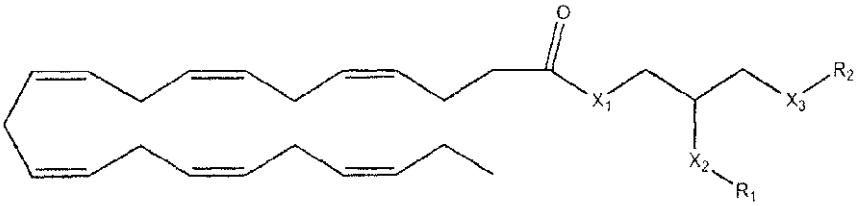
Se describen compuestos de fórmulas (I), (II), (III), y (IV):



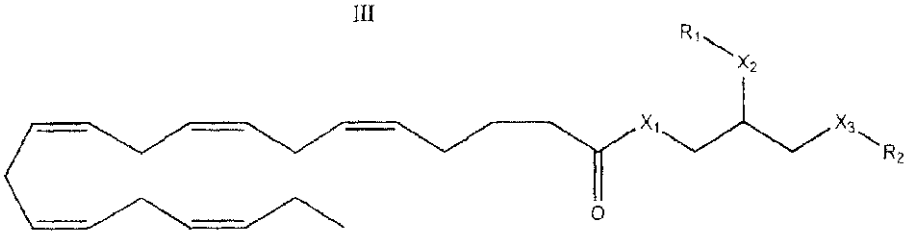
I



II



III



IV

en las que

X_1 es O, NH, o S;

X_2 es O, NH, o S;

X_3 es O, NH, o S;

R_1 y R_2 cada uno independientemente representa –H, $-C(O)NH_2$, $-S(O)_2NH_2$, -(oxi)alquilo de C1-C22, -alquilo de C1-C22, -(hidroxi)alquilo de C1-C22, -(amino)alquilo de C1-C22, -(halo)alquilo de C1-C22, -alquenilo de C3-C22, -alquinilo de C3-C22, -cicloalquilo de C3-C7 sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y -alquinilo de C2-C22, -arilo de C6-C12, -(aril)alquilo de C7-C22, -

(aril)alquenilo de C8-C22, -(aril)alquinilo de C8-C22, heterociclo no aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y –alquinilo de C2-C22, heterociclo aromático de cinco a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y –alquinilo de C2-C22, $-(CH_2)_n$aminoácido en el que el aminoácido está conectado por medio de su átomo de carbono alfa. $–(CH_2)_n$péptido en el que el péptido está conectado por medio del átomo de carbono alfa de uno de sus aminoácidos, $-CH_2OR_5$, $-C(O)R_5$, $-C(O)OR_5$, $-C(O)NR_5$, $-PO(OR_5)_2$, $-S(O)_2NHR_5$, $-SOR_5$, $-S(O)_2R_5$, $-arilP(O)(OR_5)_2$, un azúcar, o un fosfato de azúcar

O R_1 y R_2 se unen conjuntamente para formar un heterociclo no aromático de cinco a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de alquilo de C1-C22, alquenilo de C2-C22, y alquinilo de C2-C22, un fosfato, grupo sulfatocarbonilo, o una tiocarbonilimina;

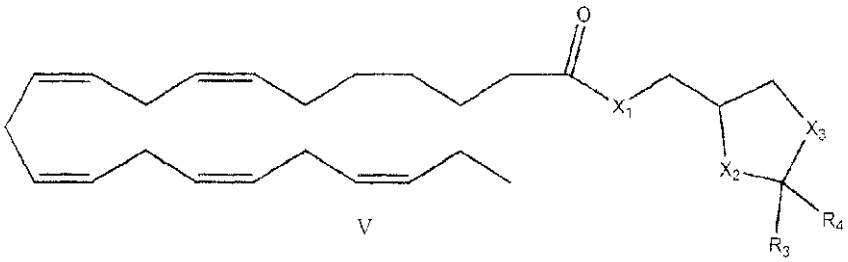
R_5 es –H, -alquilo de C1-C22, -cicloalquilo de C3-C7, -haloalquilo de C1-C22, -arilo de C6-C12, -alquenilo de C2-C22, -alquinilo de C2-C22, -(aril)alquilo de C7-C22, -(aril)alquenilo de C8-C22, -(aril)alquinilo de C8-C22, -(hidroxi)alquilo de C1-C22, -alcoxi de C1-C22, -(amino)alquilo de C1-C22, un –cicloalquilo de C3-C7 sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22 y –alquinilo de C2-C22, un heterociclo no aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y alquinilo de C2-C22, un heterociclo aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de -alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22 y –alquinilo de C2-C22, un $-(CH_2)_n$aminoácido en el que el aminoácido está conectado al compuesto por medio de su átomo de carbono alfa, un $-(CH_2)_n$péptido en el que el péptido está conectado al compuesto por medio del átomo de carbono alfa de uno de sus aminoácidos, un azúcar o un fosfato de azúcar; y

n es un número entero que tiene un valor de 0, 1, 2, 3, o 4,

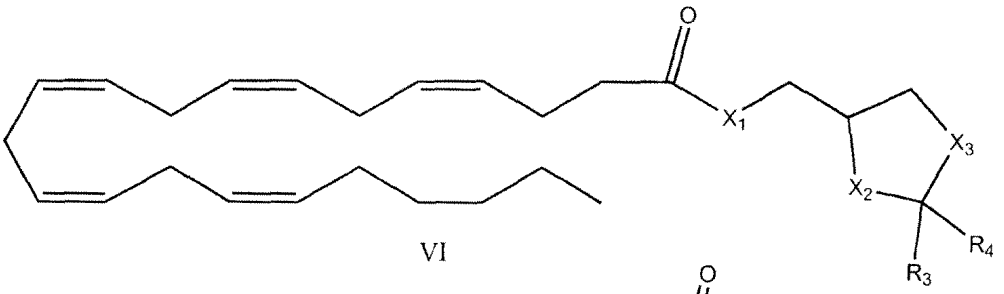
y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos de la invención son según las reivindicaciones 1 a 5.

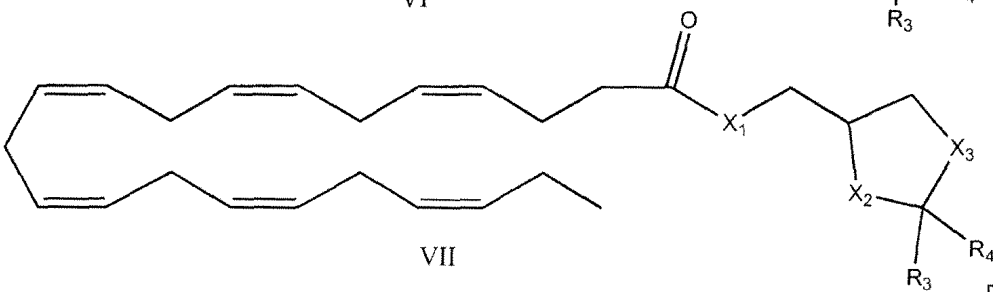
Se describen también compuestos de fórmulas (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) o (XV):



