

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 927**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7004 (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61K 31/7028 (2006.01)
A61K 31/7008 (2006.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
C07H 11/04 (2006.01)
C07H 15/04 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2011 PCT/EP2011/052351**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.08.2011 WO11101408**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2011 E 11703705 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2536414**

54 Título: **Métodos para prevenir las metástasis cancerosas**

30 Prioridad:

18.02.2010 EP 10305169

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.12.2016

73 Titular/es:

INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
UNIVERSITÉ DE BRETAGNE OCCIDENTALE (U.B.O.) (33.3%) y
UNIVERSITÉ FRANÇOIS-RABELAIS DE TOURS (33.3%)

72 Inventor/es:

VANDIER, CHRISTOPHE;
BOUGNOUX, PHILIPPE;
CHANTOME, AURÉLIE;
CORBEL, BERNARD;
GIRAULT, ALBAN;
HAELTERS, JEAN-PIERRE;
JOULIN, VIRGINIE;
POTIER-CARTEREAU, MARIE y
SIMON, GAËLLE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 594 927 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

Método para prevenir las metástasis cancerosas

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al campo de la medicina, y más especialmente a la prevención y al tratamiento de las metástasis cancerosas.

10 **Estado de la técnica**

Los compuestos contra el cáncer que ya se conocen o comercializados en el mercado, ejercen sus propiedades contra el cáncer de varias maneras, incluyendo a través de la acción directa sobre las células cancerosas. Varios de los agentes contra el cáncer que actúan directamente sobre las células cancerosas bloquean la proliferación de las células cancerosas o son citotóxicos para las células cancerosas.

Sin embargo, incluso después de la eliminación completa o el tratamiento de un cáncer primario, un tumor maligno a menudo metastatiza. Un tumor maligno metastático se forma en un lugar distante de la lesión primaria como resultado de las metástasis del tumor primario. Esta es una de las preocupaciones más importantes en la terapia del cáncer. Específicamente, incluso si una lesión primaria se trata, un paciente puede morir debido al crecimiento de un tumor que se ha metastatizado a otro órgano. En el caso de muchos tipos de cáncer sólido clínicamente diagnosticado (un tipo de tumor que es una lesión primaria resultante del crecimiento local del cáncer), se cree que la obliteración quirúrgica es el primer medio de tratamiento. Sin embargo, después de la operación quirúrgica se observa a menudo metástasis de células cancerosas primarias. La infiltración del cáncer en un sitio metastático se extiende por todo el cuerpo, de modo que el paciente morirá debido al crecimiento del cáncer metastático. Se ha informado que para los organismos individuales que tienen tumores resecables, el crecimiento del tumor primario o recidiva local son a menudo causa de la muerte. Se considera que actualmente casi el 40 % de las víctimas de cáncer con tumores operables finalmente mueren a causa de la enfermedad metastática después de la operación quirúrgica.

Por consiguiente, la metástasis de tumores malignos es la razón más común de las terapias fallidas (ver Bertino et al., (editado en 1996), *Encyclopedia of Cancer*, Academic Press; Devita et al., (editado en 1997), *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, Lippincott, Williams and Wilkins; Cavalli et al., (1996), *Textbook of Medical Oncology*, Dunitz Martin Ltd; Peckham et al., (editado en 1995), *Oxford Textbook of Oncology*, Oxford Univ. Press y Mendelsohn et al., (1995), *The Molecular Basis of Cancer*, Saunders, Filadelfia).

El melanoma maligno, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el cáncer de colon y el cáncer de próstata se consideran como tipos de cáncer que tienden a metastatizar. La gama de metástasis varía en función del tipo de cáncer. Los pulmones y el hígado son bien conocidos como órganos diana del cáncer y el cerebro o la médula ósea son también con una alta frecuencia órganos diana. La metástasis ósea se diferencia de la metástasis a otros órganos, de modo que rara vez amenaza directamente la vida. Sin embargo, la metástasis ósea se complica por un insoportable dolor óseo, la restricción de la actividad física, o similares, con lo que reduce significativamente la calidad de vida (CdV) del paciente causando indirectamente la muerte temprana.

La metástasis es un proceso muy complejo resultante de diversas mutaciones genéticas o epigenéticas y se cree que cada etapa de la metástasis está regulada por vías específicas de transducción de señales intracelulares. Los mecanismos de la invasión inician el proceso metastático y consisten en cambios en la adherencia de células tumorales a las células y a la matriz extracelular, la degradación proteolítica de los tejidos circundantes y la motilidad de una célula tumoral físicamente adecuada a través del tejido, estando todas etapas reguladas específicamente por vías de transducción de señales.

El proceso multi-etapa de la metástasis incluye, (i) la liberación de células malignas de la neoplasia primaria, (ii) la migración de las células cancerosas en circulación, (iii) la adhesión en sitios distantes y (iv) el crecimiento de las células cancerosas diseminadas dentro los vasos o en el tejido después de una extravasación. Cada etapa de proceso requiere diferentes tipos de interacción entre las células cancerosas y el microambiente del hospedador.

Si bien los detalles de los mecanismos por los que la metástasis se produce y por lo tanto puede ser inhibida no han sido completamente dilucidados todavía, sin embargo, es obvio que los mecanismos biológicos implicados en la transformación de una célula no cancerosa en una célula cancerosa son claramente distintos de los mecanismos involucrados en la generación de la metástasis de células cancerosas (Steeg P S, *Nat. Medicine* 2006, vol. 12, (8), 895-904). Por ejemplo obras recientes establecen una clara distinción entre varias rutas celulares que conducen a la proliferación de células cancerosas y los mecanismos de invasión metastática (McLean, G. et al., *Nat. Rev. Cancer* 5, 505-514 (2005); Playford, M. & Schaller, M., *Oncogene* 23, 7928-7946 (2004); Birchmeier, C et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925 (2003)).

65

Además, si bien la identificación de genes específicos de metástasis es difícil debido a la necesidad de varias funciones complementarias que podrían ser cumplidas por diferentes genes en diferentes contextos, actualmente se han identificado más de 20 supresores de metástasis. Los supresores de metástasis actúan por mecanismos diferentes a los de los supresores de tumores y no tienen ningún efecto sobre los tumores primarios. Estos genes inhiben la metástasis sin bloquear la formación de tumores (Rinker-Schaeffer CW et al., Clin Cancer Res 2006;12:3882-89; Berger JC et al., Cancer Biol Ther 2005; 4:805-12; Nash KT et al., Front Biosci 2006;11:647-59; Shevde LA et al., Cancer Lett 2003;198:1-20; Steeg PS et al., Clin Breast Cancer 2003; 4:51-62).

Por lo tanto, es obvio que si se necesitan los mecanismos de orientación de la proliferación y/o de apoptosis a fin de eliminar el tumor primario, es necesario, a fin de lograr una remisión completa, hacer frente diferencialmente a los procesos metastásicos.

De hecho, aunque los agentes anti-cáncer, incluidos los que tienen actividad anti-proliferativa contra células cancerosas, han demostrado eficacia terapéutica contra tumores primarios, casi ninguno de estos agentes anti-cáncer posee concomitantemente actividad anti-metástasis.

Los estudios preclínicos de hecho describen efectos diferenciales de los fármacos sobre la enfermedad primaria y metastásica. Estos datos ilustran que los compuestos validados en la reducción del tamaño del tumor primario pueden no funcionar en la enfermedad metastásica. Por el contrario, la eficacia anti-metastásica puede no estar validada en ensayos basados en la reducción de tamaño del tumor primario (Steeg P S, Nature Medicine, 12 (8), 895-905 (2006); Lang, J.Y. et al. Clin. Cancer Res. 11, 3455-3464 (2005); Shannon, K.E. et al. Clin. Exp. Metastasis 21, 129-138 (2004); Manni, A. et al. Clin. Exp. Metastasis 20, 321-325 (2003); Cairns, R.A. & Hill, R.P. Cancer Res. 64, 2054-2061 (2004); Lovey, J. et al., Strahlenther. Onkol. 179, 812-818 (2003); Nasulewicz, A. et al. Biochim. Biophys. Acta 1739, 26-32 (2004)).

Además, otros estudios han demostrado que los quimioterapéuticos dirigidos al tumor primario pueden alterar las propiedades metastásicas. Por ejemplo, el tratamiento *in vitro* de la línea celular de carcinoma nasal con melfalán se ha demostrado que aumenta su capacidad de invasión (Liang, Y. et al. EUR. J. Cancer 37, 1041-1052 (2001)). Los mecanismos responsables del efecto sobre la metástasis son desconocidos y pueden ser multifactoriales. Hay al menos las dos siguientes posibilidades: (a) que el tratamiento esté acelerando la mutación y ejerciendo una presión selectiva que favorece la aparición de variantes celulares más agresivas o (b) que el estrés asociado con el tratamiento esté induciendo cambios epigenéticos tales como alteraciones en la expresión de genes que mejoran la capacidad de las células para formar metástasis viables (Cairns R. A. & Hill R. P. Cancer Res., 64, 2054-61 (2004)).

Por lo tanto en relación con el desarrollo de fármacos antimetastásicos, el objetivo más interesante son las moléculas de los procesos celulares que controlan la diseminación metastásica sin interferir con el crecimiento del tumor primario.

En los últimos 20 años, algunos equipos se han dedicado a buscar fármacos antimetastásicos "verdaderos" (es decir, dirigidos específicamente contra los procesos metastásicos). Algunos de estos fármacos antimetastásicos, tales como razoxano, inhiben la intravasación de las células metastásicas mediante la elaboración de una barrera física, que no limita el crecimiento del tumor primario (Bergamo et al., Dalton trans., 2007, 13, 1267-1272). La mayoría de ellos inhiben diferentes etapas de colonización (Perret y Crepin, Fundamental and Clinical Pharmacology 2008, 22, 465-92).

Trabajos previos que han mostrado una relación directa entre la capacidad de las células cancerosas a migrar *in vitro* y su capacidad de metastatizar *in vivo*, también han abierto posibilidades para identificar nuevas dianas anti-metastásicas (ver en particular Giamperi et al., 2009, Nature Cell Biology, vol. 11(11): 1287-96; la solicitud de patente US 2003/0054985, Hazan et al., 2000, The Journal of Cell Biology, vol. 148(4): 779-790; Yang et al., 2009, Cancer Cell, vol. 15:124-134).

Un compuesto que ha sido el objeto de pruebas experimentales prometedoras, incluyendo las fases de ensayos clínicos preliminares, es el compuesto alquilglicerilfosfolípido denominado edelfosina (ET-18-OCH₃) (Vogler et al, Cancer Invest, 1998, 16(8):549-53, Candal et al., Cancer Chemother Pharmacol, 1994, 34 (2), 175-8).

Sin embargo, aunque en la técnica se ha descrito que la edelfosina posee efectos antiangiogénicos y posiblemente antiinvasivos, no existe un conocimiento claro de su acción molecular. Por ejemplo, se ha demostrado que la edelfosina ejerce un efecto bifásico sobre la angiogénesis en función de la dosis (Vogler et al, Cancer Invest, 1998, 16(8):549-53, Candal et al., Cancer Chemother Pharmacol, 1994, 34(2), 175-8, Cajate C & F Mollinedo, Current Drug metabolism 2002, 3, 491-525). Por otra parte, otros glicerolípidos estrechamente relacionados, tales como PAF (Andrade S P et al., Int. J. Exp. Pathol., 1992, 73, 503-13) y el butiril-glicerol (Dobson D E, et al., Cell, 1990, 61, 223-30) se han descrito como pro-angiogénicos.

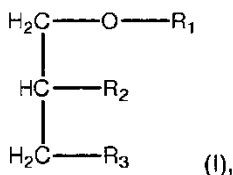
Por otra parte, la edelfosina no es un "verdadero" fármaco antimetastásico, ya que también se dirige al crecimiento del tumor primario y ejerce efectos pro-apoptóticos (Gajate C y Mollinedo F, Curr. Drug Metab. 3, 491-525; Nieto-Miguel et al., 2007, Cancer Res, 67(31); Estella-Hermoso de Mendoza et al., 2009, Clin Cancer Res, 15 (3), 858-864).

Por último, la edelfosina es bien conocida por ser altamente tóxica cuando se administra al ser humano y su uso terapéutico clínico se ha visto notablemente obstaculizado por efectos secundarios adversos importantes (Gajate C y Mollinedo F, Curr. Drug Metab. 3,491-525).

Por tanto, existe todavía una necesidad en la técnica de métodos para inhibir la metástasis tumoral y, en particular, de métodos que inhiben la metástasis sin causar efectos secundarios graves en el paciente con cáncer tratado.

Objeto de la invención

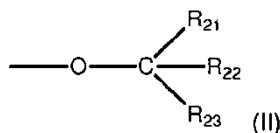
La presente invención se refiere a un glicerolípido de fórmula (I)



en la que:

- R₁ es un grupo alquilo o alquenoilo que tiene de 16 a 18 átomos de carbono,
- R₂ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un grupo de fórmula (II):



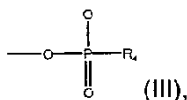
en la que R₂₁, R₂₂ y R₂₃, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en átomo de hidrógeno y un grupo alquilo que tiene 1 o 2 átomos de carbono, y

(b) un hidroxilo,

y

- R₃ se selecciona del grupo que consiste en:

- un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido, o
- un grupo de fórmula (III)



en la que R₄ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido, para su uso en la prevención de la metástasis cancerosa sin efecto sobre el crecimiento del tumor primario.

Esta invención se puede usar en un método para prevenir la metástasis cancerosa que comprende una etapa de administrar a un paciente en necesidad del mismo un glicerolípido de fórmula (I) como se describe anteriormente.

Un glicerolípido de fórmula (I) abarca los compuestos de fórmula (A) a (P) como se detalla en la descripción general de la invención en la presente memoria.

Esta invención también se refiere a una composición farmacéutica para prevenir la metástasis cancerosa que comprende un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente, en la que R₃ es un grupo de fórmula (III), en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Finalmente, la presente invención pertenece a un glicerolípido de fórmula (I), en la que R₃ es un grupo de la fórmula (III) anterior *per se*.

Descripción de las figuras

Figura 1: ilustra un esquema de síntesis del compuesto intermedio A que es un precursor de glicerol-lípido útil para la obtención de un compuesto de fórmula (I) y especialmente un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ denota un grupo monosacárido o polisacárido. Este esquema se denomina “esquema 1” en la presente memoria.

5 **Figura 2:** ilustra un esquema de síntesis del compuesto intermedio B que es un derivado glicopiranosilo con un grupo hidroxilo libre en la posición 6, útiles para la obtención de un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ denota un grupo monosacárido o polisacárido. Este esquema se denomina “esquema 2” en la presente memoria.

10 **Figura 3:** ilustra un esquema de síntesis del compuesto intermedio C que es una 6-O-acetil-2'3'4-tri-O-bencil-D-galactopiranososa, útil para la obtención de un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ denota un grupo monosacárido o polisacárido. Este esquema se denomina “esquema 3” en la presente memoria.

Figura 4: ilustra un esquema de síntesis de un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ denota un grupo monosacárido o polisacárido, haciendo reaccionar el compuesto C con el compuesto B. Este esquema se denomina “esquema 4” en la presente memoria.

15 **Figura 5:** ilustra un esquema de síntesis de un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ es de fórmula (III) y en la que R₄ denota un grupo monosacárido o polisacárido. Este esquema se denomina “esquema 5” en la presente memoria.

20 **Figura 6:** actividad de JPH1701 (u Ohmline) en la motilidad celular en células MDA-MB-435S cancerosas y en células MCF-10A no cancerosas. La motilidad se ensayó mediante un ensayo transpocillo. Además, las pruebas de viabilidad se realizaron mediante ensayos de MTT. **Fig. 6A-B)** JPH1701 (las concentraciones de JPH1701, para la fig. 6A, son 0 (condición control), 10 nM, 100 nM, 300 nM y 1 µM) reduce la motilidad (Fig. 6A) de células MDA-MB-435s de tipo natural (WT) desde 10 nM sin afectar a la viabilidad (Fig. 6B) salvo a 10 µM. **Fig. 6C-D)** la motilidad (Fig. 6C) y la viabilidad (Fig. 6D) de MCF-10A no se ven afectadas por JPH1701 (las concentraciones de JPH1701, para la fig. 6C, son 0 (condición control), 10 nM, 100 nM, 300 nM y 1 µM). **Fig. 6E-F)** Efecto sobre la motilidad dependiente de SK3. La Figura 6E muestra que la motilidad de MDA-MB-435s shRD = células SK3+ que expresan SK3 se ve afectada por JPH1701 (las concentraciones de JPH1701 son 0 (condición control), 10 nM, 100 nM, 300 nM y 1 µM). Por el contrario, como se muestra en la Fig. 6F, JPH1701 no afecta a la capacidad de migración de MDA-MB-435s shSK3 que no expresa SK3, exceptuando a 1 µM donde se muestra un efecto no específico de JPH1701 (las concentraciones de JPH1701 son 0 (condición control), 10 nM, 100 nM, 300 nM y 1 µM).

30 **Figura 7:** Efectos de una aplicación de 24 horas de JPH1701 a 1 µM sobre la corriente de la célula entera en MDA-MB-435s de tipo natural (WT). **Fig. 7A)** Ejemplos de corrientes registradas en MDA-MD-435s. En la parte superior, la corriente se registró en MDA-MB-435s en la condición control. En la parte inferior, la corriente era representativa de una célula que se trató con JPH1701 1 µM durante 24 horas. **Fig. 7B)** Efectos de JPH1701 sobre las corrientes sensibles a apamina. Las células se incubaron con JPH1701 a 1 µM durante 24 horas y a continuación las corrientes se midieron en ausencia o con apamina, un bloqueador específico del canal SK3/KCa2.3. Los histogramas muestran la amplitud de las corrientes inhibidas por apamina. Después del tratamiento con JPH1701, se eliminó la corriente sensible a apamina.