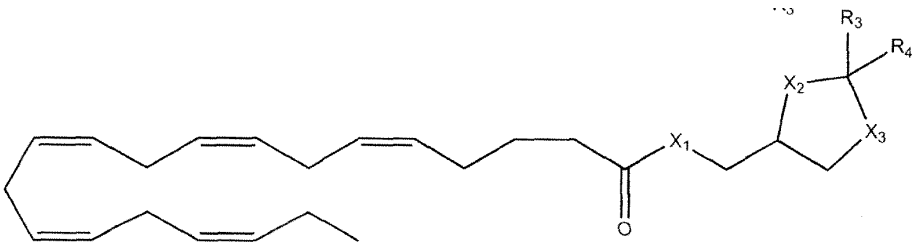
V



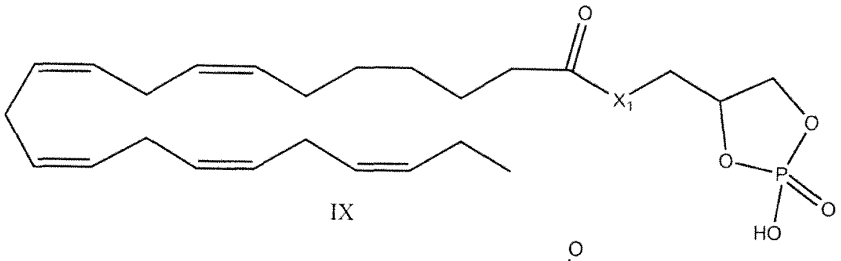
VI



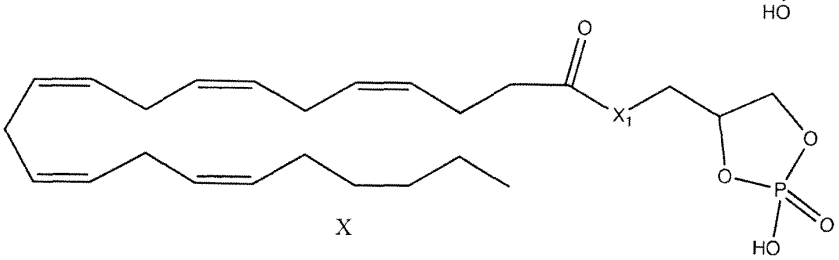
VII



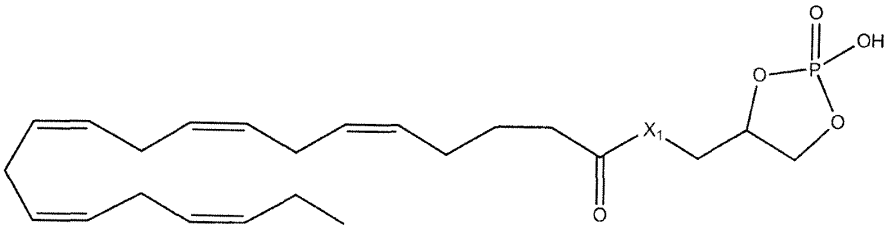
VIII



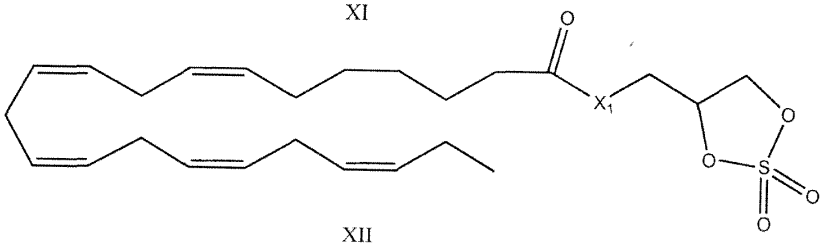
IX



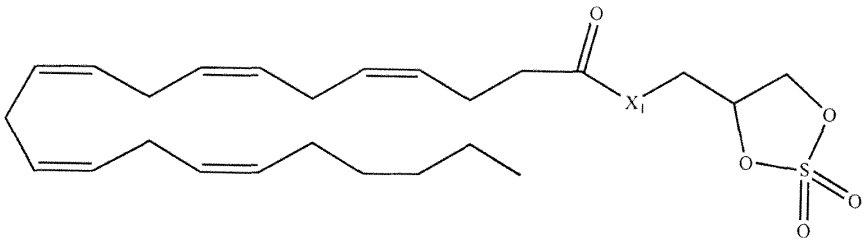
X



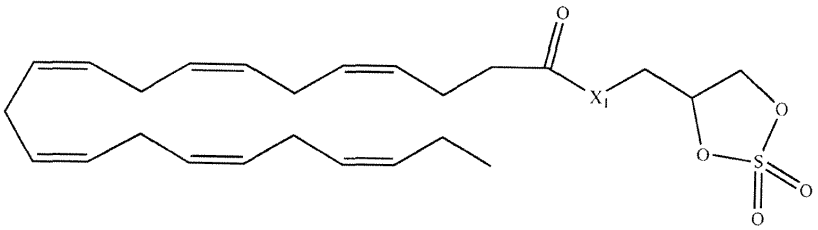
XI



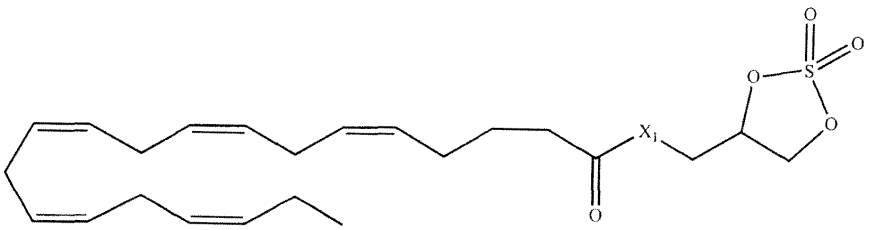
XII



XIII



XIV



XV

X_1 es O, NH, o S;

X_2 es O, NH, o S;

X_3 es O, NH, o S;

R_3 y R4 cada uno independientemente representa –H, -C(O)NH_2, -S(O)$_2NH_2$, -(oxi)alquilo de C1-C22, -alquilo de C1-C22, -(hidroxi)alquilo de C1-C22, -(amino)alquilo de C1-C22, -(halo)alquilo de C1-C22, -alquenilo de C3-C22, -alquinilo de C3-C22, -cicloalquilo de C3-C7 sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de -alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y -alquinilo de C2-C22, -arilo de C6-C12, -(aril)alquilo de C7-C22, -(aril)alquenilo de C8-C22, -(aril)alquinilo de C8-C22, heterociclo no aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y –alquinilo de C2-C22, heterociclo aromático de cinco a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y –alquinilo de C2-C22, -$(CH_2)_n$aminoácido en el que el aminoácido está conectado por medio de su átomo de carbono alfa, –$(CH_2)_n$péptido en el que el péptido está conectado por medio del átomo de carbono alfa de uno de sus aminoácidos, -CH_2OR_5, -C(O)R_4, -C(O)OR_4, -C(O)NR_4, -PO(OR_5)$_2$, -S(O)$_2NHR_5$, -SOR_5, -S(O)$_2R_5$, -arilP(O)(OR_5)$_2$, un azúcar, o un fosfato de azúcar

o R_3 y R_4 se unen conjuntamente para formar un heterociclo no aromático de cinco a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de alquilo de C1-C22, alquenilo de C2-C22, y alquinilo de C2-C22, un fosfato, grupo sulfatocarbonilo, o una tiocarbonilimina;

R_5 es –H, -alquilo de C1-C22, -cicloalquilo de C3-C7, -haloalquilo de C1-C22, -arilo de C6-C12, -alquenilo de C2-C22, -alquinilo de C2-C22, -(aril)alquilo de C7-C22, -(aril)alquenilo de C8-C22, -(aril)alquinilo de C8-C22, -(hidroxi)alquilo de C1-C22, -alcoxi de C1-C22, -(amino)alquilo de C1-C22, un –cicloalquilo de C3-C7 sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22 y –alquinilo de C2-C22, un heterociclo no aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de –alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22, y alquinilo de C2-C22, un heterociclo aromático de tres a siete miembros sin substituir o substituido con por lo menos un substituyente escogido de -alquilo de C1-C22, -alquenilo de C2-C22 y –alquinilo de C2-C22, un -$(CH_2)_n$aminoácido en el que el aminoácido está conectado al compuesto por medio de su átomo de carbono alfa, un -$(CH_2)_n$péptido en el que el péptido está conectado al compuesto por medio del átomo de carbono alfa de uno de sus aminoácidos, un azúcar o un fosfato de azúcar; y

n es un número entero que tiene un valor de 0, 1, 2, 3, o 4,

y sus sales farmacéuticamente aceptables.

Se encontró que tales compuestos se pueden usar para reducir o inhibir el crecimiento tumoral, o inhibir la proliferación de células tumorales in vitro así como in vivo. Se encontró también que los compuestos previamente mencionados pueden ser útiles como agentes quimiopreventivos del cáncer (por ejemplo cáncer de mama, cáncer

de próstata, cáncer de colon y cáncer de pulmón). Los compuestos de la presente invención se pueden usar separadamente o en una mezcla de por lo menos dos de ellos (por ejemplo, 2, 3, o 4 de ellos). Los compuestos pueden estar también en forma aislada. Los compuestos de la presente invención se pueden usar en forma de una composición que incluye también un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se describe que los compuestos previamente mencionados pueden proporcionar composiciones farmacéuticas para quimioprevención del cáncer. Tales composiciones pueden comprender por lo menos dos compuestos escogidos de compuestos de fórmulas (I), (II), (III), y (IV).

Estos compuestos también pueden ser efectivos como radiopotenciadores para radioterapia del cáncer, o en combinación con un ingrediente farmacéuticamente activo en quimioterapia del cáncer.

Los compuestos o las composiciones según la invención pueden ser efectivos para quimioprevención de varios tipos de cáncer (tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de colon). El crecimiento de tumores de tales tipos de cáncer se puede inhibir o reducir con estos compuestos.

Se describe un método para quimioprevenir el cáncer que comprende la etapa de administrar a un sujeto por lo menos un compuesto escogido de compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) y (XV).

Los compuestos o las composiciones según la invención se pueden usar en un método para quimioprevenir el cáncer.

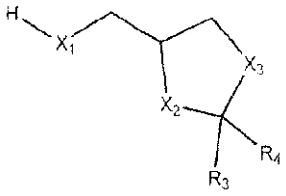
Se describe un método para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación de células tumorales, o reducir el crecimiento tumoral, in vitro o in vivo, que comprende poner en contacto el tumor con una cantidad efectiva de por lo menos un compuesto escogido de los compuestos de fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) y (XV).

Los compuestos o las composiciones según la invención se pueden usar en un método para inhibir el crecimiento tumoral, inhibir la proliferación de células tumorales, o reducir el crecimiento tumoral, in vitro o in vivo.

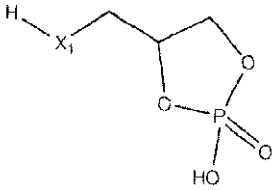
Se describe un método para reducir el crecimiento tumoral en un sujeto que comprende administrar al sujeto por lo menos un compuesto escogido de compuestos de las fórmulas (I), (II), (III), (IV), (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) y (XV).

Los compuestos o las composiciones según la invención se pueden usar en un método para reducir el crecimiento tumoral.

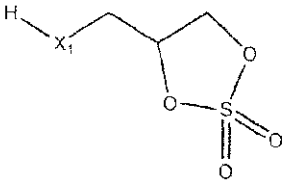
La presente descripción describe también un método para preparar un compuesto de fórmula (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) o (XV), comprendiendo el método hacer reaccionar un compuesto de fórmula (XVI), (XVII), o (XVIII)



XVI



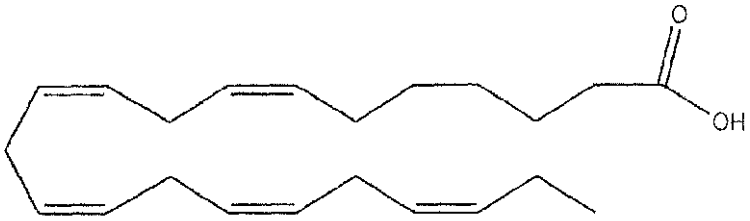
XVII

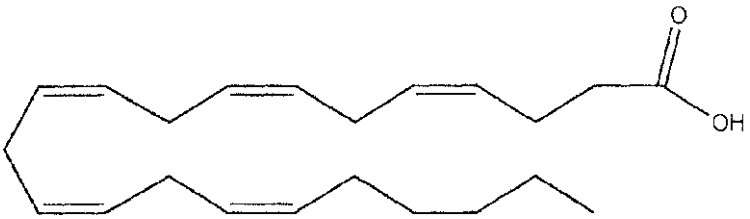


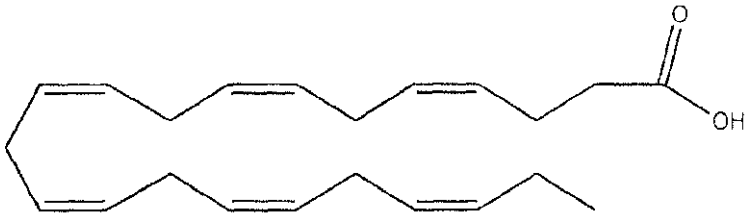
XVIII

en la que X_1, X_2, X_3, R_3 y R_4 son como se define previamente,

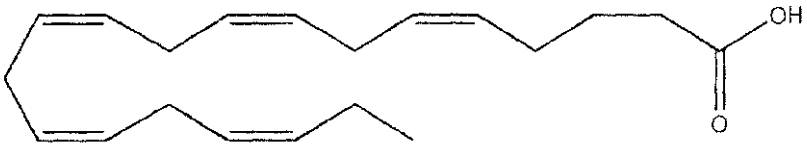
con por lo menos un éster de por lo menos un ácido graso escogido de







y

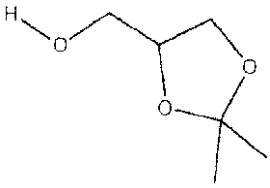


siendo entendido que cuando se usa un compuesto de fórmula (XVI), se obtiene un compuesto de fórmula (V), (VI), (VII), o (VIII), cuando se usa un compuesto de fórmula (XVII), se obtiene un compuesto de fórmula (IX), (X), o (XI), y cuando se usa un compuesto de fórmula (XVIII) se obtiene un compuesto de fórmula (XII), (XIII), (XIV) o (XV).

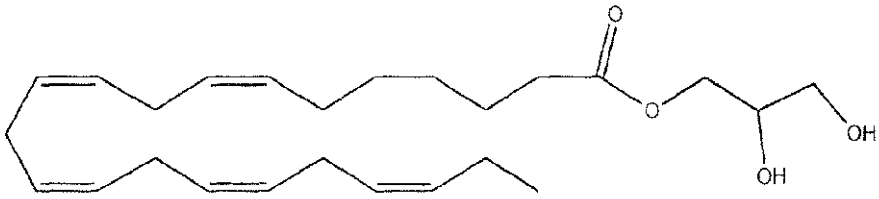
Por ejemplo, un compuesto de fórmula (XVI) y el éster de ácido graso se pueden hacer reaccionar conjuntamente en presencia de una base (tal como KOH o NaOH). Alternativamente, se pueden hacer reaccionar conjuntamente en presencia de una enzima, por ejemplo, una lipasa tal como Candida antartica.

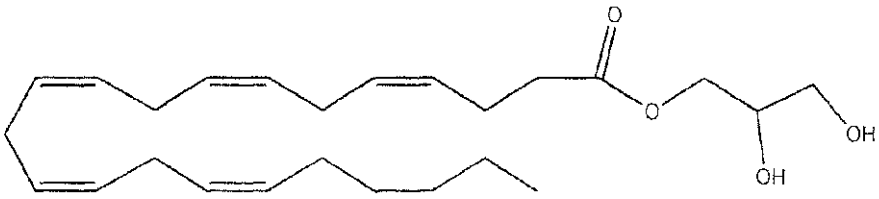
El método puede comprender adicionalmente tratar el compuesto obtenido de fórmula (V), (VI), (VII) o (VIII) en condiciones ácidas para abrir su anillo heterocíclico y protonar X_2 y X_3.

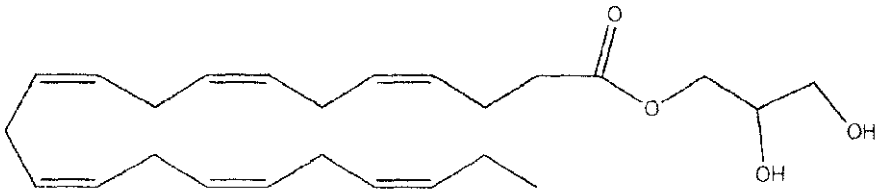
Por ejemplo, el compuesto de fórmula (XVI) puede ser



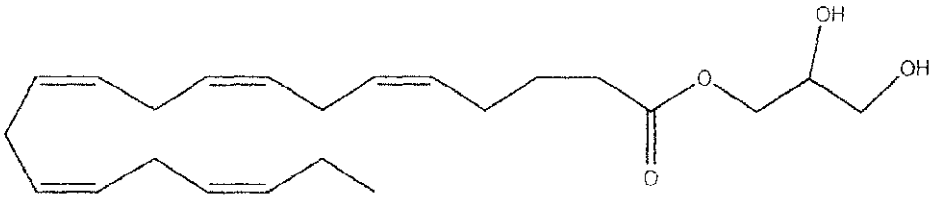
El método puede comprender adicionalmente tratar el compuesto obtenido de fórmula (V), (VI), (VII) o (VIII) en condiciones ácidas para obtener







o



Las condiciones ácidas se pueden producir por medio de un ácido escogido de ácido acético, ácido fórmico, ácido clorhídrico, ácido p-toluenosulfónico, ácido trifluoroacético, ácido perclórico y tosilato de piridinio o por medio de una resina ácida.

El éster puede ser un éster de alquilo de C1-C6 del ácido graso. Alternativamente el éster puede ser un monoglicérido o un diglicérido en el que por lo menos uno de los átomos de oxígeno de la cadena principal de glicerol forma un éster con el ácido graso. El éster puede ser también un triglicérido en el que los tres átomos de oxígeno de la cadena principal de glicerol forman un éster con una molécula del ácido graso.

El éster puede ser también un diglicérido o triglicérido en el que por lo menos un átomo de oxígeno de la cadena principal de glicerol forma un éster con otro ácido graso omega-3 o uno ácido graso omega-6.

Por ejemplo, la preparación de compuestos de fórmulas (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) y (XV) se puede llevar a cabo haciendo reaccionar conjuntamente un aceite de pescado que contiene el triglicérido con el compuesto de fórmula (V), (VI), (VII), (VIII), (IX), (X), (XI), (XII), (XIII), (XIV) o (XV).

De hecho, se pueden usar varios aceites ricos en ácidos grasos omega-3 y/o omega-6. Por ejemplo, se pueden usar aceites vegetales (tales como aceite de linaza, aceite de semilla de calabaza, aceite de colza, aceite de soja, aceite de nuez, etc.) y aceites marinos (tales como aceite de algas, aceite de foca, aceite de krill, aceite de pescado (por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de salmón, aceite de atún, aceite de tiburón, aceite de peces pelágicos, aceite de sardinas, etc.)).

El método puede comprender hacer reaccionar el compuesto de fórmula (XVI), (XVII), o (XVIII) con por lo menos dos ácidos grasos diferentes escogidos de los ácidos grasos previamente definidos. El método puede también comprender hacer reaccionar más de un compuesto escogido de los compuestos de fórmulas (XVI), (XVII), y (XVII).

El término “arilo” tal como se usa aquí se refiere a un anillo aromático cíclico o policíclico. Por ejemplo, el grupo arilo

puede ser fenilo o naftilo.

La expresión “heterociclo aromático” tal como se usa aquí se refiere a un sistema anular aromático cíclico o policíclico condensado que tiene por lo menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, O, S y P. Los ejemplos no limitantes que incluyen grupos heteroarilo son furilo, tienilo, piridilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indolilo, isoindolilo, triazolilo, pirrolilo, tetrazolilo, imidazolilo, pirazolilo, oxazolilo, tiazolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, carbazolilo, benzoxazolilo, pirimidinilo, benzimidazolilo, quinoxalinilo, benzotiazolilo, naftiridinilo, isoxazolilo, isotiazolilo, purinilo, quinazolinilo, etc.

La expresión “heterociclo no aromático” incluye anillos o sistemas de anillo no aromáticos que contienen por lo menos un anillo que tiene por lo menos un heteroátomo (tal como nitrógeno, oxígeno, azufre o fósforo). Este término incluye, de una manera no limitante, todos los derivados totalmente saturados y parcialmente insaturados de los anteriormente mencionados grupos heterocíclicos aromáticos. Los ejemplos de grupos heterocíclicos no aromáticos incluyen, de una manera no limitante, pirrolidinilo, tetrahidrofuranilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperidinilo, piperazilo, tiazolidinilo, isotiazolidinilo, e imidazolidinilo.

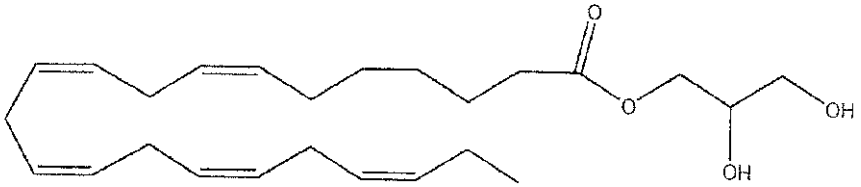
El azúcar se puede escoger de azúcares de 5 carbonos y azúcares de 6 carbonos. Los ejemplos no limitantes de azúcares de 5 carbonos incluyen ribosa, arabinosa, xilosa, y lixosa. Los ejemplos no limitantes de azúcares de 6 carbonos incluyen glucosa, galactosa, manosa, alosa, gulosa, idosa, talosa y altrosa.

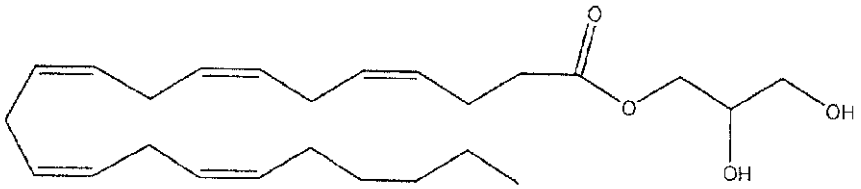
El fosfato de azúcar se puede escoger de monosacáridos (tales como manosa-6-fosfato, glucosa-6-fosfato, galactosa-6-fosfato, manosa-1-fosfato, glucosa-1-fosfato y galactosa-1-fosfato), disacáridos (tales como 6-O-fosforil-a-D-manopiranosil-(1-2)-D-manopiranosa, 6-O-fosforil-a-D-manopiranosil-(1-3)-manopiranosa, 6-O-fosforil-a-D-manopiranosil-(1-6)-D-manopiranosa), trisacáridos (tales como 6-O-fosforil-a-D-manopiranosil-(1-2)-D-manopiranosil-(1-2)-D-manopiranosa), y oligosacáridos lineales o ramificados superiores (tales como pentamanosa-6-fosfato).

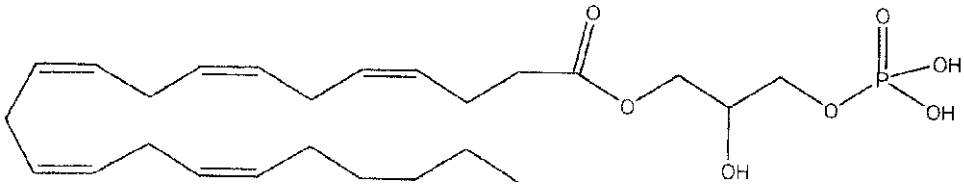
El aminoácido se puede escoger de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, y valina.

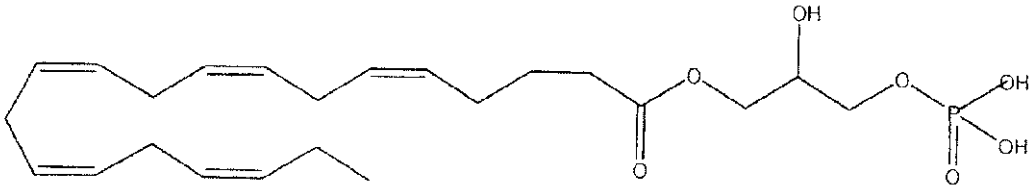
El péptido se puede escoger de cualquier posible combinación de los aminoácidos previamente descritos.