35 **Figura 8: Efecto de JPH1701 sobre la actividad del canal SK3.**
Fig. 8A) Efecto de la dosis y respuestas en el tiempo de 3 dosis diferentes (300 nm, curva superior; 1 µM, curva media y 10 µM curva inferior) de JPH1701 sobre la corriente de SK3 registra a 0 mV. *indica que es significativamente diferente del control en p <0,05. **Fig 8B)** Histogramas que muestran el efecto independiente dosis de JPH1701 para obtener 50 % de inhibición de la corriente (las concentraciones de JPH 1701 son 10, 1 y 0,3 µM). Los resultados se expresan como la media ± E.E.M. **Fig.8C)** Histogramas que muestran el efecto de la mezcla de hexadeciloxi-2-O-metil-sn-glicerol-lactosa racémica (JPH1701 u Ohmline, es decir: JPH1701 en el ejemplo) y de los dos enantiómeros (R-JPH1701 y S-JPH1701) sobre la actividad de SK3. Los porcentajes de inhibición representan la relación amplitud de la corriente de SK3 y conductancia de cuerda (en presencia de JPH1701 10 µM) / amplitud de la corriente en SK3 en los experimentos de control. Las barras negras muestran la corriente a 0 mV y las barras grises indican la conductancia de cuerda. **Fig. 8D)** Efecto dosis-respuesta de la forma + de JPH1701 (concentraciones: 0 (control), 0,3, 1 y 10 µM). Columnas, media, barras, EEM, (5 células para la mezcla racémica y 4 células para las formas + y -). **Fig. 8E)** Histograma que muestra el % de control de unión específica de ¹²⁵I-Apamina (7 pM) al canal SKCa obtenida a partir de homogeneizados de membrana de la corteza cerebral con JPH1701 0,3 y 2 µM.

50 **Figura 9:** Efecto de la selectividad de JPH1701 sobre los canales de subtipo SKCa e IKCa. **Fig. 9A)** Ejemplo de corrientes de K⁺ en toda la célula registradas en las células HEK293 que expresan canales SK1, SK2, SK3 e IKCa recombinantes antes y después de la aplicación de JPH1701 10 µM (gráficos superiores: SK1 y SK2 respectivamente, gráficos inferiores: SK3 e IKCa respectivamente). Las corrientes se generaron mediante un protocolo de rampa desde -100 mV hasta +60 mV en 500 ms con mantenimiento constante de 0 mV y con un pCa 6. **Fig.9B)** Histogramas que muestran el efecto de JPH1701 10 µM sobre las amplitudes de corriente en SKCa (SK1, SK2, SK3) e IKCa registradas a 0 mV. Los resultados se expresan como la media ± EEM. *indica significativamente diferente del control con p <0,05. Para cada canal (SK1, SK2, SK3 e IKCa) la columna de la izquierda (gris claro) representa el resultado del control y la columna de la derecha (gris oscuro) representa el resultado después de la aplicación de JPH1701.

60 **Figura 10:** Efecto antimetastásico de JPH1701 en el modelo experimental de metástasis. Dos millones de células MDA-MB-435s-luc pretratadas durante 24 horas con JPH1701 (1 µM) o vehículo se injertaron en la almohadilla de grasa mamaria (MFP) de ratones NMRI/desnudos. Los ratones se trataron tres veces por semana con

JPH1701 a 15 mg/kg en inyección i.v. o con vehículo durante todos los experimentos (14-15 semanas). El tumor primario se extirpó quirúrgicamente cuando su volumen alcanzó 500 mm³ (6-7 semanas después del injerto). Los ratones fueron sacrificados después de 7-8 semanas después de la extirpación quirúrgica del tumor primario.

Fig. 10A-B) BLI (bioluminiscencia) *in vivo* de metástasis de los ratones tratados con vehículo (fig. 10A) o con JPH1701 (fig.10B) antes de la eutanasia. **Fig. 10C)** Número de tejidos con metástasis detectadas *ex vivo* por bioluminiscencia (incluyendo los ganglios linfáticos, pulmones, raquis y hueso de la pata) después de la eutanasia. **Fig. 10D)** Puntuación metastásica de los ratones tratados con vehículo o con JPH1701. Para evaluar la puntuación metastásica de cada ratón, se utilizaron dos parámetros: (i) Número de tejido u órgano con metástasis detectadas *ex vivo* por BLI y (ii) intensidad de BLI (fotón/min) de cada metástasis. Las cajas indicaban el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil, los cuadrados indicaban la media. El análisis estadístico, realizado con el software Sigma Stat se realizó usando la prueba de la suma de rangos. La diferencia entre ambas cohortes de ratones es significativamente diferente. **Fig. 10E)** Porcentaje de ratones que muestran metástasis *in vivo* como una función de tiempo. Los datos se normalizaron asumiendo el número de ratones con metástasis en la semana 12 (punto final) como 100 %. El panel superior muestra los resultados obtenidos en el sub-grupo de ratones control que han recibido una composición de placebo (vehículo). El panel inferior muestra los resultados obtenidos con los ratones que han recibido JPH1701. Una comparación entre los resultados representados en los paneles superior e inferior muestra que el desarrollo de metástasis se retrasaba o no existía en los ratones tratados con JPH1701. **Fig. 10F)** Gráfico que representa el desarrollo de metástasis en ambas cohortes: curva superior con círculos rellenos: subgrupo de ratones control que han recibido una composición de placebo (vehículo); curva inferior con círculos vacíos: ratones que han recibido JPH1701. La puntuación de cada cohorte (suma de la puntuación individual) representa el grado de desarrollo metastásico evaluado *in vivo* por BLI.

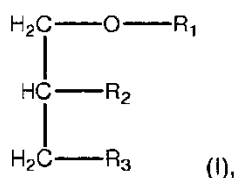
Figura 11: Efectos de JPH1701 sobre el receptor PAF, actividades PLC y PKCs. **Fig. 11A)** Histograma que muestra el porcentaje de unión específica de 3H-C16-PAF control al receptor PAF recombinante obtenida a partir de homogeneizados de membrana de células CHO con edelfosina 0,3 y 2 μM y con JPH1701 0,3 y 2 μM. **Fig. 11B)** Histograma que muestra el porcentaje de respuesta agonista control (% de efecto, es decir, aumento de la concentración de calcio intracelular) de edelfosina 0,3 y 2 μM y JPH1701 en el receptor PAF normalizado para a la respuesta inducida por C16-PAF 100 nM. Se determinó la CI₅₀ para edelfosina y JPH1701. *Indica significativamente diferente del control en p <0,05. **Fig.11C-D)** Curvas de respuestas a la dosis que muestran el efecto de JPH1701 sobre las actividades de las PKC (Fig.11C, las PKC son: Alfa, Beta 1, Beta 2, Gamma, Delta, Epsilon, Zeta, Eta, Theta, Iota) y fosfolipasa C (PLC) (fig. 11D).

Figura 12: El tratamiento con JPH1701 no afectó al crecimiento del tumor primario en el tumor del modelo de almohadilla de grasa mamaria (MFP). Dos millones de células MDA-MB-435s-luc pretratadas durante 24 horas con JPH1701 (1 μM) o vehículo se injertaron en la almohadilla de grasa mamaria (MFP) de ratones NMRI/desnudos. Los ratones se trataron tres veces por semana con JPH1701 a 15 mg/kg en inyección i.v. o con vehículo. **Figura 12A)** Evolución temporal de volumen del tumor. Los tumores primarios se midieron dos semanas después del injerto, cada semana, durante 6 semanas en tres dimensiones con un calibre y se calculó el volumen tumoral (círculos negros: vehículo, círculos abiertos: JPH1701). **Figura 12B)** Evolución temporal de la BLI del tumor. Dos semanas después del injerto se evaluó el número de células cancerosas en el tumor primario semanalmente durante 6 semanas por BLI (círculos negros: vehículo, círculos abiertos: JPH1701). No se observó diferencia entre la cohorte de control y la cohorte de ratones tratados con JPH1701.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado según la invención que una familia específica de compuestos glicerolípido, que tienen la fórmula (I) descrita a continuación, poseen propiedades antimetastásicas específicas por lo menos contra las células tumorales que expresan el canal SK3/KCa2.3

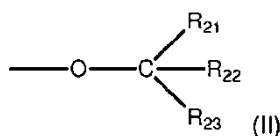
Por lo tanto, esta invención se refiere a un glicerolípido de fórmula (I)



en la que:

- R₁ es un grupo alquilo o alquenoilo que tiene de 16 a 18 átomos de carbono,
- R₂ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en:

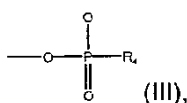
(a) un grupo de fórmula (II):



5 en la que R_{21} , R_{22} y R_{23} , independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en átomo de hidrógeno y un grupo alquilo que tiene 1 o 2 átomos de carbono, y (b) un hidroxilo, y

10 – R_3 se selecciona del grupo que consiste en:

- un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido, o
- un grupo de fórmula (III)



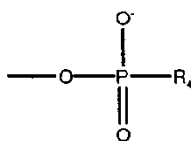
15 en la que R_4 se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido, para su uso en la prevención de la metástasis cancerosa sin efecto sobre el crecimiento del tumor primario.

20 También, la presente invención se refiere al uso de un glicerolípido de la fórmula (I) anterior para la prevención de la metástasis cancerosa.

25 Esta invención se puede usar en métodos para la prevención de la metástasis en un paciente con cáncer en necesidad del mismo que comprende una etapa de administrar a dicho paciente una glicerolípido de la fórmula (I) anterior, o una composición farmacéutica que comprende dicho glicerolípido de la fórmula (I) anterior. Según la invención, la prevención de la metástasis abarca la evitación de la propagación de las células del tumor primario a lugares distantes.

30 Se ha encontrado según la invención que los compuestos de fórmula (I) inhiben la actividad del canal de potasio SK3/KCa2.3 y que dicha actividad inhibitoria en el canal de SK3/KCa2.3 contribuye o incluso explica totalmente sus propiedades antimetastásicas.

35 Más concretamente, se ha encontrado que los compuestos de fórmula (I), que tienen una longitud de ácido graso de al menos 16 átomos de carbono en sn-1 (R_1) y un disacárido en sn-3 (R_3) eran muy eficaces. Los análogos del hexadeciloxi-2-O-metil-sn-glicerol (HMG) que tienen una longitud de ácido graso de al menos 16 átomos de carbono en sn-1 (R_1) y donde R_3 (Sn-3) consiste en:



40 y en la que R_4 se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido (compuestos M, N, O y P, por ejemplo) también se han mostrado como potentes inhibidores de los canales SK3/KCa2.3.

45 Para determinar si el canal SK3/KCa2.3 era esencial en el efecto inhibitor de la migración de las células cancerosas de los compuestos de fórmula (I), el ARNm del SK3/KCa2.3 fue anulado por transfección de las células con dos juegos de ARNs del gen de SK3/KCa2.3 gen o con ARNs mezclados como control negativo en la línea celular MDA-MB-435s, de acuerdo con métodos ya descritos en la Solicitud de patente europea N.º EP 1 884 774 publicado el 6 de febrero de 2008 en nombre del INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale).

50 La misma confirmación de que el SK3/KCa2.3 era esencial en el efecto inhibitor de la migración de células cancerosas de los compuestos de fórmula (I) se obtuvo después de la infección de células cancerosas que expresan SK3/KCa2.3 con un lentivirus que contiene un ARNsh dirigido contra el ARNm de SK3/KCa2.3.

55 En primer lugar, se encontró que la anulación del canal SK3/KCa2.3 reducía el número de células migradoras MDA-MB-435s. Además, y lo que es más importante, se encontró que la anulación del canal SK3/KCa2.3 suprimía

totalmente el efecto inhibitor de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención sobre la migración celular.

5 Aún más, se ha encontrado que las células humanas SK3/KCa2.3 negativo que han sido posteriormente transfectadas con ADNc de SK3/KCa2.3 humano se convertían en sensibles al efecto inhibitor de los compuestos de fórmula (I). En particular, se ha encontrado que los compuestos de fórmula (I) inhiben la migración de las células transfectadas con ADNc de SK3/KCa2.3, mientras que la migración de las mismas células SK3/KCa2.3 negativo antes de la transfección con ADNc de SK3/KCa2.3 no se inhibía por los compuestos de fórmula (I).

10 También se ha encontrado que los compuestos de la fórmula (I) anterior fueron capaces de dirigirse selectivamente a aquellas células cancerosas metastatizantes que sufren migración desde el sitio del tumor primario.

Además, se ha encontrado que un glicerolípido de fórmula (I) tiene efectos anti-metastásicos *in vivo*.

15 Estos resultados experimentales mostrados en los ejemplos en la presente memoria confirman plenamente trabajos anteriores, según los cuales existe una relación directa entre la capacidad de una sustancia para inhibir la migración *in vitro* de las células cancerosas y la capacidad de la misma sustancia para comportarse *in vivo* como un agente antimetastásico.

20 Como se muestra en los ejemplos de la presente memoria, los glicerolípidos de fórmula (I) son de un gran interés terapéutico en general para la prevención de la metástasis en pacientes con cáncer.

25 Una propiedad adicional importante de los glicerolípidos de fórmula (I) consiste en su baja citotoxicidad, lo que significa que la administración de estos glicerolípidos a pacientes con cáncer no causará toxicidad indeseable a dicho paciente. De hecho, se muestra que, en cantidades de un glicerolípido de fórmula (I) que son eficaces para la inhibición de la metástasis cancerosa *in vivo*, dicho glicerolípido de fórmula (I) no causa un efecto adverso *in vivo*.

30 Además, se ha demostrado que un glicerolípido de fórmula (I) es un "verdadero" fármaco antimetastásico ya que no tiene efecto sobre el crecimiento del tumor primario. Los resultados de los ejemplos en la presente memoria muestran claramente que un glicerolípido de fórmula (I), cuando se administra *in vivo* en un modelo animal de metástasis cancerosa es (i) no tóxico, (ii) antimetastásico y (iii) no tiene efecto sobre el crecimiento del tumor primario. Esta especificidad probablemente conducirá a una mejor tolerancia en comparación con los compuestos no específicos. La orientación de los procesos celulares que controlan la diseminación metastásica también puede ser una estrategia de consolidación de la remisión prometedor, especialmente en los casos en los que la carga del tumor primario se puede extirpar mediante cirugía. La especificidad y la no toxicidad son propiedades altamente valiosas de glicerolípidos de fórmula (I), ya que, como es conocido por el experto en la materia, los pacientes con cáncer están ya debilitados tanto por la enfermedad como por las terapias anticancerosas generales contra los tumores primarios y estos pacientes son muy sensibles a los efectos adversos que puedan ser causados por cualquier tratamiento preventivo o terapéutico adicional, incluyendo cualquier tratamiento adicional destinado a prevenir o tratar la aparición de metástasis.

45 En particular, se ha demostrado en los ejemplos de la presente memoria que los compuestos de fórmula (I) poseen una actividad citotóxica muy inferior tanto hacia las células cancerosas como no cancerosas, en comparación con agentes anticancerosos estructuralmente relacionados conocidos, incluyendo agentes anticancerosos estructuralmente muy relacionados conocidos como edelfosina que tienen tanto efectos antiapoptóticos como antimetastásicos.

50 De forma ilustrativa, en la presente memoria se ha demostrado que edelfosina presenta una CI_{50} de menos de 5 μM después de un tiempo de incubación *in vitro* de 24 horas con líneas de células cancerosas metastásicas, mientras que los compuestos de fórmula (I) poseen todos una CI_{50} de más de 10 μM hacia las mismas células cancerosas metastásicas. Varios de los compuestos de fórmula (I) que han sido ensayados para determinar la citotoxicidad *in vitro* presentan una CI_{50} de más de 50 μM , presentando algunos de ellos una CI_{50} de más de 100 μM .

55 En la presente memoria, la expresión "baja citotoxicidad" indica que el compuesto de interés presenta una CI_{50} de más de 10 μM después de un período de tiempo de 24 horas de incubación del compuesto de ensayo con las células diana, cuando se mide en un ensayo de viabilidad *in vitro*. Los ensayos de viabilidad *in vitro* convencionales que se pueden emplear incluyen (i) ensayo de azul de tripano y (ii) ensayo de MTT. Para evaluar el valor "citotoxicidad" de un compuesto con el propósito de la presente invención, el ensayo de MTT se usa preferiblemente como el ensayo de referencia.

60 En consecuencia, los glicerolípidos de fórmula (I) consisten en agentes antimetastásicos de baja citotoxicidad. Tal como se pretende en la presente memoria, un compuesto de baja citotoxicidad, un glicerolípido de fórmula (I) tiene un valor CI_{50} de más de 10 μM . Un valor CI_{50} de más de 10 μM abarca un valor CI_{50} de más de 11 μM , 12 μM , 13 μM , 14 μM , 15 μM , 16 μM , 17 μM , 18 μM , 19 μM , 20 μM , 21 μM , 22 μM , 23 μM , 24 μM , 25 μM , 26 μM , 27 μM , 28 μM , 29 μM , 30 μM , 31 μM , 32 μM , 33 μM , 34 μM , 35 μM , 36 μM , 37 μM , 38 μM , 39 μM , 40 μM , 41 μM , 42 μM , 43 μM , 44 μM , 45 μM , 46 μM , 47 μM , 48 μM , 49 μM , 50 μM , 51 μM , 52 μM , 53 μM , 54 μM , 55 μM , 56 μM , 57 μM , 58

µM, 59 µM, 60 µM, 61 µM, 62 µM, 63 µM, 64 µM, 65 µM, 66 µM, 67 µM, 68 µM, 69 µM, 70 µM, 71 µM, 72 µM, 73 µM, 74 µM, 75 µM, 76 µM, 77 µM, 78 µM, 79 µM, 80 µM, 81 µM, 82 µM, 83 µM, 84 µM, 85V, 86 µM, 87V, 88 µM, 89 µM, 90 µM, 91 µM, 92 µM, 93 µM, 94 µM, 95 µM, 96 µM, 97 µM, 98 µM, 99 µM y 100 µM o más de 100 µM.