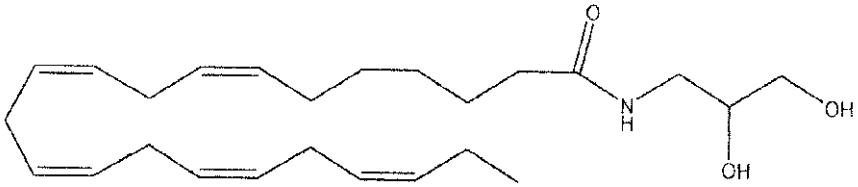
Se describen compuestos que son de fórmulas:

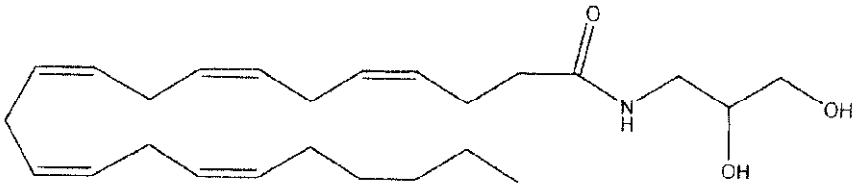


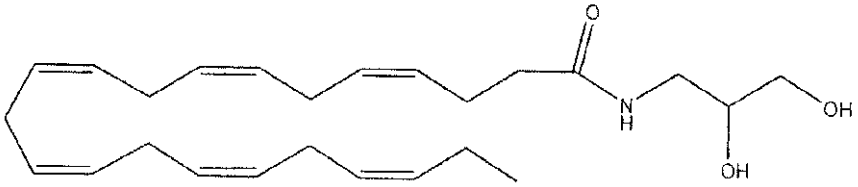


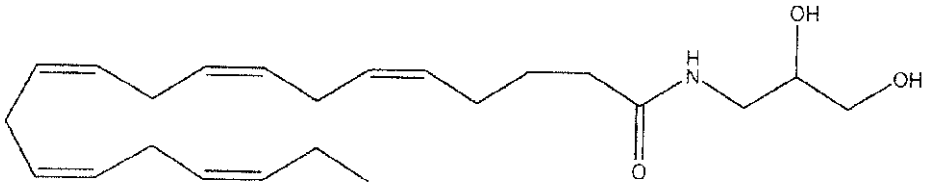

O
O
O
P
OH
OH
OH

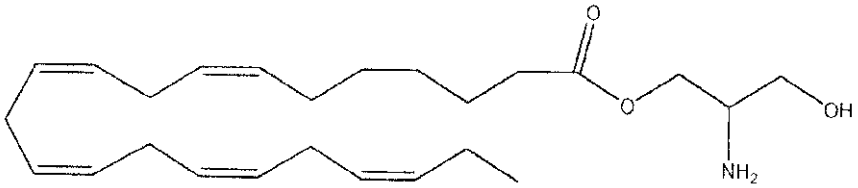

OH
O
O
O
P
OH
OH
O

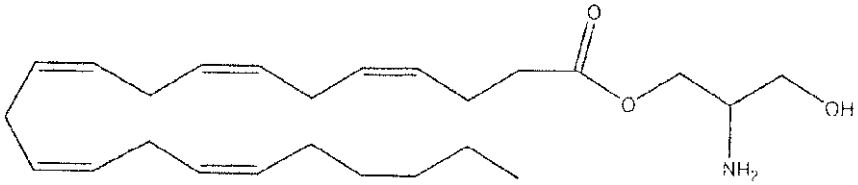

O
N
H
OH
OH

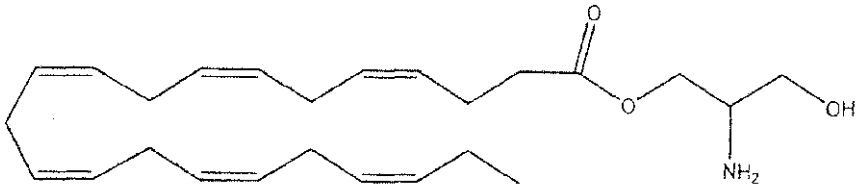

O
N
H
OH
OH

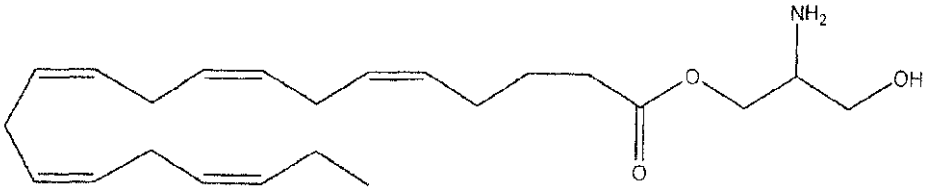

O
N
H
OH
OH

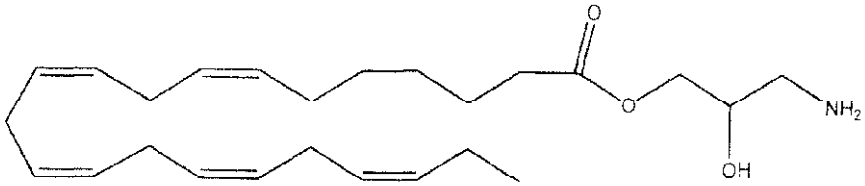

OH
H
N
OH
O

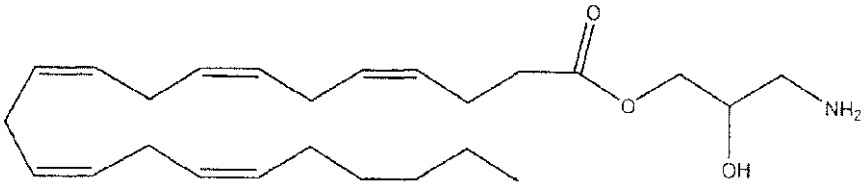

O
O
OH
NH2

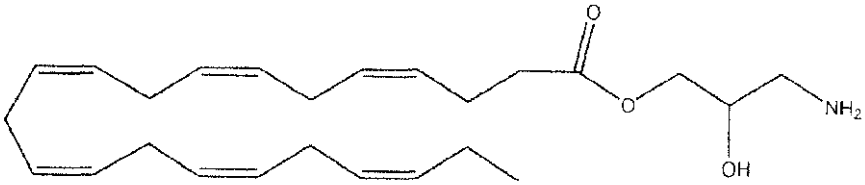

O
O
OH
NH2

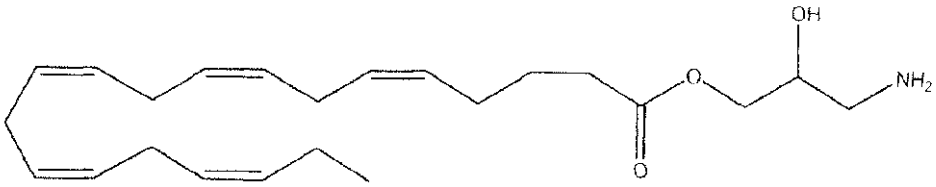

O
O
OH
NH2

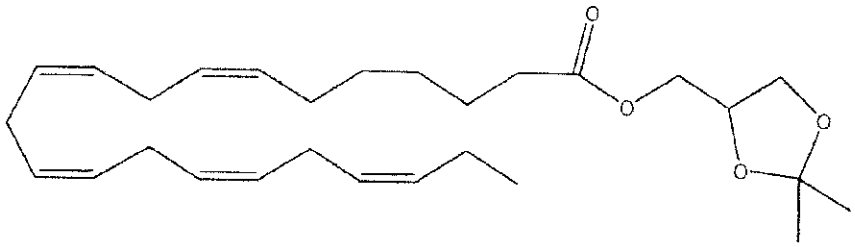

NH2
O
OH
O

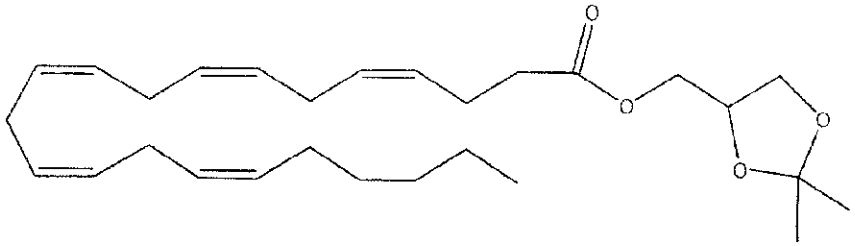

O
O
NH2
OH

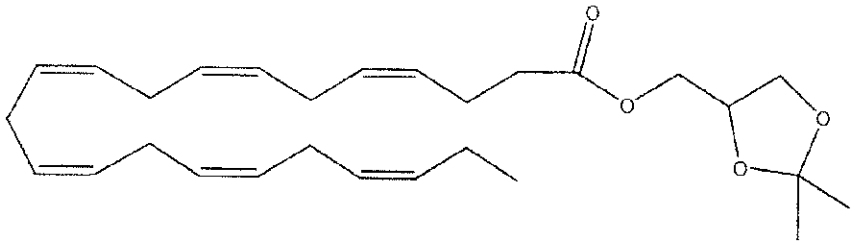

O
O
NH2
OH

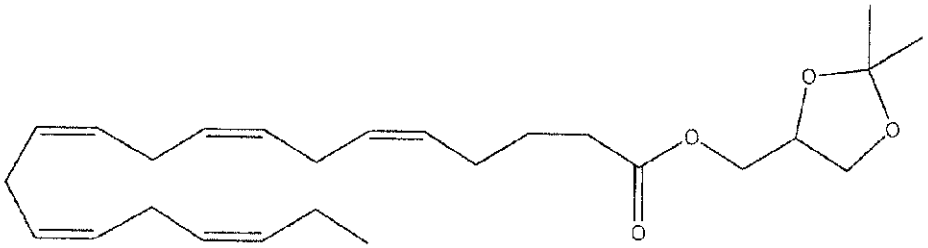

O
O
NH2
OH

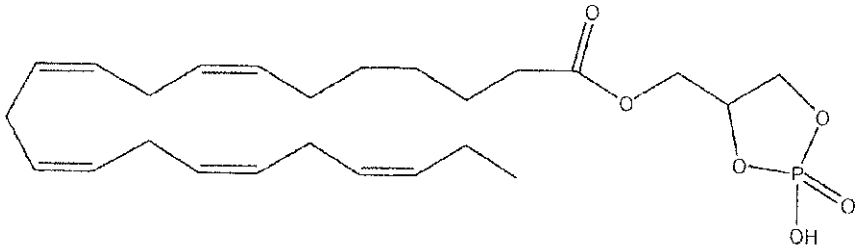

OH
O
NH2
O

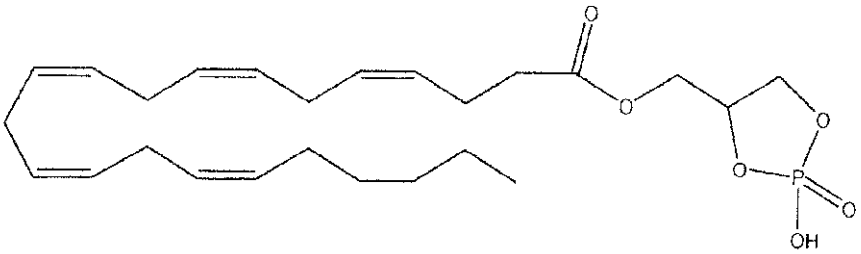


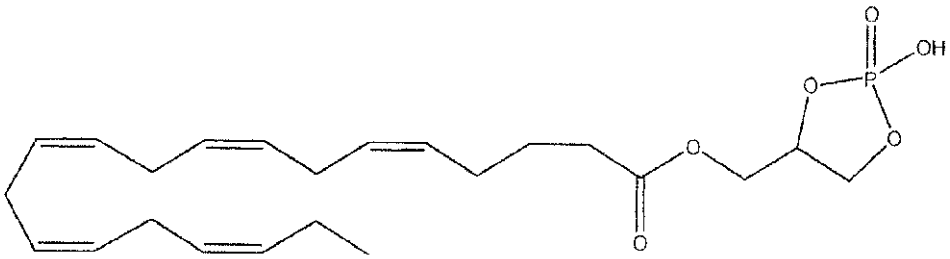


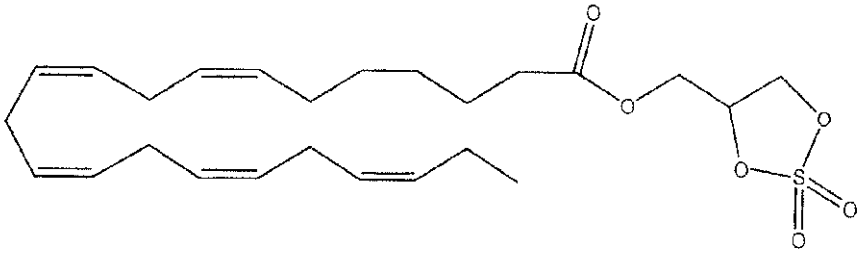


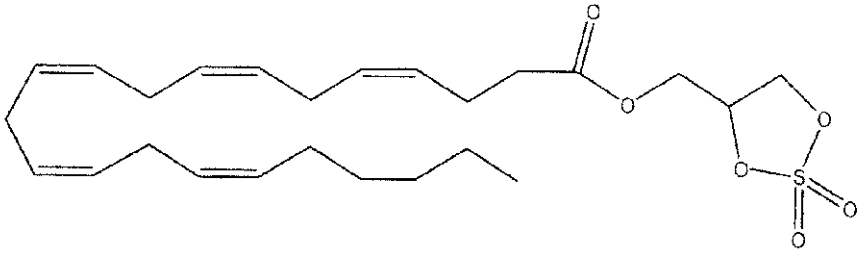


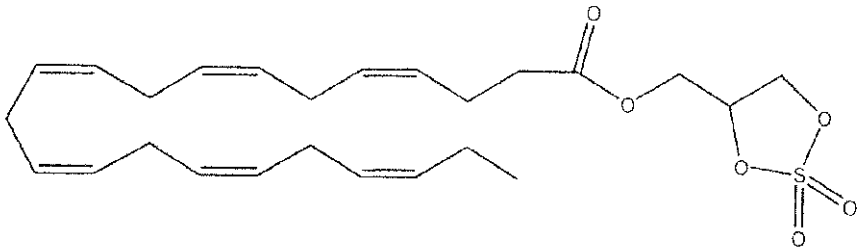


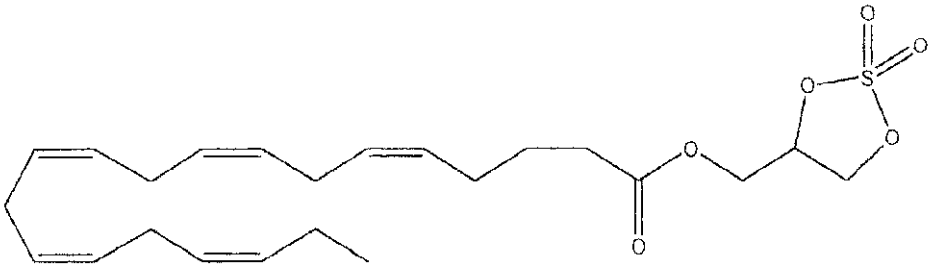












Las composiciones de la invención son según las reivindicaciones 6 a 8.

La presente invención se refiere también a compuestos o composiciones como se define anteriormente para su uso como un medicamento.

Breve descripción de las figuras

Las características y ventajas adicionales de la invención se harán más evidentes de la siguiente descripción de realizaciones específicas como se ilustra a modo de ejemplo en las figuras adjuntas en las que:

La Fig. 1 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo in vitro de una composición según una realización de la presente invención, en la que el ensayo se llevó a cabo en una línea celular de cáncer humano A549;

La Fig. 2 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo in vitro de una composición según una realización de la presente invención, en la que el ensayo se llevó a cabo en una línea celular de cáncer humano PC3;

La Fig. 3 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo in vitro de una composición según una realización de la presente invención, en la que el ensayo se llevó a cabo en una línea celular de cáncer humano HCT-15;

La Fig. 4 es un diagrama que muestra los resultados de un ensayo in vitro de una composición según una realización de la presente invención, en la que el ensayo se llevó a cabo en una línea celular de cáncer humano BT-549;

La Fig. 5 es una curva que representa los resultados de un estudio comparativo de eficacia in vivo de una composición según una realización de la presente invención, en la que el estudio se llevó a cabo en un modelo de xenoinjerto en ratones (NU/NU-Fox1nu); y

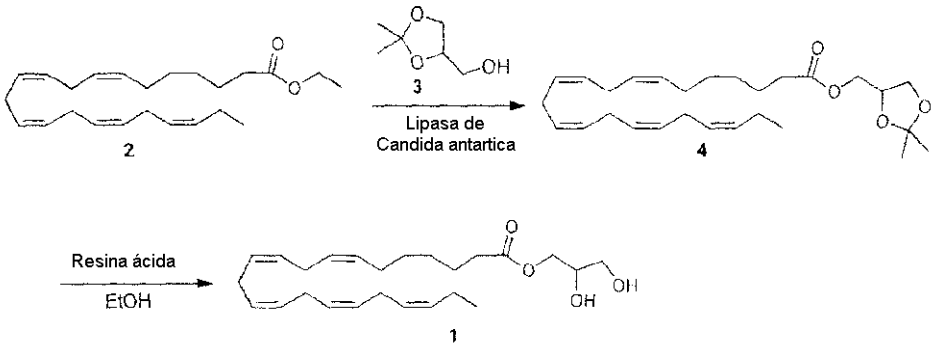
La Fig. 6 es una curva que representa el peso corporal del modelo de ratones (NU/UN-Fox1nu) como función de los días post-inoculación en el estudio de eficacia in vivo de la Fig. 5.

Descripción detallada de la invención

Las características y ventajas adicionales de los compuestos previamente mencionados se harán más evidentes de la siguiente descripción de ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Preparación de monoglicérido **1**

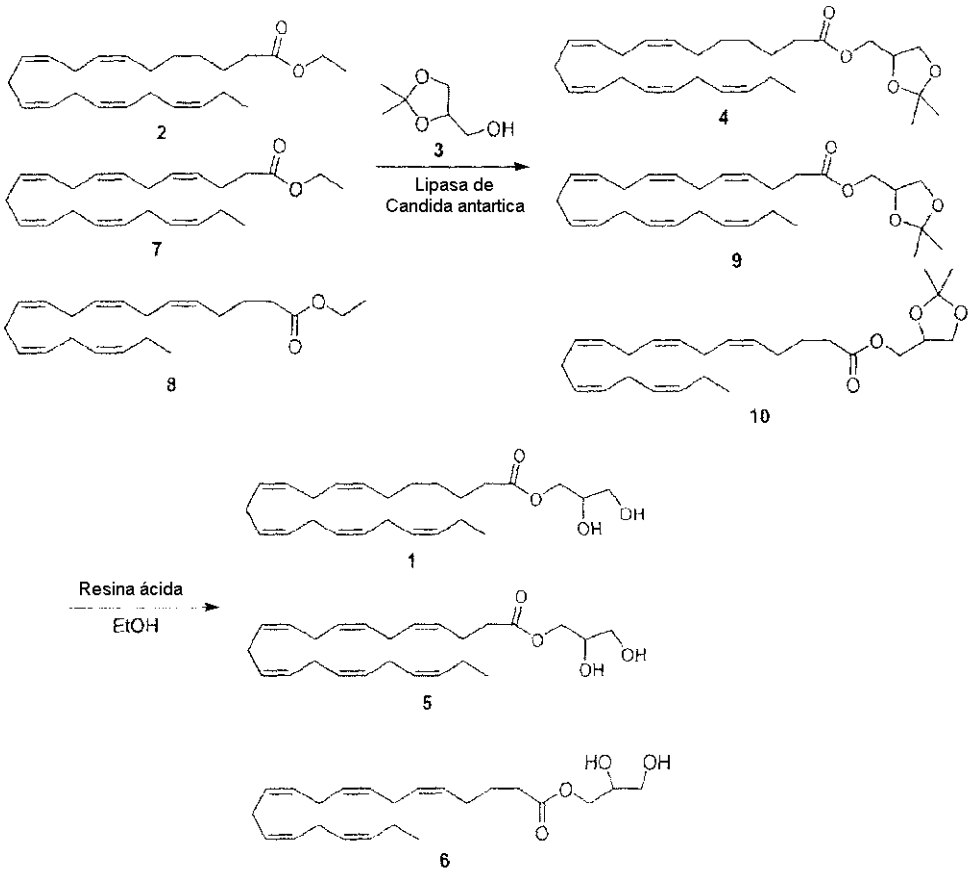


Éster etílico del ácido docosapentaenoico (compuesto **2**) (10 g) y compuesto **3** (6 g) se mezclaron conjuntamente y calentaron a una temperatura de 60ºC. Se añadió la enzima (100 mg) y la mezcla de reacción se agitó a 60ºC a vacío (18 mbar) o con burbujeo de nitrógeno durante 5 h. La mezcla de reacción se filtró y la enzima se lavó con etanol de 95% (20 ml). La resina ácida (500 mg) o ácido orgánico se añadió a la disolución de etanol y se calentó a reflujo durante 18 h. La resina se retiró por filtración y el etanol se evaporó a vacío. El producto en bruto resultante se disolvió en una mezcla de hexanos/acetato de etilo 90:10 (10 ml) y se añadió gel de sílice (40 g). La suspensión se puso en un embudo esmerilado y se eluyó con hexanos/acetato de etilo 90:10 (150 ml) para retirar el material de partida sin reaccionar. Una segunda elución con acetato de etilo (300 ml) dio, después de la evaporación a vacío, el compuesto **1** puro (8,7 g). Se ensayó in vitro en el ensayo de viabilidad celular y en un modelo tumoral de xenoinjerto in vivo.