5 De forma ilustrativa, para la evaluación de la citotoxicidad de un compuesto dado puede realizarse el ensayo de MTT utilizando, como los principales reactivos, (1) una solución de MTT en la que MTT se disuelve en medio de Eagle modificado por Dulbecco con 5 % de suero bovino fetal a una concentración final de 0,5 mg/ml. En las células, MTT se transforma en cristal de formazano que se disolverá con dimetilsulfóxido puro. Brevemente, el ensayo de MTT puede comprender las siguientes etapas:

- 10 (a) sembrar las células diana en una placa de 24 pocillos con el número de células apropiado, por ejemplo, con un número definido de células por pocillo (40.000 células por pocillo) y dejando los pocillos de control sin células (utilizado como control para la absorbancia mínima),
- 15 (b) incubar la placa durante la noche a 37 °C en una incubadora humidificada, 5 % de CO₂,
- (c) añadir el compuesto de ensayo a la placa y que incluye repeticiones para un intervalo de concentraciones. Incluir controles negativos (incluyendo el control de vehículo) y un control positivo (por ejemplo, agua destilada).
- (d) incubar la placa durante el período de tiempo deseado a 37 °C en una incubadora humidificada, 5 % de CO₂,
- (e) añadir el reactivo MTT, por ejemplo 800 µl por pocillo de la placa de 24 pocillos,
- 20 (f) incubar a 37 °C durante el período de tiempo deseado las líneas de células, por ejemplo, 45 minutos para MDA-MB-435s,
- (g) añadir 1 volumen (por ejemplo 800 µl) de dimetilsulfóxido,
- (h) después de una hora de incubación, pipetear cada pocillo para garantizar la disolución del precipitado de formazano,
- 25 (i) determinar el valor de absorbancia para cada pocillo de la placa de 96 pocillos usando 490 nm como longitud de onda de ensayo y 630 nm como longitud de onda de referencia, y
- (j) determinar el porcentaje de viabilidad celular en cada pocillo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Absorbancia media de la muestra}}{\text{Absorbancia media del control}} \times 100$$

30 El ensayo de MTT también puede ser realizado por el experto en la materia como se describe por Roger et al. (2004, Biochim Biophys Acta, Vol. 1667:190-199).

Al final del ensayo de citotoxicidad, el valor de CI₅₀ se determina como la concentración inhibitoria (CI) semimáxima (50 %) de una sustancia de ensayo.

35 Preferiblemente, la etapa (a) anterior se lleva a cabo mediante el uso de 4 x 10⁵ células diana por pocillo.

Preferiblemente, la etapa (a) se realiza utilizando células cancerosas metastatizantes humanas o células de cultivo primario o una línea celular. Más preferiblemente, las células diana consisten en células de cáncer de mama humano metastatizantes. Lo más preferiblemente, como una referencia fiable, las células diana consisten en células de la línea celular MDA-MB-435s (ATCC N.º HTB-129).

45 Como ya se ha especificado anteriormente en la presente memoria, los compuestos de fórmula (I) son útiles como principios activos para prevenir la aparición de metástasis en pacientes con cáncer, ya que se ha encontrado en la presente memoria que estos compuestos inhiben la migración de células cancerosas metastatizantes en un ensayo de migración celular *in vitro*.

Curiosamente, se muestra en los ejemplos de la presente memoria que un glicerolípido de fórmula (I) tiene la capacidad de inhibir la formación de metástasis en una amplia variedad de tejidos y órganos, incluyendo ovario, útero, riñón, hígado, pulmón, extremidades (por ejemplo, extremidades), columna vertebral, bazo y ganglios linfáticos. Estos últimos resultados apoyan la eficacia de un glicerolípido de fórmula (I) como un agente antimetastático general, independientemente de la localización en el cuerpo de los focos de metástasis que se esperan o que ya han ocurrido. Estos últimos resultados también apoyan la eficacia de un glicerolípido de fórmula (I), independientemente del tipo de cáncer en el que se ha de evitar la aparición de la metástasis.

55 Se ha encontrado en la presente memoria que los compuestos de fórmula (I) inhiben 50 % o más la migración de células a una concentración final de 10 nM a 300 nM en el cultivo celular, dependiendo del compuesto de fórmula (I) que se ensaya.

60 Para ensayar la actividad inhibitoria de un compuesto de fórmula (I), el experto en la materia puede consultar el ensayo divulgado por Roger et al. (2004, Biochim Biophys Acta, Vol. 1667: 190-199), que puede describirse brevemente como un método que comprende las etapas de:

- (a) poner en contacto células cancerosas metastatizantes con una membrana que posee poros que tienen un

diámetro apropiado para evitar que las células migradoras atraviesen la dicha membrana al tiempo que permite que las células migradoras crucen la dicha membrana, y
(b) cuantificar las células que pasan a través de la membrana.

5 Para determinar la actividad inhibidora de un compuesto de fórmula (I), la etapa (a) del ensayo de migración celular anterior se lleva a cabo con células que han sido previamente incubadas con el dicho compuesto, a concentraciones finales definidas en el medio de cultivo. Al final del ensayo, el número de células incubadas con el compuesto (I) que han pasado a través de la membrana se determina y se compara con el número de células incubadas con medio de cultivo de control que han pasado la membrana, a fin de calcular el porcentaje de la inhibición de la migración celular que es inducida por el compuesto (I).
10

Como alternativa, la actividad inhibidora de la migración celular de un compuesto de fórmula (I) puede evaluarse mediante la realización de un ensayo de cierre de herida que se divulga en los ejemplos de la presente memoria y para el cual un experto en la materia también puede hacer referencia al artículo de Rodríguez et al. (2005, Methods Biol Mol, Vol. 294: 23-29). El ensayo de cierre de herida es simple, barato, y uno de los métodos desarrollados más pronto para estudiar la migración celular direccional *in vitro*. Este método imita la migración de células durante el cierre de herida *in vivo*. Las etapas básicas implican la creación de una "herida" en una monocapa de células, capturar las imágenes al inicio y en intervalos regulares durante la migración celular para cerrar la herida y comparar las imágenes para cuantificar la tasa de migración de las células. Es especialmente adecuado para los estudios sobre los efectos de las interacciones célula-matriz y célula-célula sobre la migración celular. Las células se siembran en placas de cultivo y se hacen hasta la confluencia en DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 %. La monocapa a continuación se raspa con una punta de pipeta amarilla estéril. A continuación, se inspecciona bajo un microscopio la migración de las células a la zona despejada. Las imágenes se toman directamente en el momento del raspado y después de 24 h, a fin de determinar la capacidad de las células ensayadas para migrar. El ensayo de cierre de herida es el ensayo de migración que se ha utilizado en los ejemplos en la presente memoria para determinar la capacidad de los compuestos de fórmula (I) para inhibir la migración de las células cancerosas metastásicas. Así pues, el ensayo de cierre de herida consiste en el ensayo de migración celular más preferida de referencia utilizado en el presente documento.
15
20
25

30 En los ejemplos de la presente memoria, dicho ensayo de migración de células *in vitro* se ha realizado con una línea de células cancerosas metastatizante humana, concretamente la línea celular MDA-MB-435s (ATCC N.º HTB-129).

En la presente memoria, "un" o "una" puede significar uno o más. En la presente memoria, cuando las palabras "un" o "una" se utilizan junto con la palabra "que comprende", pueden significar uno o más de uno. En la presente memoria, "otro" puede significar al menos un segundo o más.
35

En la presente memoria, "alquilo" se refiere a un grupo de átomos de carbono e hidrógeno derivados de una molécula de alcano por eliminación de un átomo de hidrógeno e incluyen restos lineales o ramificados.

40 En la presente memoria, "alqueno" se refiere a un grupo de átomos de carbono e hidrógeno de una molécula de alqueno por eliminación de un átomo de hidrógeno, e incluyen moléculas lineales o ramificadas. Un alqueno incluye uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

En la presente memoria, el término "grupo sacárido" se refiere a un monorrádical sacárido oxidado, reducido o sustituido unido de forma covalente como grupo R₃ del compuesto de fórmula (I) a través de cualquier átomo del resto sacárido, por ejemplo, a través del átomo de carbono de la aglicona. El término incluye grupos sacáridos que contienen amino.
45

En la presente memoria, el término "hexosa" abarca D-glucosa, D-manosa, D-xilosa, D-galactosa, vancosamina, 3-desmetil-vancosamina, 3-epi-vancosamina, 4-epi-vancosamina, acosamina, actinosamina, daunosamina, 3-epi-daunosamina, ristosamina, D-glucamina, N-metil-D-glucamina, ácido D-glucurónico, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-galactosamina, ácido siálico, ácido idurónico, L-fucosa y similares.
50

En la presente memoria, el término "pentosa" abarca D-ribosa o D-arabinosa; cetosas tales como D-ribulosa o D-fructosa; disacáridos tales como 2-O-(alfa-L-vancosaminil)-beta-D-glucopiranos, 2-O-(3-desmetil-alfa-L-vancosaminil)-beta-D-glucopiranos, sacarosa, lactosa, o maltosa; derivados tales como acetales, aminos, azúcares acilados, sulfatados y fosforilados.
55

En la presente memoria, el término "polisacárido" abarca (i) homopolisacáridos que consisten en una pluralidad de unidades de sacárido idénticas y (ii) heteropolisacáridos que consisten en una pluralidad de unidades de sacárido y al menos dos unidades de sacárido distintas.
60

En la presente memoria, el término "polisacárido", que denota un polímero sacárido que comprende, o alternativamente consiste en, de 2 a 4 unidades de sacárido, pueden ser utilizados indistintamente con el término "oligosacárido".
65

La expresión "grupo sacárido que contiene amino" se refiere a un grupo sacárido que tiene un sustituto amino. Sacáridos que contienen amino representativos incluyen L-vancosmina, 3-desmetil-vancosamina, 3-epi-daunosamina, epi-vancosamina, acosamina, actinosamina, daunosamina, 3-epi-daunosamina, ristosamina, N-metil-D-glucamina y similares.

5 En algunas realizaciones preferidas, en un glicerolípido de fórmula (I), R₁ es un grupo alquilo o un grupo alquenilo que tiene 16, 17 y 18 átomos de carbono o alquilo.

10 Los resultados de los ejemplos en la presente memoria ilustran que la presencia del grupo R₁ que tiene de 16 a 18 átomos de carbono contribuye significativamente al efecto antimetastásico de los glicerolípidos de fórmula (1).

15 Sin desear estar ligado por ninguna teoría particular, los inventores creen que la sustitución de grupo R₁ por un grupo alquilo o un grupo alquenilo que tiene 15 átomos de carbono o menos dará lugar a compuestos glicerolípido que tienen una capacidad reducida para inhibir la migración celular y, por lo tanto, un efecto antimetastásico reducido. En algunas realizaciones de un compuesto de fórmula (I), R₁ es un grupo alquilo seleccionado de los siguientes grupos alquilo: -(CH₂)₁₅-CH₃, -(CH₂)₁₆-CH₃ and -(CH₂)₁₇-CH₃.

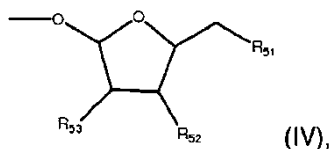
En algunas realizaciones de un compuesto de fórmula (I), R₂ es un grupo hidroxilo.

20 En algunas otras realizaciones de un compuesto de fórmula (I), R₂ es de fórmula (II) y cada uno de R₂₁, R₂₂ y R₂₃ son un átomo de hidrógeno.

25 En algunas otras realizaciones de un compuesto de fórmula (I), R₂ es de fórmula (II) y uno entre R₂₁, R₂₂ y R₂₃ es un grupo alquilo que tiene uno o dos átomos de carbono, mientras que los otros dos son, cada uno, un átomo de hidrógeno.

En algunas realizaciones de un compuesto de fórmula (I), R₃ o R₄ es un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en un grupo pentosilo y un grupo hexosilo.

30 En general, de acuerdo con la presente invención, un grupo pentosa tiene la siguiente fórmula (V):



en la que:

35 – R₅₁, R₅₂ y R₅₃ independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en grupos hidroxilo, metoxi, acetiloxi, amino y acetilamino.

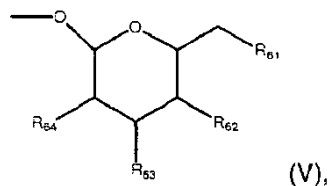
40 Los significados preferidos para los grupos R₅₁, R₅₂ y R₅₃ se seleccionan de hidroxilo y acetiloxi.

En ciertas realizaciones, R₃ o R₄ de fórmula (IV) tienen grupos R₅₁, R₅₂ y R₅₃ todos los cuales designan un grupo hidroxilo.

45 En otras realizaciones, R₃ o R₄ de fórmula (IV) tienen grupos R₅₁, R₅₂ y R₅₃ todos los cuales denotan un grupo acetilo.

En algunas realizaciones preferidas, R₃ o R₄ es un pentosilo seleccionado del grupo que consiste en D-ribosilo, D-arabinosilo, D-xilosilo, D-ribulosilo y D-xilulosilo.

50 En general, de acuerdo con la presente invención, un grupo hexosilo tiene la siguiente fórmula (V):



en la que:

55 – R₆₁, R₆₂, R₆₃ y R₆₄ independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en grupos hidroxilo, metoxi,

acetiloxi, amino y acetilamino,

Los significados preferidos para los grupos R₆₁, R₆₂, R₆₃ y R₆₄, se seleccionan de hidroxilo y acetiloxi.

5 En ciertas realizaciones, R₃ o R₄ de fórmula (V) tienen grupos R₆₁, R₆₂, R₆₃ y R₆₄ que todos designan un grupo hidroxilo.

En otras realizaciones, R₃ o R₄ de fórmula (V) tienen grupos R₆₁, R₆₂, R₆₃ y R₆₄ que todos designan un grupo acetiloxi.

10 En algunas realizaciones, R₃ o R₄ es un hexosilo seleccionado del grupo que consiste en D-glucosilo, D-manosilo y D-galactosilo.

15 En otras realizaciones, R₃ o R₄ es un cetohexosilo seleccionado del grupo que consiste en un D-fructosilo y un D-sorbosilo.

En algunas realizaciones, R₃ o R₄ se selecciona del grupo que consiste en grupos β galactosilo y tetra-acetil-β galactosilo.

20 En algunas otras realizaciones R₃ se selecciona del grupo que consiste en grupos β glucosilo y tetra-acetil-β glucosilo.

En otras realizaciones más, R₃ o R₄ se selecciona del grupo que consiste en inositol y N-acetilglucosamina.

25 Como ya se ha especificado anteriormente en la presente memoria, R₃ o R₄ puede denotar un grupo polisacaridilo que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido. En algunas realizaciones, todas las unidades de sacárido comprendidas en dicho grupo polisacaridilo son idénticas y el dicho grupo polisacaridilo consiste en un grupo homopolisacaridilo. En otras realizaciones, las unidades de sacárido comprendidas en el dicho grupo polisacaridilo no son todas idénticas y el dicho grupo polisacaridilo consiste en un grupo heteropolisacaridilo.

30 Generalmente, en un grupo polisacaridilo R₃ o R₄ de un compuesto de fórmula (I) según la invención, se puede seleccionar una cualquiera de las unidades de sacárido del grupo de las unidades de sacárido que se detallan anteriormente para los significados de las unidades monosacaridilo.

35 En algunas realizaciones en las que R₃ o R₄ consiste en un grupo polisacaridilo que comprende dos o más unidades de hexosa, dos unidades de hexosa están unidas covalentemente a través de un enlace 1-4 o un enlace 1-6. Dos unidades de hexosa pueden unirse, una con la otra, a través de un enlace covalente seleccionado del grupo que consiste en enlaces α1-4, α1-6, β1-4 y β1-6.

40 En algunas realizaciones, R₃ o R₄ es un disacárido seleccionado del grupo que consiste en sucrosilo, lactosilo, maltosilo, melibiosilo, trehalosilo y celobiosilo. Las realizaciones preferidas abarcan aquellas en las que R₃ o R₄ es un disacárido seleccionado del grupo que consiste en lactosilo, maltosilo y melibiosilo.

45 En algunas otras realizaciones, R₃ o R₄ es un trisacárido seleccionado del grupo que consiste en rafinosilo y mefezitosilo.

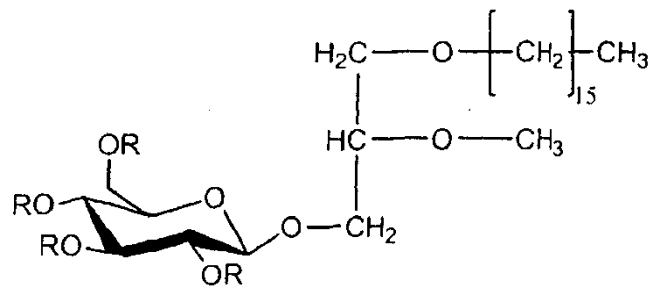
En otras realizaciones más, R₃ o R₄ es el tetrasacárido acarbosilo.

50 Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones de un compuesto de Fórmula (I), R₃ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido.

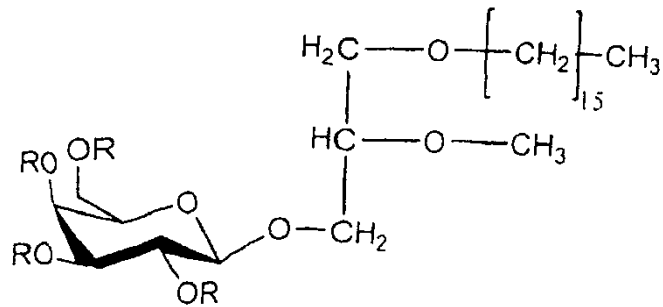
También, de acuerdo con otras realizaciones de un compuesto de Fórmula (I), R₃ es un grupo de fórmula (III) anteriormente definida en la presente memoria, en la que R₄ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido.