Los compuestos puros **5** y **6** (véase a continuación) se han preparado también con éxito siguiendo el mismo procedimiento.

Ejemplo 2

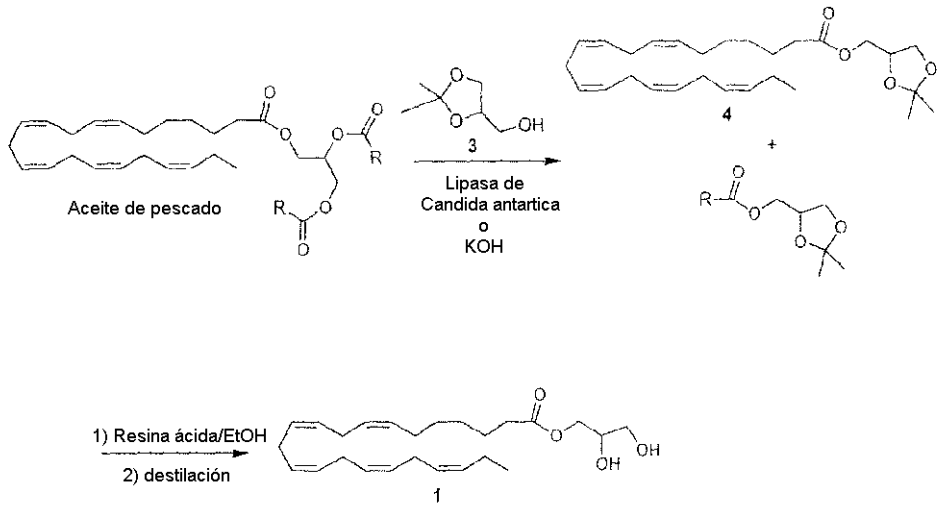
Preparación de una composición (composición **1**) que comprende varios monoglicéridos (compuestos **1, 5** y **6**)



La composición 1 que comprende los compuestos **1, 5** y **6** se preparó según el mismo procedimiento que se describe previamente en el Ejemplo 1. El material de partida era una mezcla de compuestos **2, 7** y **8** a respectivamente (10%, 80% y 10%). Esta composición de material de partida fue vendida por la compañía CRODA™ Chemical Europe Ltd. con el nombre INCROMEGA™ DHA 700 E SR. De este modo, la composición **1** obtenida contiene 10% del compuesto 1, 80% del compuesto **5**, y 10% del compuesto **6**.

Ejemplo 3

Preparación de monoglicérido 1



Un aceite de pescado (que comprende aceite de peces pelágicos) (30 g) y el compuesto 3 (6 g) se mezclaron conjuntamente y se calentaron a una temperatura de 60ºC. Como se ilustra en el esquema de reacción anterior el aceite de pescado puede comprender una pluralidad de triglicéridos. Los dos grupos R, que pueden ser iguales o diferentes, pueden representar la cadena de varios ácidos grasos u otros ácidos orgánicos presentes en tal aceite. En tales triglicéridos, por lo menos un átomo de oxígeno de la cadena principal de glicerol forma un éster con un ácido graso omega-3. Se añadió la enzima (lipasa) (100 mg) o KOH (1.000 mg) y la mezcla de reacción se agitó a 60ºC durante 3 h. La mezcla de reacción se filtró sobre una almohadilla de gel de sílice y la enzima se lavó con etanol de 95% (20 ml). Se añadió la resina ácida (500 mg) o un ácido a la disolución de etanol y se calentó a reflujo durante 18 h. La resina se retiró por filtración y el etanol se evaporó a vacío. El producto bruto resultante se destiló a presión reducida para dar el compuesto puro 1.

Se pueden usar varios otros aceites ricos en ácidos grasos omega-3 y/o omega-6. Por ejemplo, se pueden usar aceites vegetales (como aceite de linaza, aceite de semilla de calabaza, aceite de colza, aceite de soja, aceite de nuez) y aceites marinos (tal como aceite de algas, aceite de microalgas, aceite de fitoplancton, aceite de foca, aceite de krill, aceite de pescado (por ejemplo, aceite de hígado de bacalao, aceite de salmón, aceite de atún, aceite de tiburón, aceite de sardinas, etc.)).

Ejemplo 4

El ensayo de viabilidad celular se realiza para medir el estado relativo de la viabilidad celular de las células de cáncer tras la exposición a los compuestos de ensayo en comparación con un control positivo (etopósido) y un control negativo (vehículo). Las células adherentes que crecen en placas de 96 pocillos se exponen a compuestos de ensayo durante 3 días (72 horas). Se usan cuatro líneas celulares de cáncer, que incluyen los tipos de pulmón, colon, próstata y mama dado que estos tipos de cáncer poseen alta incidencia en seres humanos. Los compuestos de ensayo (composición 1 que comprende los compuestos **1, 5** y **6**), así como los controles positivos y negativos se ensayaron en paralelo en la misma placa de cultivo. Todas las condiciones se ensayan por triplicado. Se usan agentes apoptóticos tales como etopósido o epigallo-catequina-galato como controles positivos para matar células mientras que el disolvente (sulfóxido de dimetilo y agua) se usa como control negativo para la determinación basal. La inhibición de 50% del crecimiento celular en comparación con el estado basal es el límite inferior que indica una respuesta biológica positiva (considerada como un éxito). Después del tiempo de incubación, el contenido total de proteína se cuantifica después de la tinción con el colorante aniónico sulforrodamina B (SRB). La detección de luminiscencia, emitida por SRB, se completa por medio de un lector de microplacas. Este método de detección está basado en trabajos publicados por Monks et al., en el Journal of the National Cancer Institute vol. 82 no. 13 (1991) p. 757, Skehan et al. en el Journal of the National Cancer Institute vol. 82 no. 13 (1990) p. 1107 y Rubinstein et al. en el Journal of the National Cancer Institute vol. 82 no. 13 (1990) p. 1113. La cantidad de luminiscencia es directamente proporcional al número de células vivas en el cultivo.

Las células cancerígenas se cultivaron en matraz T-75 (Falcon) que contiene 20 ml de medio de cultivo apropiado, se subcultivaron dos veces a la semana a 37ºC, 5% de CO_2, 95% de aire y humedad relativa del 100% y se mantuvieron a bajo número de pases (de 5 a 20), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las líneas celulares usadas fueron A-549 (carcinoma de pulmón humano), HCT-15 (adenocarcinoma de colon humano), BT-549 (carcinoma ductal de mama humano) y PC3 (adenocarcinoma de próstata humano). Las células se tripsinizaron usando tripsina al 0,25% (peso/v) / disolución 0,53 mM de EDTA (Hyclone), se contaron y se depositaron a densidades de entre 1.000 y 3.000 células por pocillo en placas transparentes de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson) en 100 µl de apropiado medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (Hyclone). Las placas de cultivo se incubaron a 37ºC, 5% de CO2, 95% de aire y humedad relativa del 100% durante 72 horas. Al 20-30% de confluencia celular, se añadieron 80 µl de medio de cultivo apropiado a cada pocillo. Se añadieron 20 µl de cualquiera de una disolución de compuestos de ensayo en 6 diferentes concentraciones, fármaco para controles positivos (a una concentración de 29 mg/ml) o disolvente (vehículo o agua) para los controles negativos sobre los 180 µl de medio de cultivo para obtener un volumen final de 200 µl. Se incluyeron en cada experimento placas de referencia que contienen el mismo volumen de medio sin células. Las microplacas que contienen las células y los compuestos de ensayo se incubaron a 37ºC, 5% de CO2, 95% de aire y humedad relativa del 100% durante 72 horas. Se estableció una microplaca para cada línea celular como se describe a continuación. Estas cuatro microplacas representaban el crecimiento basal en el tiempo cero. Después de un tiempo de incubación de 72 horas, las células se fijaron con 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 50% (peso/v) frío (4ºC) añadido sobre 200 µl de medio de cultivo. Estas microplacas contenían condiciones del control de crecimiento y ensayo de crecimiento. Las microplacas se dejaron 60 minutos a 4ºC y subsecuentemente se lavaron cinco veces con 200 µl de agua desionizada. Las microplacas se dejaron secar a temperatura ambiente durante por lo menos 24 horas. A todas las microplacas se les agregaron 100 µl de SRB al 0,4% (peso/v) fría disuelta en disolución de ácido acético al 1% en agua añadidos a cada pocillo que contiene células y se dejaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. La SRB sin unir se retiró con lavados sucesivos (cinco veces) con 200 µl de disolución de ácido acético frío al 1% en agua. Todas las microplacas se dejaron secar a temperatura ambiente durante por lo menos 24 horas. La SRB unida a proteínas se solubilizó con la adición de 100 µl de disolución Tris-base 10 mM fría no tamponada (pH 10,5). Las microplacas se dejaron en un agitador de placas durante 5 minutos. Se leyó la absorbancia a 515 nm usando un lector de luminiscencia Multiskan Spectrum de placa de 96 pocillos (Thermo Electron Corporation). Se realizó el análisis de datos con Excel 2003 y SigmaPlot 8.0 o software GraphPadPrism 3.02. El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó usando las medidas de absorbancia [Crecimiento en el tiempo cero (T_0), control de

crecimiento (C) más el crecimiento del ensayo a las concentraciones de fármaco ensayadas (T_i) como sigue: (T_i-T_0)/(C-T_0) x 100]. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 1 a 4.

La Figura 1 representa el ensayo in vitro de la viabilidad celular de seis diferentes concentraciones de composición **1** en la línea celular de cáncer de pulmón humano A-549. El etopósido de control positivo a 294 g/ml muestra el 100% de inhibición del crecimiento. El 50% de inhibición del crecimiento está alrededor de 12,5 µg/ml de la composición ensayada.

La Figura 2 representa el ensayo in vitro de la viabilidad celular de seis diferentes concentraciones de composición **1** en la línea celular de cáncer de próstata humano PC-3. El etopósido de control positivo a 294 g/ml muestra el 100% de inhibición del crecimiento. El 50% de inhibición del crecimiento está alrededor de 6,25 µg/ml de la composición ensayada.

La Figura 3 representa el ensayo in vitro de la viabilidad celular de seis diferentes concentraciones de composición **1** en la línea celular de cáncer de colon humano HCT-15. El etopósido de control positivo a 294 g/ml muestra el 100% de inhibición del crecimiento. El 50% de inhibición del crecimiento está alrededor de 50 µg/ml de la composición ensayada.