55 Los compuestos preferidos de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en los compuestos (A) a (P) siguientes:

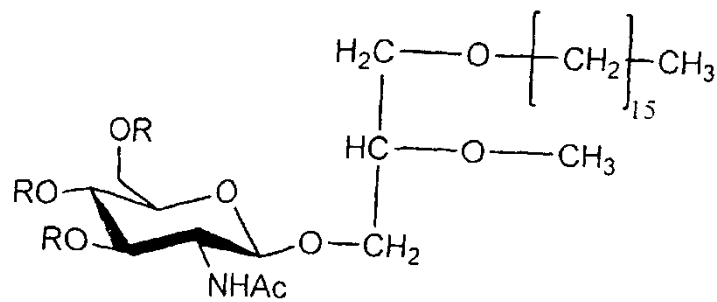
- Compuesto (A):



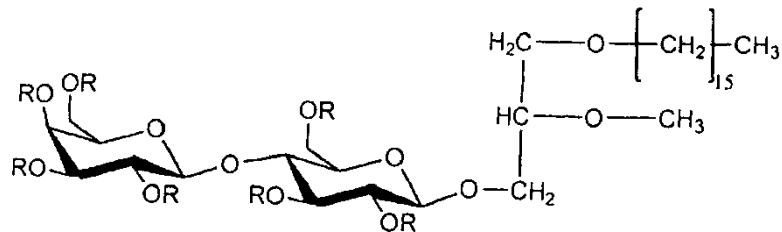
- Compuesto (B):



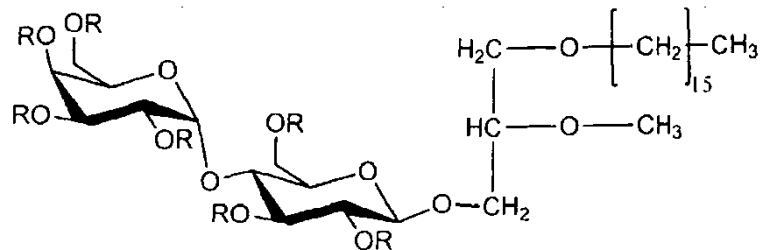
5 R = H o CH₃CO
- Compuesto (C):



10 R = H o CH₃CO
- Compuesto (D):

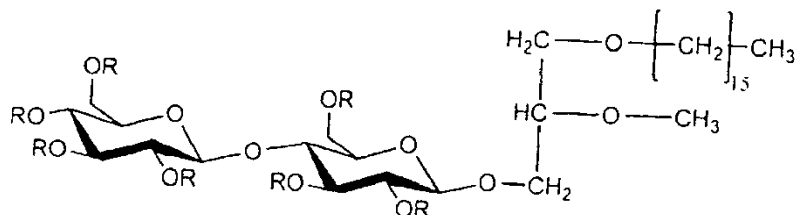


15 R = H o CH₃CO
en la que R₃ significa un grupo Gal-β-(1-4)-Glu, también denominado lactosa
- Compuesto (E):



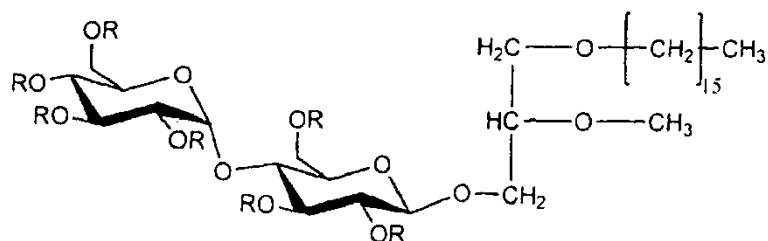
20 R = H o CH₃CO
en la que R₃ significa un grupo Gal-α-(1-4)-Glu

– Compuesto (F):



5 R = H o CH₃CO en la que R₃ significa un grupo Glu-β-(1-4)-Glu,

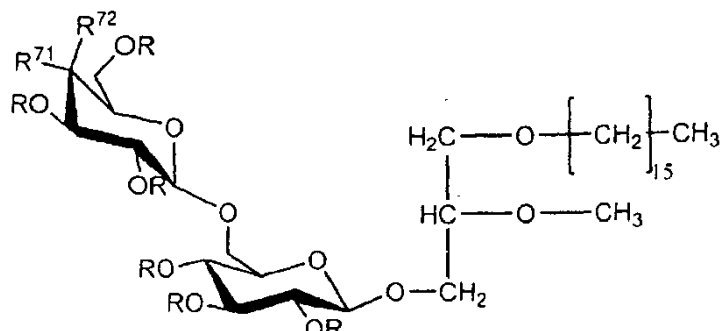
– Compuesto (G):



10 R = H o CH₃CO

en la que R₃ significa un grupo Glu-α-(1-4)-Glu, también denominado maltosa,

– Compuesto (H):

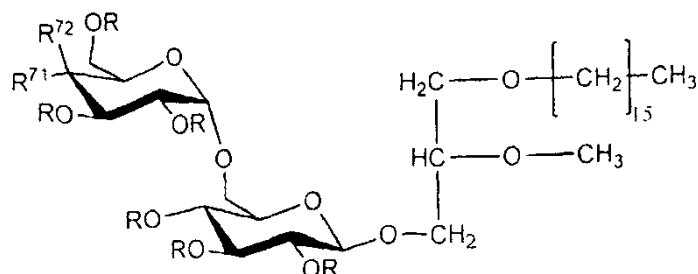


15

R = H o CH₃CO

en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-β-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc y (ii) Glu-β-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

20 – Compuesto (I):

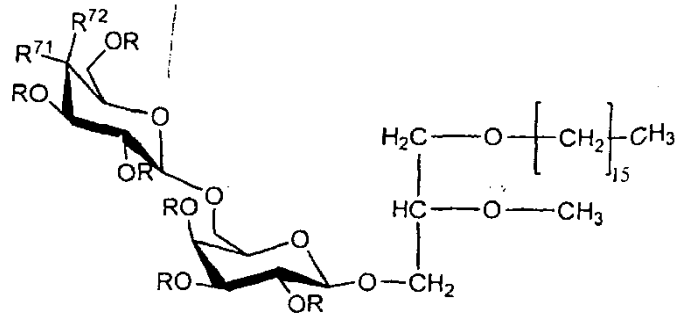


25

R = H o CH₃CO

en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc también denominado melibiosa o acetilmelibiosa y (ii) Glu-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H,

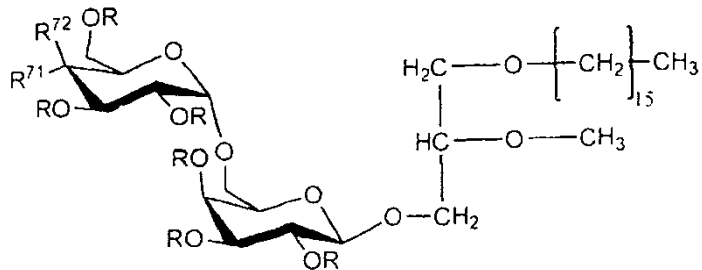
– Compuesto (J):



5 R = H o CH₃CO
 en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-β-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc y (ii) Glu-β-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

– Compuesto (K):

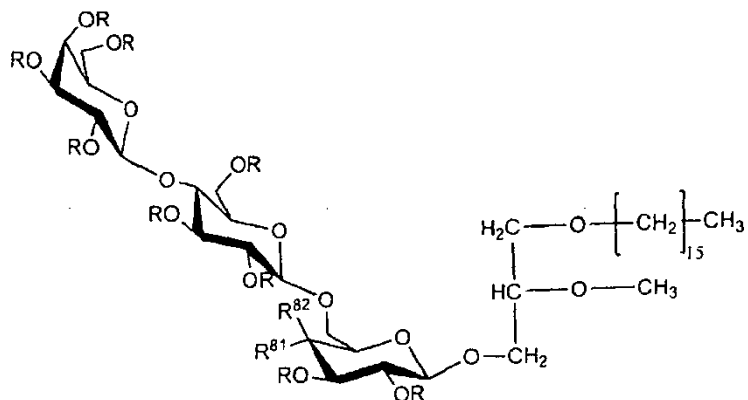
10



15 R = H o CH₃CO
 en la que R₇₁ y R₇₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc y (ii) Glu-α-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

– Compuesto (L):

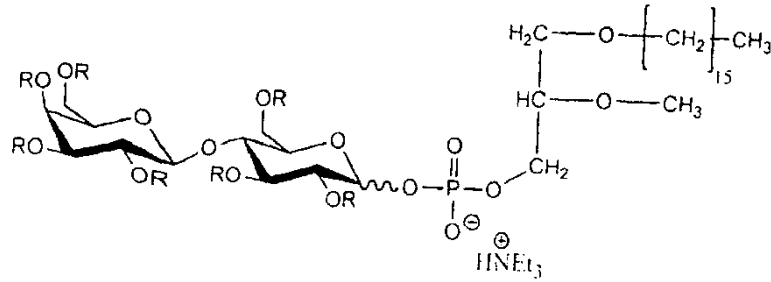
20



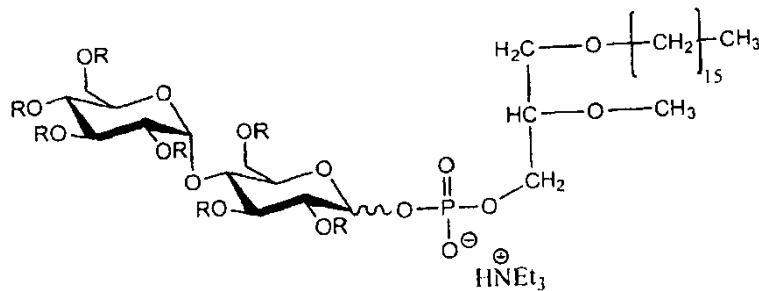
25 R = H o CH₃CO
 en la que R⁸¹ y R⁸² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo,

25

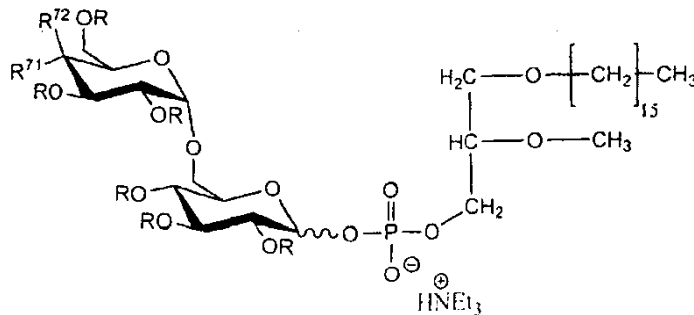
– Compuesto (M):



5 R = H o CH₃CO en la que R₄ significa un grupo Gal-β-(1-4)-Glu, también denominado lactosa o acetilactosa,
– Compuesto (N):

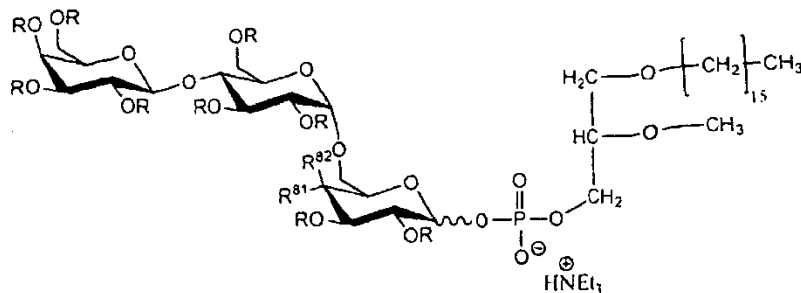


10 R = H o CH₃CO en la que R₄ significa un grupo Glu-α-(1-4)-Glu, también denominado maltosa o acetilmaltosa,
– Compuesto (O):



15 R = H o CH₃CO en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc, también denominado melibiosa o acetilmelibiosa y (ii) Glu-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

20 – Compuesto (P):



25 R = H o CH₃CO en la que R⁸¹ y R⁸² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) lactosa-β- o acetilactosa-β-(1-6)-Gal cuando R⁸¹ es H y R⁸² es

OH u OAc y (ii) lactosa- β - o acetilactosa- β -(1-6)-Glu cuando R⁸¹ es OH u OAc y R⁸² es H.

De forma ilustrativa:

- 5 – El Compuesto A se ilustra en particular por los compuestos JPH1518 y JPH1523 divulgados en la Tabla 1 y Tabla 2.
 – El Compuesto B se ilustra en particular por los compuestos JPH1519 y JPH1524 divulgados en la Tabla 2.
 – El Compuesto C se ilustra en particular por el compuesto JPH1528 divulgado en la Tabla 1 y Tabla 2.
 10 – El Compuesto D se ilustra en particular por el compuesto JPH1701 divulgado en las Tablas 1, 2 y 3 y el compuesto JPH1700 divulgado en la Tabla 3.
 – El Compuesto G se ilustra en particular por el compuesto JPH1800 divulgado en la Tabla 3.
 – El Compuesto I se ilustra en particular por los compuestos JPH1784 y JPH1882 divulgados en la Tabla 3 y
 – El Compuesto M se ilustra en particular por el compuesto CHS31 divulgado en la Tabla 3.

15 Para llevar a cabo la síntesis de un compuesto de fórmula (I), el experto en la materia puede consultar las siguientes referencias:

- J.J. Godfroid, C. Broquet, S. Jouquey, M. Lobbar, F. Heymanns, C. Redeuith, E. Steiner, E. Michel, E. Coeffier, J. Fichelle and M. Worcel. J. Med. Chem. 1987, 30, 792-797,
- 20 - R. R. Schmidt Angew. Chem. 1986, 98, 213-236,
- R. R. Schmidt Pure and Appl. Chem. 1989, 61, 1257-1270,
- N. S. Chandrakumar and J. Hajdu J. Org. Chem. 1983. 48. 1197-1202,
- R. K. Erukulla, X. Zhou, P. Samadder, G. Arthur, y R. Bittman J. Med. Chem. 1996, 39, 1545-1548, and
- J. R. Marino-Albernas, R. Bittman, A. Peters, and E. Mayhew J. Med. Chem. 1996, 39, 3241-3247
- 25 - M. Hunsen, D. A. Long, C. R. D'Ardenne, and A. L. Smith Carbohydr. Res. 2005, 340, 2670-2674
- S. Chittaboina, B. Hodges, and Q. Wang Lett. Org. Chem. 2006, 3, 35-38
- P. J. Garegg, T. Regberg, J. Stawinsky, y R. Strömberg. Chem. Scr. 1986, 25, 59-62
- B. C. Froehler and M. D. Mattenci Tetrahedron Lett. 1986, 27, 469-472
- A. V. Nikolaev, I. A. Ivanova, V. N. Shibaev, and N. K. Kochetkov. Carbohydrate Research 1990, 204, 65-78
- 30 - I. A. Ivanova, A. J. Ross, M. A. J. Ferguson, and A. V. Nikolaev J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 1999, 1743-1753
- A. J. Ross, I. A. Ivanova, M. A. J. Ferguson and A. V. Nikolaev J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2001, 72-81.

De forma ilustrativa, los métodos para la síntesis de glicerolípidos sustituidos se divulgan en particular en la patente de los Estados Unidos US-6.030.628, la cual pueden consultar los expertos en la materia para llevar a cabo la síntesis de un compuesto de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la invención.

También se describen otros métodos para la síntesis de glicerolípidos sustituidos en las solicitudes de patente de los Estados Unidos o patentes US 2004/0067893, US 2004/0213836, US-4.275.588, US-5.932.242, US-5.762.958 y US-6.583.127.

Las realizaciones de un compuesto de fórmula (I) en la que el grupo R₃ significa un grupo monosacárido o un grupo polisacárido también se pueden sintetizar como se describe a continuación. El método a continuación se puede utilizar para la síntesis de uno cualquiera de los derivados de sacárido comprendidos en la familia de compuestos que tienen la fórmula (I):

45 a) Síntesis del derivado glicerol-diéter

El compuesto **A** es el precursor de glicerol-lípido utilizado para la fijación de la unidad de sacárido (Véase M. Kates et al. Lipids, 1991, 26, 1095-1101; J. J. Godfroid et al. J. Med. Chem. 1987, 30, 792-797.). Su síntesis se representa en el esquema 1 presentado en la Figura 1.

Esquema 1 de la Figura 1: (i) C₁₆H₃₃Br, NaH, tolueno reflujo 6h; (ii) HCl 12M, MeOH reflujo 3h; (iii) Ph₃Cl, Et₃N, tolueno reflujo 5h; (iv) (a) CH₃I, NaH, THF reflujo 3h; (b) HCl 12M, MeOH/CHCl₃ ta.

55 b) Vía sintética del disacárido con un enlace α anomérico.

En primer lugar, la síntesis del derivado glicopiranosilo, con un grupo hidroxilo libre en la posición 6 (compuesto B) se sintetizará como se ha esquematizado en la figura 2.

- 60 – Esquema 2 de la Figura 2: (i) glicosil-tetraacetato-tricloroacetamidato, BF₃, Et₂O (ii) Ph₃Cl, Et₃N, tolueno 5h reflujo; (iii) BnBr, NaH, DMF 12h; (iv) HCl 12M, MeOH/CHCl₃ ta (Ver R. R. Schmidt Angew. Chem. 1986, 98, 213-236; R. R. Schmidt Pure and Appl. Chem. 1989, 61, 1257-1270). A continuación, la segunda unidad de sacárido (C) la 6-O-acetil-2'3'4-tri-O-bencil-D-galactopiranososa que posee los grupos protectores adecuados se sintetizará como se expone en la figura 3.

– Esquema 3 de la Figura 3: (i) BnBr, NaH, DMF 12h; (ii) H₂SO₄, Ac₂O/AcOH 3h ta; (iii) BnNH₂, THF ta 15 h. La α glicosilación se logrará mediante la reacción de B con C (véase el Esquema 4 y Shingu et al. Carbohydr. Res. 2005, 340, 2236-2244). Después de una etapa de desprotección, se producirá el compuesto esperado, como se ilustra en la figura 4.