La Figura 4 representa el ensayo in vitro de la viabilidad celular de seis diferentes concentraciones de composición **1** en la línea celular de cáncer de mama humano BT-549. El etopósido de control positivo a 294 g/ml muestra el 100% de inhibición del crecimiento. El 50% de inhibición del crecimiento está alrededor de 18,75 µg/ml de la composición ensayada.

Los mismos ensayos se han llevado a cabo en el compuesto **1** sustancialmente purificado y se obtuvieron resultados similares.

Ejemplo 5

El protocolo del modelo de tumor de xenoinjerto in vivo usa dieciocho ratones (NU/NU-Fox1nu). Después de 3 días de aclimatación se identificaron, se pesaron y se seleccionaron al azar en tres cohortes por peso. Los animales recibieron 3 dosis de tratamiento antes de la inoculación de las células MCF-7. La dosificación consistió en 0,5 ml 3 días a la semana durante un total de 7 semanas para cada cohorte. Los ratones recibieron un suplemento de estrógenos vía un implante que se insertó subcutáneamente en la región subescapular 48 horas antes de la inoculación de las células MCF-7. Los animales se pesaron una vez a la semana y los tumores se midieron 2 veces por semana. Se recogieron muestras de sangre (150 ml) una vez antes de iniciar el tratamiento, y subsecuentemente cada 2 semanas después de la inoculación de células y a la terminación. Se recogió plasma, así como el pelet de RBC, se congeló y almacenó a -80ºC. Los animales se observaron para ver el aspecto del desarrollo del tumor. Una vez que se detectaron tumores, los volúmenes tumorales se evaluaron usando la ecuación: V = L (mm) × W2 (mm)/2, en la que W es la anchura y L es la longitud del tumor. Al final del estudio los animales supervivientes se sometieron a eutanasia usando isoflurano y se realizó una punción cardíaca para una extracción de sangre final. Una vez que se detectaron tumores, los volúmenes tumorales se evaluaron usando la ecuación: V = L (mm) × W2 (mm) / 2, en la que W es la anchura y L es la longitud del tumor. Al final del estudio los animales supervivientes se sometieron a eutanasia usando isoflurano y se realizó una punción cardíaca para una extracción de sangre final. Una vez que se detectaron tumores, los volúmenes tumorales se evaluaron usando la ecuación: V = L (mm) × W2 (mm) / 2, en la que W es la anchura y L es la longitud del tumor. Al final del estudio los animales supervivientes se sometieron a eutanasia usando isoflurano y se realizó una punción cardíaca para una extracción de sangre final. Cada animal se marcó en la oreja para identificar su número individual y sus colas se marcaron con el número de jaula. Los animales recibieron comida y agua ad libitum durante el estudio y se alojó 3 animales juntos por jaula. Los resultados obtenidos se muestran en las Figs. 5 y 6.

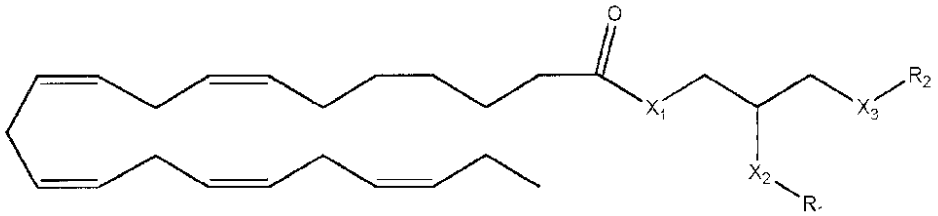
La Figura 5 representa un estudio comparativo de la eficacia in vivo de la composición **1**, un aceite de pescado (peces pelágicos) y un control (aceite de maíz), llevado a cabo en un modelo de xenoinjerto en ratones (NU/NU-Fox1nu). Tanto en el grupo de control positivo (aceite de pescado) como en el grupo de la composición **1**, se observó una cinética tumoral alterada. En ambos casos, la progresión del tumor se redujo y esto se observó en una considerablemente mayor medida para el grupo de composición **1**.

La Figura 6 representa el peso corporal del modelo de ratones (NU/NU-Fox1nu) en el estudio de eficacia in vivo de la composición 1, un aceite de pescado y un control (aceite de maíz). El peso corporal del animal no fue afectado por ninguno de los tratamientos, lo que sugiere que no se observó toxicidad aparente a estas dosis.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a sus realizaciones específicas, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales y esta solicitud se pretende que cubra cualquier variación, uso o adaptación de la invención, siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente descripción como sucede en la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como se puede aplicar a las características esenciales expuestas aquí anteriormente, y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



I

en la que

X_1 es O o NH;

X_2 es O o NH;

X_3 es O o NH;

R_1 y R_2 cada uno independientemente representa –H, -alquilo de C1-C22, -(hidroxi)alquilo de C1-C22, -(amino)alquilo de C1-C22 o –alquenilo de C3-C22,

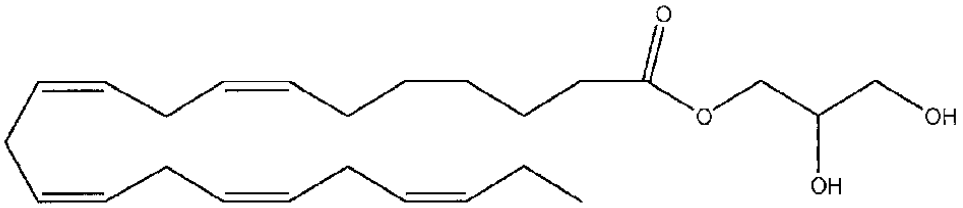
o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R_1 y R_2 cada uno independientemente representa –H, -alquilo de C1-C22, o –alquenilo de C3-C22,

3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que R_1 es –H y R_2 es -H.

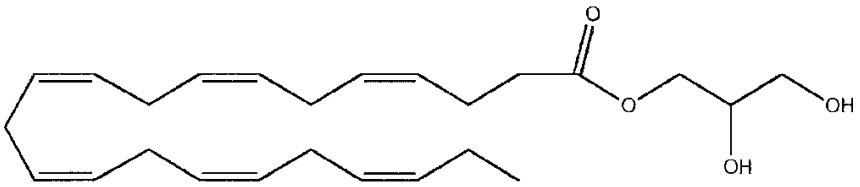
4. El compuesto de la reivindicación 1 o 2, en el que X_1 es O, X_2 es O, y X_3 es O.

5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho compuesto es:

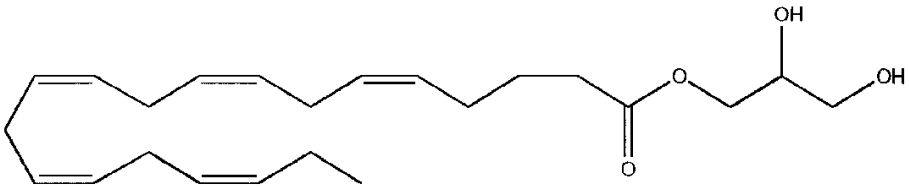


6. Una composición que comprende por lo menos dos compuestos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

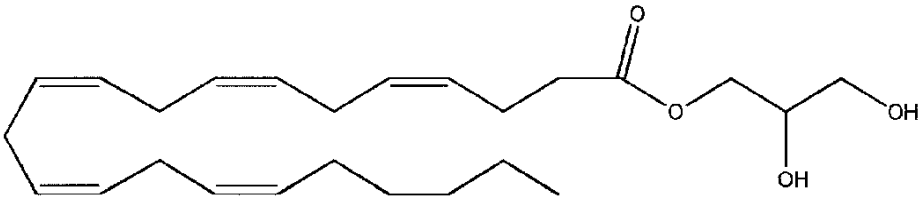
7. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 5 y los compuestos de las siguientes fórmulas:



y



8. Una composición que comprende el compuesto de la reivindicación 5 y



9. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso como medicamento.

10. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso para tratar cáncer.

11. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso para tratar cáncer, siendo dicho cáncer el cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, o cáncer de colon.

12. Un compuesto como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8 para su uso para reducir el crecimiento tumoral.

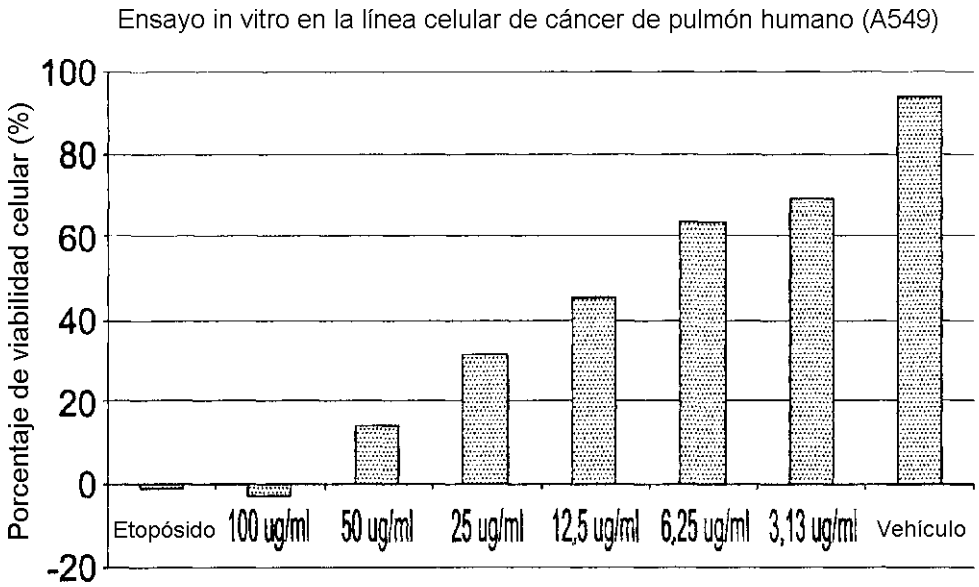

Ensayo in vitro en la línea celular de cáncer de pulmón humano (A549)
Porcentaje de viabilidad celular (%)
100
80
60
40
20
0
-20
Etopósido
100 ug/ml
50 ug/ml
25 ug/ml
12,5 ug/ml
6,25 ug/ml
3,13 ug/ml
Vehículo

FIG. 1

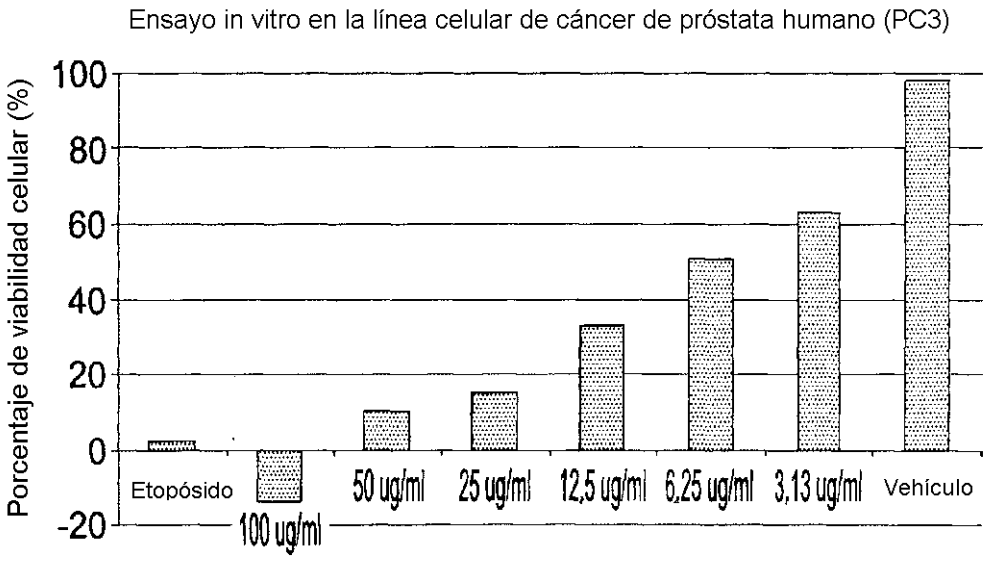

Ensayo in vitro en la línea celular de cáncer de próstata humano (PC3)
Porcentaje de viabilidad celular (%)
100
80
60
40
20
0
-20
Etopósido
100 ug/ml
50 ug/ml
25 ug/ml
12,5 ug/ml
6,25 ug/ml
3,13 ug/ml
Vehículo

FIG. 2

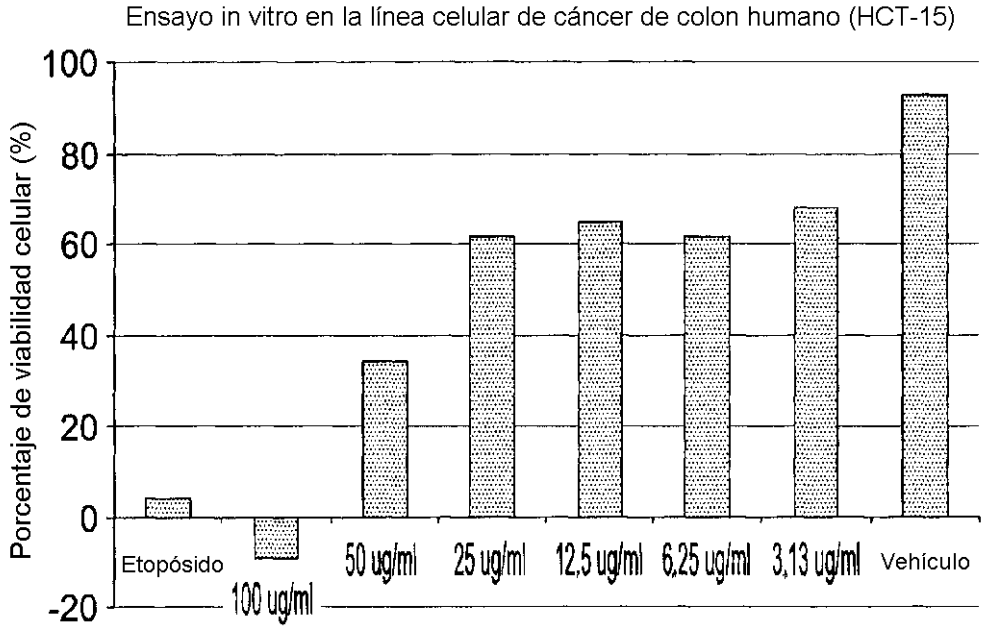

Ensayo in vitro en la línea celular de cáncer de colon humano (HCT-15)
Porcentaje de viabilidad celular (%)
100
80
60
40
20
0
-20
Etopósido
100 ug/ml
50 ug/ml
25 ug/ml
12,5 ug/ml
6,25 ug/ml
3,13 ug/ml
Vehículo

FIG. 3

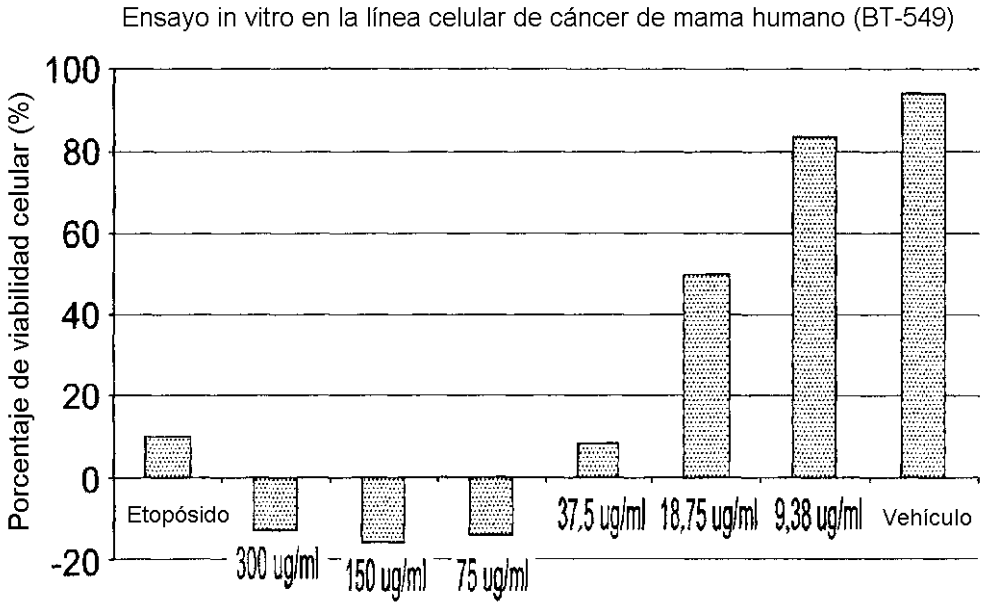

Ensayo in vitro en la línea celular de cáncer de mama humano (BT-549)
Porcentaje de viabilidad celular (%)
100
80
60
40
20
0
-20
Etopósido
300 ug/ml
150 ug/ml
75 ug/ml
37,5 ug/ml
18,75 ug/ml
9,38 ug/ml
Vehículo

FIG. 4

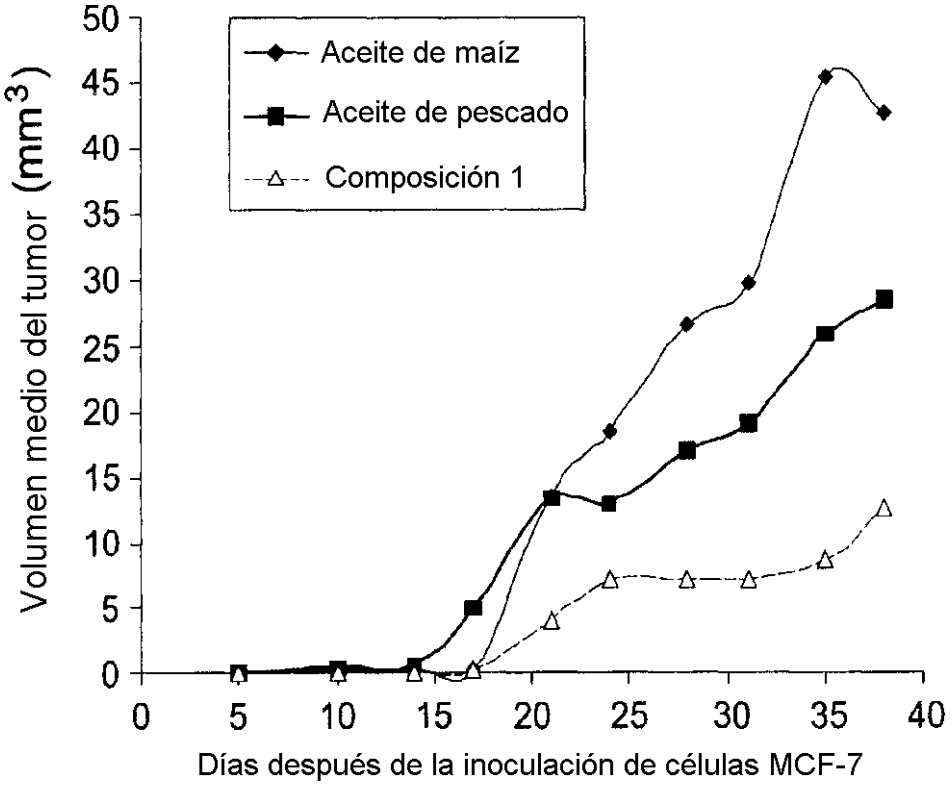

Volumen medio del tumor (mm3)
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Días después de la inoculación de células MCF-7
Aceite de maíz
Aceite de pescado
Composición 1

FIG. 5

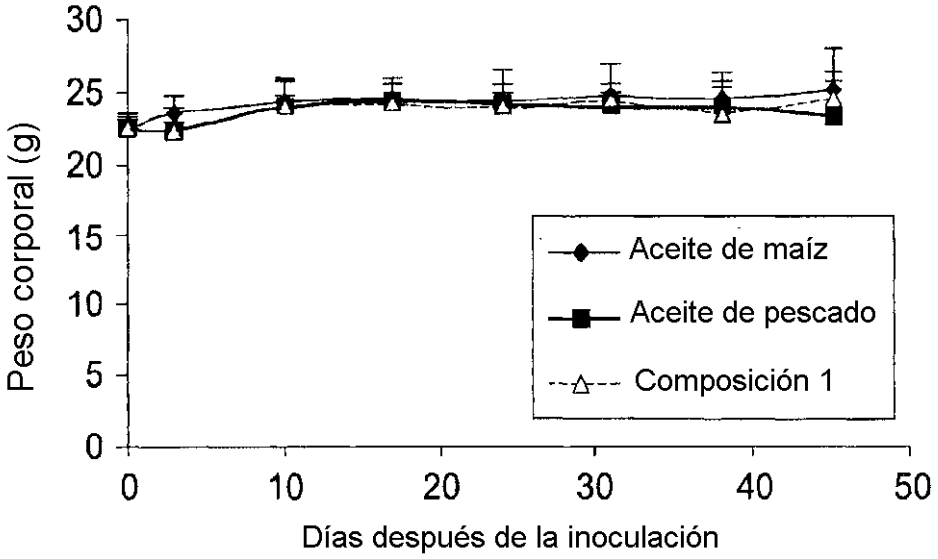

Peso corporal (g)
30
25
20
15
10
5
0
0
10
20
30
40
50
Días después de la inoculación
Aceite de maíz
Aceite de pescado
Composición 1

FIG. 6