5 – Esquema 4 de Figura 4: (i) Ph₃P, CBr₄, DMF; (ii) MeONa cat, MeOH; (iii) H₂, Pd/C, MeOH

La desprotección selectiva del grupo acetato en la posición 6 del compuesto intermedio I representado en la figura 4, ofrecerá fácilmente la posibilidad de introducir una tercera unidad de sacárido y de manera similar, posteriormente, una cuarta unidad de sacárido. - Esquema 5 de la Figura 5: (i) anhídrido acético/HClO₄, ácido acético, 15H, (ii) acetato de amonio, DMF, 48 h, (iii) imidazol/PCl₃/Et₃N, CH₃CN, (iv) A, Cloruro de pivaloilo, I₂, piridina, (vi) (a) NaOCH₃ cat., CH₃OH, (b) Amberlite IR 120.

Como ya se ha especificado anteriormente, más allá de su baja citotoxicidad, los compuestos de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la invención inducen principalmente una inhibición o incluso un bloqueo de la actividad del canal SK3/KCa2.3.

Además, los compuestos de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la invención presentan principalmente una elevada actividad inhibidora de la migración de células cancerosas y, por lo tanto, se han encontrado útiles para la inhibición de la metástasis cancerosa. Además, también se han demostrado las propiedades antimetastásicas de un glicerolípido de fórmula (I).

Un compuesto de fórmula (I) como se describe en la presente memoria es útil para prevenir la aparición de metástasis en cánceres donde las células cancerosas expresan el canal SK3/KCa2.3.

En particular, un compuesto de fórmula (I) como se describe en la presente memoria es útil para prevenir la aparición de metástasis en varios tipos de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, apudoma, coristoma, branquioma, síndrome carcinoide maligno, cardiopatía carcinoide, carcinoma (por ejemplo, Walker, de células basales, basoescamoso, Brown-Pearce, ductal, tumor de Ehrlich, in situ, Krebs 2, de células de Merkel, mucinoso, de pulmón no microcítico, de pulmón de células en avena, papilar, escirroso, bronquiolar, broncogénico, de células escamosas y de células transicionales), trastornos histiocíticos, leucemia (por ejemplo, de linfocitos B, de células mixtas, de células nulas, de linfocitos T, crónica de linfocitos T, asociada a HTLV-II, linfocítica aguda, linfocítica crónica, de mastocitos y mieloides), histiocitosis maligna, enfermedad de Hodgkin, enfermedad inmunoproliferativa de células pequeñas, linfoma no Hodgkin, plasmacitoma, reticuloendoteliosis, melanoma, condroblastoma, condroma, condrosarcoma, fibroma, fibrosarcoma, tumores de células gigantes, histiocitoma, lipoma, liposarcoma, mesotelioma, mixoma, mixosarcoma, osteoma, osteosarcoma, sarcoma de Ewing, sinovioma, adenofibroma, adenolinfoma, carcinosarcoma, condroma, craneofaringioma, disgerminoma, hamartoma, mesenquimoma, mesonefoma, miosarcoma, ameloblastoma, cementoma, odontoma, teratoma, timoma, tumor trofoblástico, adenocarcinoma, carcinoma, adenoma, colangioma, colesteatoma, cilindroma, cistoadenocarcinoma, cistoadenoma, tumor de células granulosa, ginandroblastoma, hepatoma, hidradenoma, tumor de células de los islotes, tumor de células de Leydig, papiloma, tumor de células de Sertoli, tumor de células de la teca, leiomioma, leiomiosarcoma, mioblastoma, mioma, miosarcoma, rabiomioma, rabiomiosarcoma, ependimoma, ganglioneuroma, glioma, meduloblastoma, meningioma, neurilemoma, neuroblastoma, neuroepitelioma, neurofibroma, neuroma, paraganglioma no cromafínico, angioqueratoma, hiperplasia angiolinfóide con eosinofilia, angioma esclerosante, angiomatosis, glomangioma, hemangioendotelioma, hemangioma, hemangiopericitoma, hemangiosarcoma, linfangioma, linfangiomioma, linfagiosarcoma, pinealoma, carcinosarcoma, condrosarcoma, cistosarcoma filóide, fibrosarcoma, hemangiosarcoma, leiomiosarcoma, leucosarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, miosarcoma, mixosarcoma, osteosarcoma, carcinoma de ovario, rabiomiosarcoma, sarcoma (por ejemplo, de Ewing, experimental, de Kaposi y de mastocitos), neoplasias (por ejemplo, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, hipófisis, testicular, orbital, cabeza y cuello, sistema nervioso central, acústico, pélvico, del tracto respiratorio y urogenital), neurofibromatosis y displasia cervical y para el tratamiento de otros trastornos en los que las células se han inmortalizado o transformado. Estos últimos resultados también apoyan la eficacia de un glicerolípido de fórmula (I), independientemente del tipo de cáncer en el que se haya de prevenir o tratar la aparición de la metástasis.

La invención podría utilizarse en combinación con otras modalidades de tratamiento, tales como quimioterapia, crioterapia, hipertermia, radioterapia y similares.

Un glicerolípido de fórmula (I) se puede usar para prevenir la aparición de metástasis en cualquier tejido del cuerpo o en cualquier órgano del cuerpo. La utilidad de un glicerolípido de fórmula (I) abarca tratamientos preventivos o terapéuticos contra la aparición de metástasis en una amplia variedad de tejidos y órganos, incluyendo ovario, útero, riñón, hígado, pulmón, tejido óseo (por ejemplo, huesos de la pierna incluyendo fémur, huesos del brazo, columna vertebral incluyendo vértebra dorso-lumbar, pelvis), bazo, ganglios linfáticos, colon, mama, cerebro, próstata, páncreas y piel.

En algunas realizaciones, los compuestos de fórmula (I) como se describe en la presente memoria son útiles para prevenir la aparición de metástasis en pacientes con cáncer afectados con un melanoma o un cáncer de mama, un cáncer de pulmón, un cáncer de tiroides, un osteosarcoma o un cáncer de riñón.

Otro objeto de la presente invención consiste en un compuesto de fórmula (I) en la que R₃ es un grupo de fórmula (III) *per se*, como se describe a lo largo de la presente memoria descriptiva.

5 Un objeto adicional de la presente invención consiste en una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula (I) en la que R₃ es un grupo de fórmula (III) como se define a lo largo de la presente memoria en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 Un objeto adicional de la presente invención consiste en una composición farmacéutica para prevenir la metástasis cancerosa que comprende un compuesto de fórmula (I) en la que R₃ es un grupo de fórmula (III) como se define a lo largo de la presente memoria en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I), así como métodos para la administración terapéutica de un compuesto de fórmula (I) se describen a continuación.

Composiciones farmacéuticas

20 En la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) como se describe en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Science, 16^a ed.; 1980, Mack Publishing Co., editado por Oslo et al.

25 Por "vehículo fisiológicamente aceptable" se entiende un agente de relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia, que puede ser utilizado con seguridad en la administración sistémica o tópica. Dependiendo de la ruta particular de administración, una variedad de vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica incluye cargas sólidas o líquidas, diluyentes, hidrótrofos, agentes tensioactivos y sustancias encapsulantes.

30 Estas composiciones contendrán generalmente una cantidad efectiva de un compuesto de fórmula (I), junto con una cantidad adecuada de vehículo para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración eficaz al paciente.

35 La composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral o por otros métodos que aseguren su administración a la corriente sanguínea en una forma efectiva. Las dosis y concentraciones de fármaco deseadas de tales composiciones farmacéuticas pueden variar dependiendo del uso particular previsto.

La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración estéril a través de membranas (0,2 micrómetros).

40 La composición farmacéutica se formulará, dosificará y administrará de una manera conforme con la buena práctica médica. Los factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular a tratar, el mamífero particular a tratar, el trastorno clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por los médicos.

45 La cantidad del compuesto de fórmula (I) a administrar se regirá por tales consideraciones y es la cantidad mínima necesaria para reducir o bloquear la aparición de la metástasis cancerosa en un paciente o un mamífero.

50 La cantidad del compuesto de fórmula (I) que se administra por vía parenteral en cada dosis variará generalmente de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg y lo más preferiblemente de 0,05 mg/kg a 25 mg/kg y, por ejemplo, 10 mg/kg.

55 En general, una composición farmacéutica comprende de 0,01 % a 99,99 % en peso, de forma alternativa de 0,1 % a 99,9 % en peso, aún más de forma alternativa de 1 % a 99 % en peso, sin embargo, de forma alternativa de 10 % a 90 %, de un compuesto de fórmula (I), basado en el peso total de la dicha composición farmacéutica, consistiendo el resto de la composición en uno o más excipientes comprendidos en la misma.

Dicha cantidad está preferiblemente por debajo de la cantidad que es tóxica para el mamífero.

Métodos de tratamiento

60 La presente invención se puede usar en métodos para la prevención de la metástasis cancerosa.

Esta invención se puede usar en métodos para la prevención de la aparición de la metástasis cancerosa en un paciente, que comprende poner en contacto una célula con una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I), tal como se describe anteriormente.

65 Una "cantidad eficaz" abarca, por tanto, cantidades de un compuesto de fórmula (I) que disminuye el número de

metástasis *in vivo*. Una disminución en el número de metástasis *in vivo* se puede evaluar de acuerdo con los ensayos de modelos experimentales divulgados en los ejemplos de esta memoria.

5 De forma ilustrativa, una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) puede evaluarse por un método que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una pluralidad de animales,
- b) administrar a los animales proporcionados en la etapa a) un número deseado de células cancerosas no metastásicas en el que dichas células cancerosas tienen la capacidad de generar metástasis,
- 10 c) administrar una cantidad conocida de un compuesto de fórmula (I) a los animales obtenido al final de la etapa b),
- d) medir el número de células cancerosas metastásicas en un tipo de tejido o más de un tipo de tejido de los animales obtenidos al final de la etapa c),
- 15 e) comparar, para cada tipo de tejido ensayado, el número de células cancerosas metastásicas con el número de células cancerosas metastásicas que se encuentran en los animales de control que han sido sometidos a la etapa b), pero que a los que se les ha administrado con el dicho compuesto de fórmula (I) y
- f) asignar la dicha cantidad conocida de un compuesto de fórmula (I) como una cantidad eficaz de dicho compuesto, si el número de células cancerosas metastásicas que se encuentra en al menos un tipo de tejido de los animales que han recibido la dicha cantidad conocida de un compuesto de fórmula (I) es menor que el
- 20 número de células cancerosas metastásicas que se encuentra en los animales de control que no han sido administrados con el dicho compuesto de fórmula (I).

25 De acuerdo con algunas realizaciones preferidas del método anterior, los animales utilizados en la etapa a) consisten en ratones, incluyendo ratones desnudos, por ejemplo, ratones desnudos y de raza NMRI.

De acuerdo con algunas realizaciones preferidas del método anterior, las células cancerosas no metastásicas que se administran en la etapa b) consisten en células cancerosas procedentes de un animal de la misma especie que el animal proporcionado en la etapa a), por ejemplo, células cancerosas de ratones.

30 Preferiblemente, las dichas células cancerosas no metastásicas se administran por vía intravenosa, de modo estas células están habilitadas para colonizar rápidamente en uno o más tejidos u órganos del cuerpo animal.

35 De acuerdo con algunas realizaciones preferidas, las dichas células cancerosas no metastásicas que se administran en la etapa b) consisten en células de cáncer de mama no metastásicas. De forma ilustrativa, la inyección intravenosa de células de cáncer de mama no metastásicas dará lugar al alojamiento de las dichas células cancerosas no metastásicas en el tejido mamario, donde las dichas células cancerosas proliferan, lo que equivale a un injerto de un tumor de cáncer no metastásico dentro del tejido mamario de los animales.

40 De acuerdo con algunas realizaciones preferidas del método anterior, se proporciona en la etapa a) un número de animales de ensayo que permite el análisis simultáneo de una serie de cantidades conocidas del compuesto de fórmula (I). En otras palabras, los animales proporcionados en la etapa a) se pueden dividir en subgrupos de animales, en el que cada sub-grupo de animales recibe en la etapa c) una cantidad conocida dada del compuesto de fórmula (I), lo que permite ensayar simultáneamente una variedad de cantidades del compuesto de fórmula (I), a fin de determinar la cantidad mínima eficaz de dicho compuesto de fórmula (I) que inhibe la metástasis al final del

45 ensayo *in vivo*. Preferiblemente, uno de los sub-grupos de animales consiste en un grupo de control que se administra con las células cancerosas no metastásicas en la etapa b), pero no se administra con el compuesto de fórmula (I) en la etapa c). El número de células cancerosas no metastásicas medidas en el dicho sub-grupo de animales control se utiliza entonces para realizar la comparación de la etapa e).

50 En la etapa f) del método anterior, se considera que los animales de ensayo tienen un número menor de células metastásicas que los animales de un sub-grupo de control si la diferencia en el número de células metastásicas es estadísticamente significativa, lo que significa que, en una prueba T convencional, el valor P es menor que 0,05, el cual abarca un valor P inferior a 0,01.

55 En la presente memoria, el "número de células cancerosas metastásicas", que se mide en la etapa d) incluye el número de focos de metástasis que se encuentran en los animales. En algunas realizaciones, el "número de células cancerosas metastásicas" abarca el número de focos de metástasis para cada tipo de tejido analizado o la localización en el cuerpo analizado, que se encuentran en los animales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el "número de células cancerosas metastásicas", que se mide en la etapa d) comprende para cada tipo de tejido, por ejemplo, ovario,

60 útero, riñón, hígado, pulmón, pierna, columna vertebral, bazo y ganglios linfáticos, el número de focos de células metastásicas.

En la presente memoria, el "número de células cancerosas metastásicas", que se mide en la etapa d) puede llevarse a cabo mediante la cuantificación de una señal detectable emitida por dichas células cancerosas metastásicas y después comparar los correspondientes valores de la señal de cuantificación en la etapa e). La dicha señal detectable abarca una señal de bioluminiscencia que se emite por dichas células cancerosas metastásicas. A modo

65

ilustrativo, como se muestra en los ejemplos de la presente memoria, la citada señal de bioluminiscencia se puede obtener mediante la administración a los ratones de una sal de potasio de una sustancia bioluminiscente, por ejemplo, una sal de potasio de D-luciferina y, a continuación, localizar y cuantificar la señal de bioluminiscencia emitida por todo el cuerpo del animal, por ejemplo, mediante el uso de un aparato de bioluminiscencia de imágenes de todo el cuerpo.

Finalmente, una vez determinada una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula (I) por el método anterior, qué cantidad eficaz se puede expresar como la cantidad eficaz por unidad de peso del cuerpo del animal, por ejemplo, la cantidad por kg de peso corporal, el experto en la materia determina fácilmente la cantidad eficaz de dicho compuesto de fórmula (I) para la prevención de la aparición de metástasis en un paciente con cáncer humano, incluyendo en la mayoría de casos el régimen de tratamiento.

Como ya se ha descrito anteriormente en la presente memoria, la cantidad de un compuesto de fórmula (I) a administrar en cada dosis variará generalmente de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg y lo más preferiblemente 0,05 mg/kg a 25 mg/kg y por ejemplo 10 mg/kg.

El ciclo de un régimen de administración abarca la administración diaria, dos veces por semana, semanal, quincenal y mensual de un compuesto de fórmula (I).

La presente invención se puede usar en métodos para prevenir la metástasis de un cáncer primario, que comprende la administración al sujeto de un compuesto de fórmula (I). En un aspecto preferido, el compuesto se purifica sustancialmente. El sujeto es preferiblemente un animal y es preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente es un ser humano.

Se conocen varios sistemas de administración y se pueden utilizar para administrar un compuesto de fórmula (I), por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a las vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador y la formulación con un agente de aerosolización.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones de la invención localmente en un área específica del cuerpo; esto se puede conseguir mediante, por ejemplo, y no a modo de limitación, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, conjuntamente con un apósito para heridas después de la cirugía, mediante inyección, por medio de un catéter, por medio de un supositorio, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En algunas otras realizaciones, un compuesto de fórmula (I) puede ser dirigido específicamente a uno o más tejidos, por ejemplo, encapsulado en liposomas recubiertos con polietilenglicol o tener en su superficie sus moléculas de ligando que se unen con moléculas de la superficie (por ejemplo, antígenos de superficie, residuos de glicósido de superficie, receptores de la superficie, etc.) expresadas por las células cancerosas metastásicas.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante, pero sin limitarse a, los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Actividad antimetastásica *in vitro* de glicerolípidos

A. Materiales y Métodos

A.1. Cultivo de células

La línea de células de cáncer de mama humano MDA-MB-435s se cultivó en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contiene 5 % de suero bovino fetal (FBS) como ya se ha descrito (Roger S, Potier N, Vandier C, Le Guennec JY, Besson P. Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. Biochim Biophys Acta 2004; 1667: 190-9.). Las líneas de células epiteliales mamarias normales inmortalizadas MCF-10A y 184A1 fueron cultivadas en DMEM/Ham's F-12, mezcla 1:1 que contiene 5 % de suero de caballo (Invitrogen Life Technologies, Francia), insulina (10 µg/ml), factor de crecimiento epidérmico (20 ng/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml) y, respectivamente, para MCF-10A y 184A1, 100 ng/ml de toxina de cólera y 1 ng/ml de toxina de cólera, más 5 µg/ml de transferrina.

Se preparó un medio a medida con un alto contenido de K⁺ constituido por medio a base de DMEM libre de K⁺, Na⁺ y Ca²⁺ (Cambrex Bio Science, Francia) y complementado en el momento de su uso con KCl 60 mM, NaCl 84 mM,

CaCl₂ 2 mM.

Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Molsheim, Francia).

5

A.2. Proliferación celular y migración celular *in vitro*.

La proliferación celular se determinó usando el método de reducción de sal de tetrazolio, tal como se describe (Roger S, Potier M, Vandier C, Le Guennec JY, Besson P. Description and role in proliferation of iberitoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biochim Biophys Acta* 2004;1667:190-9). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 48 h. A continuación se añadieron los fármacos durante 24 h a concentraciones que no tuvieron ningún efecto sobre la proliferación celular. La migración celular se analizó en placas de 24 pocillos que reciben inserciones de cultivo de células de membrana de tereftalato de polietileno de tamaño de poro 8 µm (Becton Dickinson, Francia), tal como se describe (Roger S, Potier M, Vandier C, Le Guennec JY, Besson P. Description and role in proliferation of iberitoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1667: 190-9.).

10

15

Ensayo de curación de herida: Las células se sembraron en placas de cultivo y se hicieron crecer hasta la confluencia en DMEM complementado con suero de ternera fetal al 10 %. La monocapa se rascó con una punta de pipeta amarilla estéril. La migración de las células a la zona despejada se inspeccionó en el microscopio. Se tomaron fotos directamente en el momento del rascado y después de 24 h.

20

A.3. Ensayos citotóxicos. Para distinguir entre un efecto citostático y citotóxico, se utilizaron dos ensayos citotóxicos. En el primero, se evaluó la viabilidad celular después de 24 h de tratamiento por el método de exclusión con azul de tripano. En el segundo método las células se incubaron con edelfosina a 1, 3, 10 y 30 µM durante 8 h y después se lavaron tres veces con medio de cultivo fresco. Se dejó que las células viables restantes crecieran durante 6 días antes de ser cuantificadas usando el ensayo de MTT como se describió anteriormente.

25

A.4. Soluciones y fármacos. La solución salina fisiológica (PSS) tenía la siguiente composición (en mM): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 4, CaCl₂ 2, D-glucosa 11,1 y HEPES 10, ajustado a pH 7,4 con NaOH 1M. La solución de la pipeta, pCa = 7 (concentración de Ca²⁺ libre), tenía la siguiente concentración (en mM): K-glutamato 125, KCl 20, CaCl₂ 0,37, MgCl₂ 1, Mg-ATP 1 EGTA 1, HEPES 10, ajustado a pH 7,2 con KOH 1M. También se utilizan soluciones de pipeta con mayor contenido de pCa (6,4 y 6). Se añadieron tetraetilamonio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP), NS 1619 (1-(2'-hidroxi-5'-trifluoro-metilfenil)-5trifluorometil2(3H)bencimidazolona), apamina, BMS 204-352 y edelfosina a la PSS o medios de cultivo a las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras. A excepción de BMS 204-352, que fue amablemente suministrado por Dominique Cahard (UMR 6014 CNRS de l'IRCOF Universidad de Rouen), todos los medicamentos y productos químicos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Quentin, Francia).

30

A.5. Estadística. A menos que se indique lo contrario, los datos se expresaron como media ± error estándar de la media (n = número de células). El análisis estadístico, realizado con el software Statview 4.57 (Abacus Concepts, Berkeley, EE.UU.) se realizó usando la prueba de la t de Student o el factor ANOVA monodireccional seguido de una prueba de Bonferroni-Dunn post-hoc. Las diferencias se consideraron significativas cuando p < 0,05.

40

B. Resultados

45

Los resultados que muestran (i) la baja citotoxicidad y (ii) la elevada actividad inhibidora de la migración celular de diversos compuestos glicerolípido de fórmula (I) hacia las células cancerosas metastatizantes se representan en la Tabla I siguiente.

Ejemplo 2: Actividad antimetastásica *in vitro* e *in vivo* de glicerolípidos

50

A. Materiales y Métodos

A.1. Cultivo de células

55

Para este estudio se utilizaron dos líneas de células MDA-MB-435s y HEK293 que fueron adquiridas de ATCC. Estas líneas celulares se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco. Los medios de cultivo se complementaron con 5 % (v/v) y 10 % de suero bovino fetal (FBS) para MDA-MB-435s y HEK293, respectivamente. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada a 37 °C (95 % de aire, 5 % de CO₂). La ausencia de contaminación por micoplasma se verificó regularmente usando el kit de detección de Mycoplasma Mycoalert® (Lonza).

60

A.2. Construcciones, transfección y transducción

Todas las construcciones anteriormente descritas (Chantome et al., *Exp Cell Res.* 2009 Dec 10; 315 (20): 3620-30).

65

Las células MDA-MB-435s y HEK293 fueron transducidas con vector lentiviral a multiplicidades de infección (MOI) de 1 a 3, en presencia de polibreno (4 µg/ml, Sigma). La tasa de transducción de MDA-MB-435s determinada por el recuento de células GFP era próxima al 90 %. Para la selección se realizó un clon de dilución límite de HEK293-SK3/KCa2.3 y cada clon se ensayó usando la técnica de pinzamiento de membrana con apamina y edelfosina y por transferencia Western con el fin de controlar la expresión del canal SK3/KCa2.3.

A.3. Ensayos de proliferación celular

La proliferación celular se determinó usando el método de reducción de sal de tetrazolio (MTT), tal como se describe en otro lugar (S.Roger et al., 2004). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de 40.000 células por pocillo y las mediciones se realizaron por triplicado 24 horas después de la implantación.

A.4. Ensayos de movilidad de dos dimensiones (2D)

La motilidad celular se analizó en placas de 24 pocillos que reciben inserciones de cultivo celular de membrana de tereftalato de polietileno de tamaño de poro de 8 µm (Becton Dickinson, Francia), tal como se describe anteriormente ((S.Roger et al., 2004). Brevemente, se sembraron 4×10^4 células MDA-MB-435S en el compartimiento superior con medio de cultivo suplementado con 5 % de FBS (\pm moléculas). El compartimiento inferior se llenó con medio de cultivo suplementado con 10 % FBS (\pm moléculas) como un quimioatrayente. Se realizaron ensayos de motilidad bidimensionales sin recubrimiento. Después de 24 h, las células estacionarias se retiraron de la parte superior de la membrana, mientras que las células migradas en la parte inferior de los insertos se fijaron, se tiñeron y se contaron en cinco campos diferentes (aumento, \times 200). Al menos se realizaron por triplicado tres experimentos independientes.

A.5. Electrofisiología

Los experimentos se realizaron con células sembradas en placas de Petri de 35 mm a 3.000 células por cm². Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando la configuración de registro de células enteras convencional de la técnica de pinzamiento de membrana como se ha descrito previamente [8]. La solución de pCa era 7 y 6,4, respectivamente, para células MDA-MB-435s y HEK293-SK3/KCa2.3.

En resumen, los experimentos se llevaron a cabo utilizando amplificador de pinzamiento de membrana Axopatch 200B (Axon Instrument) y los datos digitalizados con un convertidor 1322-A Digidata (instrumento Axon), se almacenaron en un ordenador con el software Clampex de pClamp 9.2 (Axon Instrument). Los datos del pinzamiento de membrana se analizaron utilizando el software Clampfit 9.2 y Origen 7.0 (Microcal Inc., Northampton, MA, EE.UU.).

A.6. Soluciones y medicamentos

La solución salina fisiológica (PSS) tenía la siguiente composición (en mM): NaCl 140, MgCl₂ 1, KCl 4, CaCl₂ 2, D-glucosa 11,1 y HEPES 10, ajustado a pH 7,4 con NaOH.

La solución de la pipeta para los registros de células enteras contenía (en mM): K-glutamato 125, KCl 20, MgCl₂ 1, Mg-ATP 1, HEPES 10 y el pH se ajustó a 7,2 con KOH y se añadieron diversas concentraciones de CaCl₂ y EGTA para obtener pCa calculado = 7 (CaCl₂ 0,37 mM y EGTA 10 mM) o pCa = 6,4 (CaCl₂ 0,7 mM y EGTA 1 mM).

Las moléculas de alquil-lípidos se disolvieron en una mezcla de etanol/DMSO. Las concentraciones finales fueron menores que 2 y 3 %, respectivamente, para el etanol y DMSO.

A.7. Ensayos de metástasis experimentales y el tratamiento con JPH1701

Se adquirieron ratones desnudos NMRI hembras de 6 semanas de edad de los laboratorios Janvier. Los ratones fueron criados y se alojaron en el INSERM, U892, Universidad de Nantes, bajo la licencia de cuidado de los animales N.º 44565.

Las células MDA-MB-435s se incubaron con JPH1701 1 µM o con DMSO 2 %/etanol 3 % (vehículo) durante 24 h y se inyectaron (0,75 106) i.v. en la vena lateral de la cola. A continuación, los ratones se trataron tres veces por semana durante 12 semanas con JPH1701 a 15 mg/kg i.v. o con vehículo. No se observaron efectos adversos en los ratones tratados con JPH1701 o vehículo.

A.8. Tumor del modelo de la almohadilla de grasa mamaria:

Se adquirieron ratones desnudos NMRI hembras de 3-4 semanas de edad de los laboratorios Janvier. Los ratones fueron criados y se alojaron en el INSERM, U892, Universidad de Nantes, bajo la licencia de cuidado de los animales N.º 44565.

La línea celular MDA-MB-435s- que expresa luciferasa se trató con JPH 1701 1 μ M (Ohmlin) o con DMSO 2 %/etanol 3 % (vehículo) durante 24 h y 2.106 células se inyectaron en la almohadilla de grasa despejada derecha. Las células se inyectaron en un volumen de 50 μ l de DMEM sin suero mediante una aguja de calibre 25. Los ratones se trataron tres veces por semana durante 14-15 semanas con JPH 1701 (Ohmlin) a 15 mg/kg i.v. o con vehículo.

El crecimiento de los tumores primarios se evaluó semanalmente por medición del calibre y por imágenes de bioluminiscencia (BLI). El volumen del tumor se calculó como longitud x anchura x profundidad y el tumor primario fue extirpado quirúrgicamente cuando su volumen alcanza 500 mm³ (6-7 semanas después del injerto). Los ratones fueron sacrificados 8 semanas después de la escisión del tumor y se detectaron metástasis ex vivo mediante bioluminiscencia en los ganglios linfáticos, los pulmones, raquis, y huesos de las extremidades.

A.9. Imágenes de bioluminiscencia (BLI)

Todos los ratones fueron evaluados semanalmente usando imágenes de bioluminiscencia del cuerpo entero para cuantificar las cantidades relativas de la carga de metástasis (PhiimageurTM; BIOSPACE Lab, Francia). Cada ratón recibió sal de potasio de D-luciferina (Interchim) a dosis de 150 mg/kg de peso corporal por inyección intraperitoneal y se anestesió con inyección i.p. de ketamina/xilazina. Las imágenes bioluminiscentes se recogieron en tiempo real hasta que se alcanzó la saturación de placa en las posiciones laterales, ventral y dorsal. Los niveles de luz emitida por las células tumorales bioluminiscentes se detectaron por el sistema de imágenes de fotones, integrado, digitalizado y visualizado. Las regiones de interés se extrajeron alrededor de las metástasis experimentales. La cantidad de carga de metástasis dentro de cada región de interés se cuantificó como la cantidad relativa de luz producida por la actividad de luciferasa en células de cáncer de mama y se expresó en cpm usando el software Photovision+ (versión 1.3; Biospace Lab). En la necropsia, se realizó la medición de BLI ex vivo para cada tejido recogido.

B. Resultados

B.1. Identificación de los alquil-lípidos como nuevos bloqueadores del canal SK3/KCa2.3 y de este modo inhibidores de la motilidad celular

Hemos demostrado que una familia canales de K⁺, activados por Ca²⁺ de pequeña conductancia, el canal SK3 o KCa2.3, es un mediador de la motilidad celular en el cáncer epitelial y en el melanoma (Potier et al., Mol Cancer Ther. 2006 Nov; 5 (11): 2946-53 ; Chantome et al., Exp Cell Res. 2009 Dec 10; 315 (20): 3620-30). Recientemente, el papel de este canal en la metástasis se demostró y nos pareció que este canal promueve el desarrollo de metástasis (WO2008015267, "A method for the in vitro screening of anti-cancer compounds that inhibits SK3/KCa2.3, and said anti-cancer compounds"). Usando esta patente (WO2008015267), se cribaron compuestos en cuanto a su capacidad para disminuir la migración mediada por el canal SK3/KCa2.3 de las células MDA-MB-435S. Se encontró que edelfosina disminuía la migración mediada por canales SK3/KCa2.3 (Potier et al., Br J Pharmacol. 2011; 162 (2), 464-79). Por lo tanto, decidimos enfocar el cribado en las moléculas de alquil-lípido y en particular en aquellas que tienen una estructura cercana a la edelfosina. La edelfosina es un lípido de éter, también conocido como un agente anti-tumoral. Sin embargo, este compuesto es altamente tóxico cuando se administra a humanos. En la técnica, se cree que la actividad quimioterapéutica de los lípidos de éter surge, al menos en parte, de su capacidad para acumularse en las células cancerosas, debido a la falta en estas células de las enzimas de escisión de alquilo necesarias para la hidrólisis, y por lo tanto, la eliminación de estos lípidos. Se cree en la técnica que al ejercer la actividad de tipo detergente los lípidos de éter recogidos en las membranas de células cancerosas se puede perturbar la estructura de las membranas, y por lo tanto, romper las células. En este contexto, se cree que el efecto anti-cáncer de la edelfosina está mediado por la presencia del resto fosfolina (Mollinedo et al., 1997, Cancer Research, Vol. 57(7): 1320-1328); Mollinedo et al., 2004, Curr Med Chem, Vol.11(24) : 3163-3184).

Nuestro objetivo era diseñar un "verdadero" fármaco antimetastásico que se dirigiese específicamente a la vía intracelular de la diana relacionada con la migración de las células metastásicas. De hecho, el tratamiento no específico a menudo causa efectos secundarios graves (por ejemplo, supresión inmunitaria, pancitopenia (anemia, trombocitopenia, inhibición del crecimiento de células de la médula ósea acompañada de leucopenia), diarrea, vómitos y epilación (reducción de pelo)).

Por lo tanto, se decidió probar diferentes análogos de alquil-lípido en función de su estructura, con la esperanza de identificar qué partes del compuesto son esenciales para su actividad inhibidora de la migración celular. A continuación, se probaron moléculas en las que se eliminó el esqueleto de glicerol o en el que se suprimió o reemplazó sn-1, sn-2 o sn-3. La actividad de los diferentes compuestos ensayados se resume en la Tabla 2. Se encontró que la cadena principal de glicerol es esencial porque en su ausencia los análogos eran más tóxicos e ineficaces sobre la migración celular (ver análogos 2, 3, tabla 2). La longitud de la cadena grasa en posición sn-1 es crucial ya que los análogos de cadenas más cortas también son ineficaces en la migración celular (ver análogo 6, tabla 2). Se llegó a la misma conclusión con la presencia de un enlace éter en sn-1 (véase el análogo 8, tabla 2). A continuación, se probaron compuestos en los que la parte sn-2 fue modificada y se encontró que los análogos como PAF (compuesto 4) no tienen efecto sobre la migración celular. Por último, encontramos que las partes en sn-3 son esenciales (análogos 9-17). De hecho, la eliminación de la fosfolina en sn-3 disminuye su efecto inhibitorio sobre

la migración celular (compuesto 10). Curiosamente, cuando añadimos más monosacárido en sn-3 (análogos 11-15) la actividad inhibitora vuelve a aparecer. El análogo era aún más eficaz cuando se añade un disacárido (ver análogo 17 y tabla 2).

5 En conclusión identificamos que el enlace éter en sn-1, una longitud de cadena grasa de al menos 16 carbonos en sn-1, una parte O-CH₃ en sn3 y un componente como una fosfocolina o un mono-disacárido son esenciales para la actividad inhibitora de la migración celular. A partir de este cribado el estudio se ha centrado en el JPH1701 que tiene una cadena de C16 en sn-1 con un enlace éter, un O-CH₃ en sn-2 y una β-lactosa en sn-3.

10 La Figura 6 muestra que este análogo inhibe la migración celular partir de 10 nM con un efecto máximo alrededor de 1 μM (Fig. 6A). A estas concentraciones JPH1701 no tiene ningún efecto sobre la viabilidad celular (Fig. 6B). JPH1701 no afectó a la migración celular ni a la viabilidad celular de las células no cancerosas MCF-10A (Fig. 6C y 6D). La Figura 6E demostró que JPH1701 afecta especialmente a la motilidad dependiente de SK3 usando células que están infectadas con lentivirus que codifican para un shRNA dirigido contra SK3. En la condición de control, con un ARNsh al azar, se puso de manifiesto el mismo efecto de inhibición de JPH1701 que con las células de tipo natural (Fig. 6E). Sin el canal SK3/KCa2.3, el nivel de base de la migración se reduce (60 % frente al grupo de control). JPH1701 no tiene ningún efecto aditivo, excepto a 1 μM sobre las células SK3 (Fig 5 o 6C) lo que sugiere un efecto no específico de JPH1701 como se observa a 1 μM con células MCF-10A. Entonces, JPH1701 reducía la migración dependiente de SK3 de las células MDA-MB-435S.

20 A continuación se probó el efecto de JPH1701 sobre la actividad de SK3 en las células MDA-MB-435S utilizando la técnica de pinzamiento de membrana. Estas células fueron tratadas durante 24 h con μM de JPH1701 antes de los ensayos de pinzamiento de membrana. Al comparar con células no tratadas, JPH1701 reduce en gran medida las corrientes de SK3 (Fig. 7A). De hecho, la corriente sensible a apamina fue totalmente abolida después del tratamiento con JPH1701 (Fig. 7B).

30 A continuación se desarrollaron células HEK que expresan el canal SK3/KCa2.3 con el fin de probar directamente en los análogos la actividad SK3 medida utilizando la técnica de pinzamiento de membrana (Fig 8). Se encontró que la aplicación aguda de la molécula a 10 μM reduce la corriente de SK3 y que tanto la amplitud de la corriente registrada a 0 mV (corriente que solo lleva el canal SK3/KCa2.3) y la conductancia de SK3 disminuían por la acción de JPH1701. La inhibición inducida por JPH1701 de la corriente de SK3 se analizó a 0 mV y en la Fig. 8A se muestra todo el transcurso del experimento. El efecto de JPH1701 era dependiente de la dosis y sea cual sea la concentración ensayada (300 nM, 1 fM, 10 μM), se observó la inhibición completa después de una aplicación de 120 seg. Esta inhibición era también dependiente del tiempo. Por ejemplo, JPH1701 10 μM reducía aproximadamente un 70 % la amplitud de la corriente después de 120 seg.

Además, la aplicación de apamina 10 nM bloqueaba completamente la corriente de SK3 (datos no mostrados).

40 Además, se analizó el tiempo necesario para JPH1701 para 0,3, 1 y 10 μM para obtener 50 % de inhibición de la corriente (Fig. 8B). Cualquiera que sea la concentración ensayada se necesitaba aproximadamente 40 segundos para reducir el 50 % de la amplitud de la corriente. La corriente de potasio endógena de HEK no se vio afectada significativamente por JPH1701 en el rango de concentración aplicada (datos no mostrados). El aumento de la concentración de calcio intracelular mediante la adición de A23187 5 μM invirtió totalmente el efecto de JPH1701 (datos no mostrados).

45 Dado que JPH1701 se probó como una mezcla racémica, nos preguntamos si su capacidad para reducir el canal SK3 se debía específicamente a uno de sus enantiómeros ((R)-JPH1701 y (S)- JPH1701). La síntesis de R- y S-JPH1701 enantioméricamente puro se logró a partir del (2R) y (2S) 1-O-hexadeciloxi-2-O-metil-sn-glicerol enantioméricamente puro. En comparación con la mezcla racémica, ambos enantiómeros mostraban un comportamiento similar en la reducción de la actividad de los canales SK3 (Fig. 8C). Por lo tanto, los siguientes experimentos se realizaron usando una combinación de JPH1701 de ambos enantiómeros.

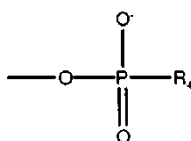
50 Para investigar si JPH1701 interactúa con el sitio de unión a apamina, se realizaron estudios de unión a 125I-apamina. La Figura 8E muestra que JPH1701 no inhibe la unión a 125I-apamina a la membrana que expresa los canales SKCa, lo que sugiere que JPH1701 y la apamina actúan a través de un sitio distinto y un mecanismo que aún no se investigó.

55 Se ensayó la selectividad de JPH1701 hacia los otros miembros de los canales SKCa/IKCa. La Fig. 9A muestra corrientes en células enteras representativas obtenidas en SK1, SK2, SK3 y canales IKCa expresados en células HEK en condiciones de control y después de la aplicación de JPH1701 10 μM. El protocolo experimental fue similar al utilizado en la Fig. 8. JPH1701 se ensayó para determinar el potencial de membrana desde +60 mV a -100 mV en 500 ms. Cuando se alcanzó la inhibición en el estado estacionario, se aplicaron apamina 10 nM o clotrimazol 1 μM, respectivamente, para inhibir completamente las corrientes SKCa e IKCa residuales. La Fig. 9B muestra que JPH1701 es inactivo en las corrientes de IKCa pero es capaz de reducir significativamente las corrientes de SK1 y SK3 con una potencia que es SK3>SK1. A la concentración ensayada nuestro compuesto era inactivo en los canales SK2.

Estos resultados demuestran que los compuestos de fórmula (I) y en particular los compuestos de fórmula (I) seleccionados del grupo de compuestos (A a P, véase la descripción detallada de la invención) se podría utilizar para discriminar entre el canal SK2 y SK1/SK3 y se convertiría en herramientas útiles para investigar el papel funcional del canal SK3 en los tejidos periféricos (que no expresa el canal SK1).

Con el fin de ir más allá en la identificación de los análogos, se ensayaron análogos de la melibiosa o maltosa hexadeciloxi-2-O-metil-sn-glicerol (HMG) en la corriente SK3, así como moléculas similares a JPH que tienen O-acetilo en cada carbono de la lactosa (Tabla 3). La melibiosa y la maltosa redujeron la actividad de SK3, así como JPH1700, que es un precursor de JPH1701 con grupos O-acetilo en cada carbono de la lactosa, pero todos estos análogos tienen menos efecto.

Finalmente hemos probado el efecto inhibitorio sobre la actividad de SK3 del compuesto en el que R₃ consiste en:



y en la que R₄ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido (compuestos M, N, O y P, por ejemplo).

CHS31 (que es un ejemplo de compuesto M) es un ejemplo de un análogo de hexadeciloxi-2-O-metil-sn-glicerol con un enlace fosfato en su sn3 (es decir: R₃) (ver tabla 3). Al igual que JPH1700, esta molécula reducía la actividad SK3. Aunque ninguno de estos compuestos fue tan eficaz como JPH1701, esto indica que la familia de disacáridos hexadeciloxi 2-O-metil-sn-glicerol (HMG) tiene el potencial de inhibir el canal SK3 y por lo tanto de presentar un efecto antimetastásico.

B.2. Efecto anti-metastásico de JPH1701 en el modelo experimental de metástasis

Recientemente hemos demostrado que la actividad de los canales SK3/KCa2.3 en la línea celular de cáncer MDA-MB-435s promueve el desarrollo de metástasis. Para determinar si un bloqueador de SK3/KCa2.3 como JPH1701 podría prevenir el desarrollo de metástasis, se utilizó un modelo de metástasis experimental con células MDA-MB-435s que expresa el gen de la luciferasa de luciérnaga. Se inyectaron células cancerosas directamente en la circulación sistémica en la vena de la cola. Una cohorte de ratones se trató con JPH1701 tres veces a la semana durante 12 semanas mediante administración i.v. Otra cohorte se trató con el vehículo en las mismas condiciones. Al final del tratamiento, se visualizaron las metástasis *in vivo* por imágenes de bioluminiscencia (BLI) en 70 % (7/10) de los ratones de control y sólo en el 40 % (4/10) de los ratones tratados con JPH1701 (Tabla 4). Aún más, los ratones se sacrificaron y se realizó la detección de metástasis en diferentes tejidos *ex vivo* por BLI. El número de tejidos positivos de cada cohorte se mostró en la Tabla 4. Las lesiones metastásicas se detectaron en todos los ratones tratados con vehículo. Curiosamente, 30 % (3/10) de los ratones tratados con JPH1701 no mostró ningún signo de desarrollo de metástasis *ex vivo*. Usando un enfoque clínico, se determinó el perfil metastásico de cada ratón y se encontró que el tratamiento con JPH1701 cambió el perfil metastásico hacia un menor (Fig. 10A-B, 10C y 10D).

Para obtener más información acerca de efecto antimetastásico de JPH1701, se comparó la cinética de la aparición de metástasis entre ambas cohortes por BLI. Sólo los ratones con metástasis que se visualizan *in vivo* en la semana 12 (punto final) fueron incluidos en este estudio. Como se muestra en la Fig. 10E, la aparición de metástasis fue aproximadamente 3 veces más rápida en el grupo control que en el grupo tratado con JPH1701. El setenta y cinco por ciento de los ratones tratados con vehículo presentaba metástasis detectables en la semana 4. En cuanto a los ratones tratados con JPH1701 tuvimos que esperar 3 semanas más. En conclusión JPH1701 permitió el retraso de la formación de metástasis en ratones que muestran metástasis *in vivo* (4/10). Por otra parte, una vez detectadas las metástasis, la tasa de crecimiento fue similar en ambos grupos (Fig. 10F).

Hemos demostrado *in vitro* que JPH1701 inhibía la motilidad dependiente de SK3 pero no tenía ningún efecto sobre la proliferación de MDA-MB-435s. Los datos *in vivo* eran coherentes con los encontrados *in vitro*: se inyectó en la vena de la cola MDA-MB-435s y estas tenían que moverse hacia los vasos capilares pulmonares, de 10 µm de diámetro (como el diámetro de poro en los ensayos de motilidad 2D), antes de llegar a la sangre arterial de los potenciales sitios metastásicos. JPH1701 impedía el desarrollo de metástasis, probablemente mediante la inhibición de la motilidad dependiente de SK3 necesaria para la extra e intravasación de células cancerosas. Sin embargo, una vez que las células cancerosas alcanzaban un tejido con entorno favorable para su proliferación, el tratamiento con JPH1701 no impedía su proliferación.

B.3. El tratamiento con JPH1701 no afecta al crecimiento del tumor primario

También se ha descrito que edelfosina ejerce su efecto biológico a través de varios mecanismos y, en particular a través de la inhibición de la actividad de la enzima como la proteína quinasa C o la fosfolipasa C. Las inhibiciones

pueden explicar algunos de los efectos citostáticos y citotóxicos de edelfosina (Gajate, C., y Mollinedo, F., *Curr Drug Metab*, 2002, 3, 491-525, Van Blitterswijk, W. J., y Verheij, M., *Curr Pharm Des* 2008, 14, 2061-2074). Hemos demostrado que JPH1701 era incapaz de interactuar con todas las PKC y sólo podía interactuar ligeramente con PLC en comparación con edelfosina.

De hecho, la estructura molecular de JPH1701 se asemeja a la de LPA y PAF. Esta similitud entre las estructuras moleculares nos llevó a analizar si algunos de los efectos de JPH1701 estaban mediados a través de su unión al receptor de PAF o al receptor de LPA (ácido lisofosfatídico). Como se muestra en la Fig. 11 edelfosina era capaz de interactuar con el sitio de unión a C16-PAF del receptor PAF (Fig. 11A) y, por lo tanto, aumentaba el calcio intracelular de forma dependiente de la dosis (Fig. 11B). En comparación con JPH1701 era incapaz de interactuar con el receptor de PAF. Los mismos resultados se obtuvieron con el receptor de LPA (105,3 ± 8,0 % y 87,2 ± 4,7 % de unión a LPA, respectivamente, a 0,3 y 2 µM de JPH1701 M).

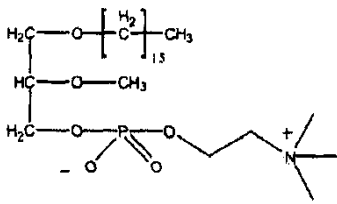
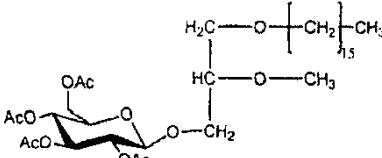
También se ha informado de que edelfosina inhibe la actividad enzimática como la proteína quinasa C o fosfolipasa C, lo que puede explicar algunos de sus efectos citostáticos y citotóxicos. La Fig. 11D muestra que JPH1701 era capaz de interactuar con la actividad de PLC con una CI_{50} de 7,0 µM que es un valor mucho más alto que el que se determina para edelfosina (CI_{50} de 2,5 µM).

En cuanto a la actividad de PKC, JPH1701 no afectó a la actividad de ninguna de la familia de diez PKC, (Fig. 11C).

Por último, hemos demostrado que a diferencia de la edelfosina, JPH1701 no se dirige el crecimiento del tumor primario y es, por lo tanto, específica de los procesos metastásicos. Se injertaron dos millones de células MDA-MB-435s-luc pretratadas durante 24 horas con JPH1701 (Ohmline) (1 µM) o vehículo en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NMRI/desnudos. Los ratones se trataron tres veces por semana con JPH1701 a 15 mg/kg por inyección i.v. o con vehículo. Al observar el transcurso a lo largo del tiempo del volumen del tumor durante 6 semanas después del injerto, no hubo diferencias entre los ratones tratados con vehículo y JPH1701 (Fig. 12A). Del mismo modo, la evaluación semanal del número de células cancerosas en el tumor primario durante 6 semanas no puso de relieve ninguna diferencia significativa entre los ratones tratados con vehículo y JPH1701 (Fig. 12B).

El efecto limitado del glicerolípido de fórmula (I) sobre la viabilidad celular de células epiteliales no cancerosas en comparación con un compuesto no específico, tal como edelfosina, asociado con su acción sobre la migración de células SK3 a bajas concentraciones, es prometedor debido a que los problemas asociados con el uso de compuestos del tipo edelfosina han sido que sus altas concentraciones eficaces son generalmente citotóxicas debido a su carácter de tipo detergente que provoca la lisis celular normal.

Tabla I

Compuesto de fórmula (I)	Citotoxicidad CI_{50} (µM)	Inhibición de la migración celular de MDA-MB-435s (SK3 ⁺)	
		Efecto inhibitorio (%)	Concentración (nM)
 <p>1321</p>	± 30	50	100
 <p>1518</p>	± 30	30	10

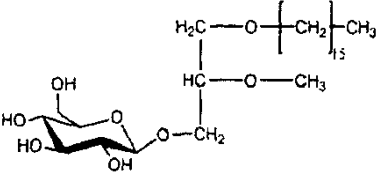
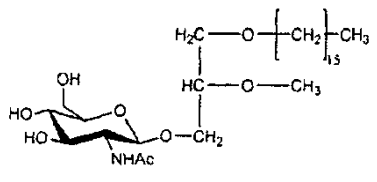
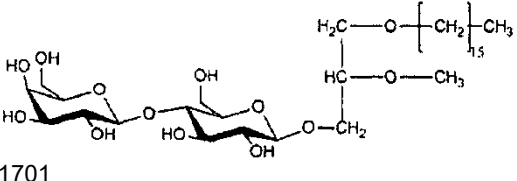
Compuesto de fórmula (I)	Citotoxicidad CI ₅₀ (μM)	Inhibición de la migración celular de MDA-MB-435s (SK3 ⁺)	
		Efecto inhibitorio (%)	Concentración (nM)
<p>1523</p> 	>10	50	300
<p>1528</p> 	± 100	50	300
<p>1701</p> 	>10	50	300

Tabla 2. Moléculas ensayadas respecto a la migración y viabilidad de las células cancerosas MDA-MB-435s

Nº	Moléculas	Modificaciones	R1	R2	R3	Toxicidad	CI50 (µM)	Migración (% de inhibición)	Concentración (nM)
	Edelfosina		-O-(CH2)17-CH3	-O-CH3	Fosfocolina	Si a 10 µM	±5	60	10
1	Edelfosina		-O-(CH2)17-CH3	-O-CH3	Fosfocolina	Si a 10 µM	±5	80	300
2	Miltefosina	Sin glicerol	H3C-(CH2)17-Fosfocolina				±10	20	300
3	SK55	Sin glicerol	H3C-(CH2)17-Fosfocolina				±20	ND	ND
4	PAF	R2	-O-(CH2)15-CH3	-O-CO-CH3	Fosfocolina	No hasta 100 µM	ND	Sin efecto	300
5	HCG450	R1 (disminución del número de carbonos) y R2 y R3 [(OAc)4BetaGlu]	-O-(CH2)4-CH3	-OH	-O-(OAc)4betaGlu	Si a 10 µM	±30	ND	ND
6	HCG451	R1 (disminución del número de carbonos) y R2 y R3 [(OH)4BetaGlu]	-O-(CH2)4-CH3	-OH	-O-(OH)4betaGlu	No hasta 100 µM	ND	Sin efecto	300
7	JPH 1321	R1 (disminución del número de carbonos)	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	Fosfocolina	Si a 10 µM	±30	50	100
8	JPH 1324	R1 (disminución del número de carbonos) y ningún enlace éter	-(CH2)15-CH3	-O-CH3	Fosfocolina	Si a 3 µM	±5	50	300
9	GS 1361	R2 (OH) y R3 (OH)	-O-(CH2)15-CH3	-OH	-OH	No a 10 µM	ND	40	300
10	JPH 1597	R3 (OH)	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-OH	No a 10 µM	±50	Sin efecto	300
11 (A)	JPH 1518	R3 [(OAc)4BetaGlu]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-(OAc)4betaGlu	No hasta 30 µM	ND	30	10
12 (B)	JPH 1519	R3 [(OAc)4BetaGlu]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-(OAc)4betaGal	ND	ND	20	100
13 (A)	JPH 1523	R3 [(OH)4BetaGlu]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-(OAc)4betaGlu	No a 10 µM	ND	50	300

Nº	Moléculas	Modificaciones	R1	R2	R3	Toxicidad	CI50 (µM)	Migración (% de inhibición)	Concentración (nM)
14	JPH 1524	R3 [(OH)4BetaGal]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-(OH)4betaGal	Si a 10 µM	±10	20	300
15 (C)	JPH 1528	R3 [NHAc(OH)3BetaGlu]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-NHAc(OH)3betaGlu	No a 10 µM	≥100	50	300
16	JPN 1731	R1 (C18), R3 ((OH)7BetaLactosa]	-O-(CH2)17-CH3	-O-CH3	-O-(OH)7betaLactosa	ND	ND	30	100
17 (D)	JPH 1701	R3 [(OH)7BetaLactosa]	-O-(CH2)15-CH3	-O-CH3	-O-(OH)7betaLactosa	No a 10 µM	ND	50	300

Tabla 3 Nuevas moléculas inhibidoras de SK3

Moléculas	Estructura	Inhibición de I a 0 mV (%)	Disminución de la conductancia (%)	Corriente sensible a apamina en MDA-MB-435s (pA/pF)
JPH1874	sn-3 : melibiosa OAc	44,0 ± 5,5	34,1 ± 6,8	ND
JPH1880	sn-3 : maltosa OAc	44,7 ± 5,0	46,1 ± 6,1	ND
JPH1882 (I)	sn-3 : melibiosa	44,2 ± 5,1	36,1 ± 8,5	0,167 ± 0,085
JPH1700	sn-3 : β-lactosa OAc	22,8 ± 2,1	18,1 ± 2,3	ND
CHS31	sn-3 : fosfo-β-lactosa OAc	42,5 ± 8,2	38,9 ± 5,5	ND
JPH1701 (D)	sn-3 : β-lactosa	70,1 ± 1,4	66,1 ± 1,5	0,071 ± 0,215

5 La Tabla 3 muestra el efecto de diferentes moléculas sobre la actividad de SK3 en 2 modelos. La actividad de la corriente se ha medido en células HEK 293 LvSK3 y en células MDA-MB-435S. Los porcentajes representan la inhibición de la corriente y de la conductancia por los compuestos en el canal SK3 en las células HEK 293. La corriente sensible a apamina muestra la parte de la corriente residual que ha sido abolida por apamina en las células MB-435s MDA de tipo natural.

10

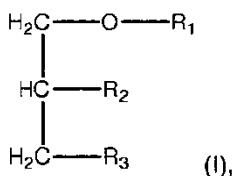
Tabla 4

	vehículo	JPH1701
<i>In vivo</i>	7	4
<i>ex vivo</i>	10	7
ovario/útero	2	0
riñón	1	0
hígado	3	0
pulmón	9	5
pata	7	3
columna	5	2
bazo	1	0
ganglio linfático	2	1

*Número de ratones con metástasis experimentales detectas *in vivo* y *ex vivo* por BLI.
 **Número de tejidos con metástasis detectadas por BLI. N = 10 para cada cohorte.

REIVINDICACIONES

1. Un glicerolípido de fórmula (I)



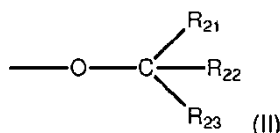
5

en la que:

- R₁ es un grupo alquilo o alquenoilo que tiene de 16 a 18 átomos de carbono,
- R₂ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en:

10

(a) un grupo de fórmula (II):



15

en la que R₂₁, R₂₂ y R₂₃, independientemente entre sí, se seleccionan del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo alquilo que tiene 1 o 2 átomos de carbono, y

(b) un hidroxilo,

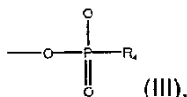
y

20

- R₃ se selecciona del grupo que consiste en:

- un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido, o
- un grupo de fórmula (III)

25



30

en la que R₄ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido,

para su uso en la prevención de la metástasis cancerosa sin efecto sobre el crecimiento del tumor primario.

2. El glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₁ es un grupo alquilo o alquenoilo que tiene 16 o 17 átomos de carbono.

35

3. El glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₁ es -(CH₂)₁₅-CH₃.

4. El glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₂ es de fórmula (II) y cada uno de R₂₁, R₂₂ y R₂₃ son un átomo de hidrógeno.

40

5. El glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₃ o R₄ es un monosacárido seleccionado del grupo que consiste en un pentosilo y un hexosilo.

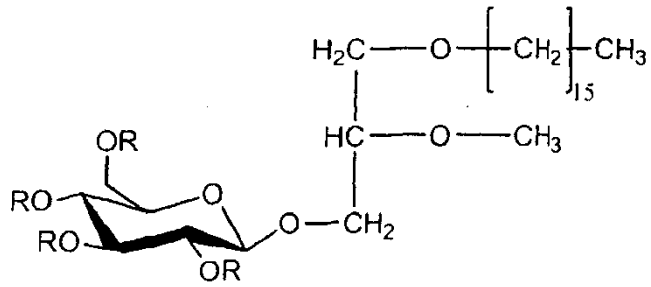
6. El glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que R₃ o R₄ es un hexosilo seleccionado del grupo que consiste en D-glucosilo, D-manosilo y D-galactosilo.

45

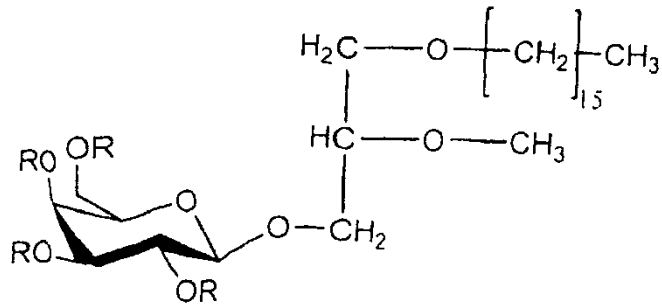
7. El compuesto glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los compuestos de fórmula (I) se seleccionan del grupo que consiste en los compuestos (A) a (P) siguientes:

50

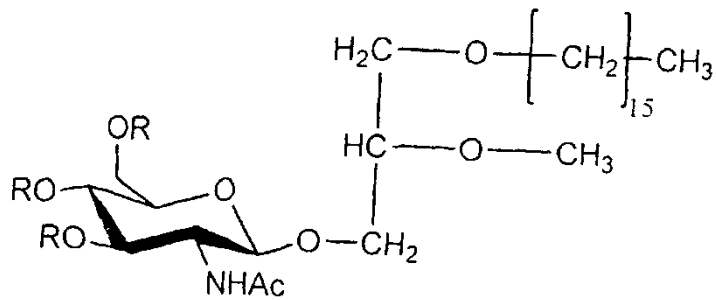
- Compuesto (A):



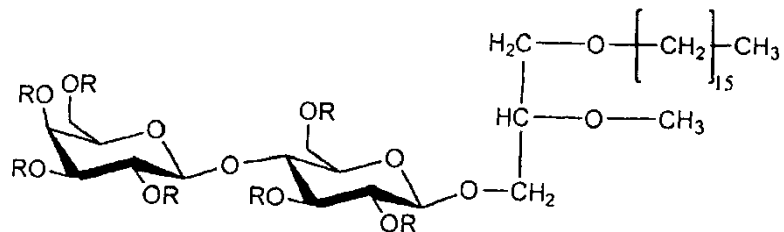
5 R = H o CH₃CO
- Compuesto (B):



10 R = H o CH₃CO
- Compuesto (C):

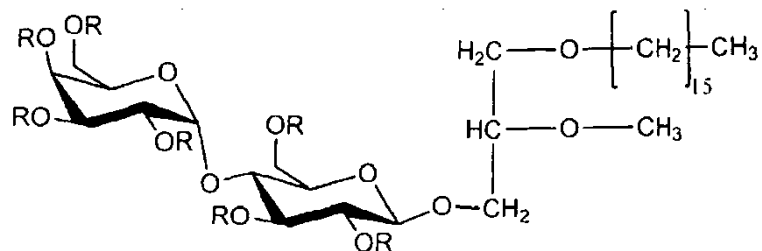


15 R = H o CH₃CO
- Compuesto (D):



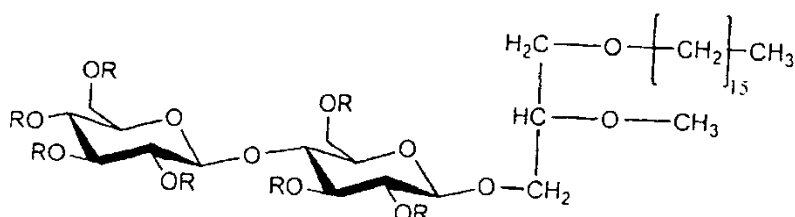
20 R = H o CH₃CO
en la que R₃ significa un grupo Gal-β-(1-4)-Glu, también denominado lactosa

- Compuesto (E):



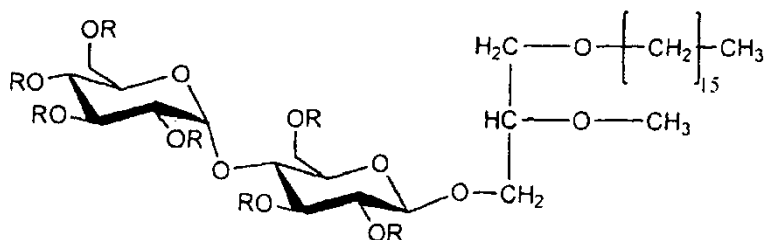
5 R = H o CH_3CO
 en la que R_3 significa un grupo Gal- α -(1-4)-Glu

- Compuesto (F):



10 R = H o CH_3CO
 en la que R_3 significa un grupo Glu- β -(1-4)-Glu,

- Compuesto (G):



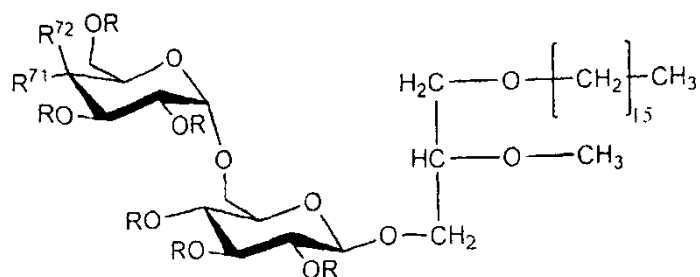
15 R = H o CH_3CO
 en la que R_3 significa un grupo Glu- α -(1-4)-Glu, también denominado maltosa,

- Compuesto (H):

20

25 R = H o CH_3CO
 en la que R^{71} y R^{72} se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal- β -(1-6)-Glu cuando R^{71} es H y R^{72} es OH u OAc y (ii) Glu- β -(1-6)-Glu cuando R^{71} es OH u OAc y R^{72} es H.

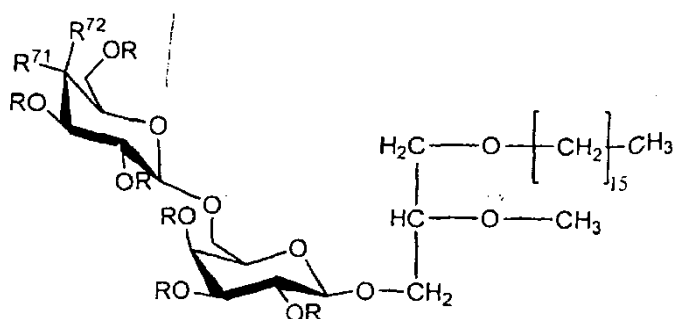
– Compuesto (I):



5 R = H o CH₃CO
 en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc, también denominado melibiosa o acetilmelibiosa y (ii) Glu-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H,

– Compuesto (J):

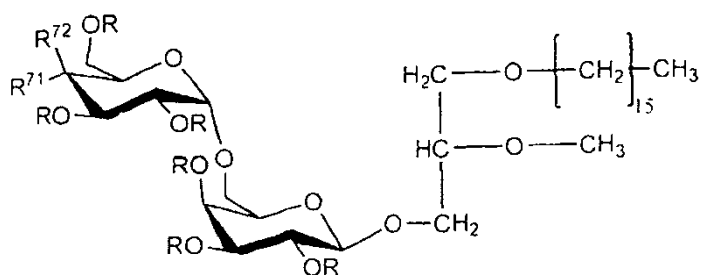
10



15 R = H o CH₃CO
 en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-β-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc y (ii) Glu-β-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

– Compuesto (K):

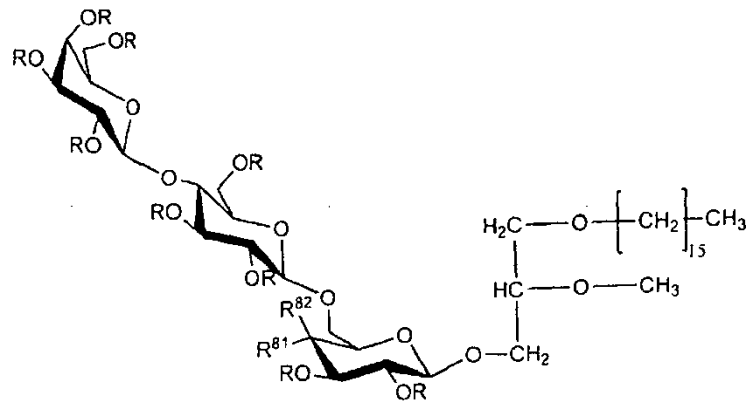
20



25 R = H o CH₃CO
 en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc y (ii) Glu-α-(1-6)-Gal cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

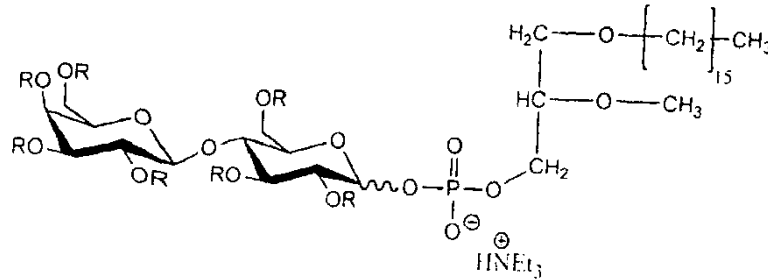
25

– Compuesto (L):



5 R = H o CH₃CO
 en la que R⁸¹ y R⁸² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo,

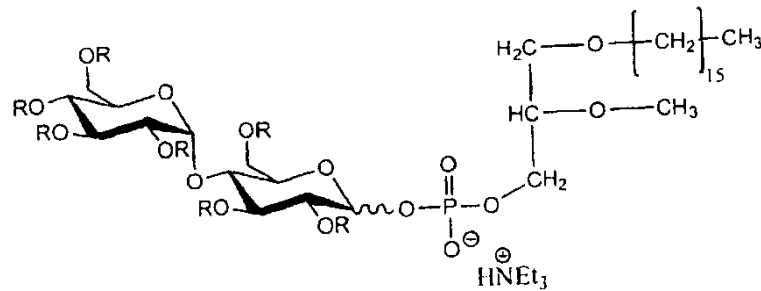
– Compuesto (M):



10

R = H o CH₃CO
 en la que R₄ significa un grupo Gal-β-(1-4)-Glu, también denominado lactosa o acetilactosa,

– Compuesto (N):

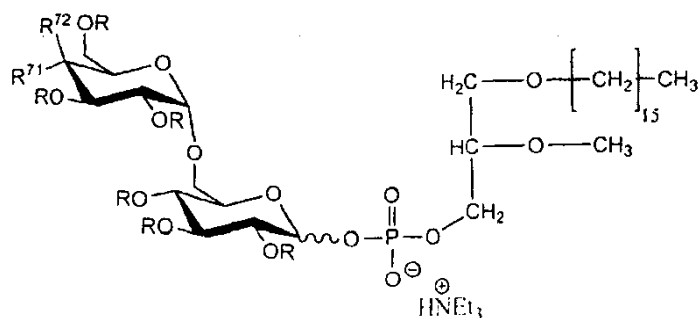


15

R = H o CH₃CO
 en la que R₄ significa un grupo Glu-α-(1-4)-Glu, también denominado maltosa o acetilmaltosa,

20

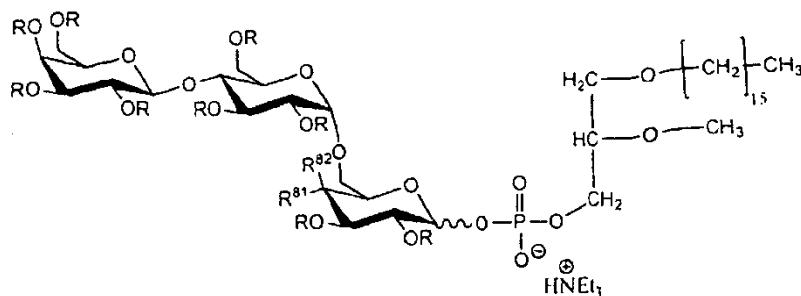
– Compuesto (O):



5 R = H o CH₃CO
 en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc, también denominado melibiosa o acetilmelibiosa y (ii) Glu-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

– Compuesto (P):

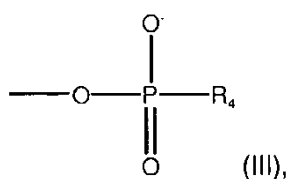
10



15 R = H o CH₃CO
 en la que R⁸¹ y R⁸² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) lactosa-β- o acetilactosa-β-(1-6)-Gal cuando R⁸¹ es H y R⁸² es OH u OAc y (ii) lactosa-β- o acetilactosa-β-(1-6)-Glu cuando R⁸¹ es OH u OAc y R⁸² es H.

8. Un glicerolípido de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, en la que R₃ consiste en un grupo de fórmula (III)

20



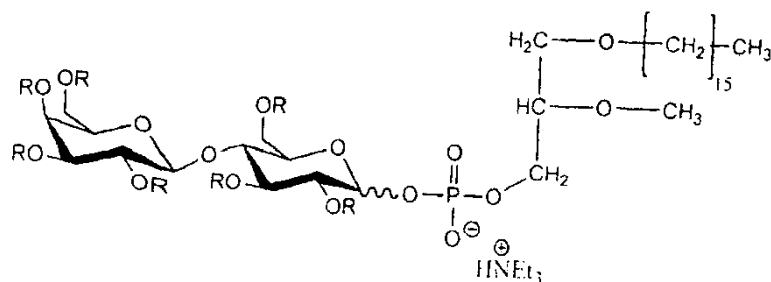
25 y en la que R₄ se selecciona del grupo que consiste en un grupo monosacárido o un grupo polisacárido que tiene de 2 a 4 unidades de sacárido para su uso como un medicamento.

25

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, seleccionado del grupo que consiste en los compuestos (M) a (P) siguientes:

– Compuesto (M):

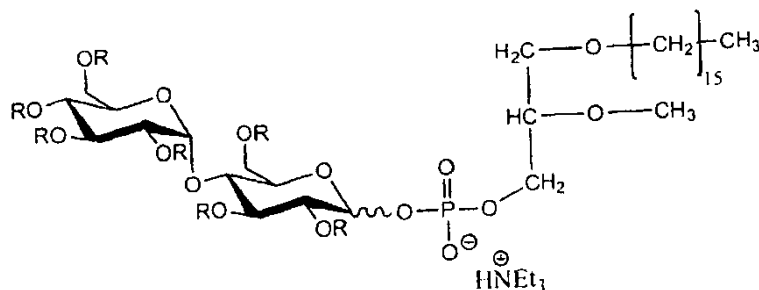
30



R = H o CH₃CO

en la que R₄ significa un grupo Gal-β-(1-4)-Glu, también denominado lactosa o acetilactosa,

– Compuesto (N):



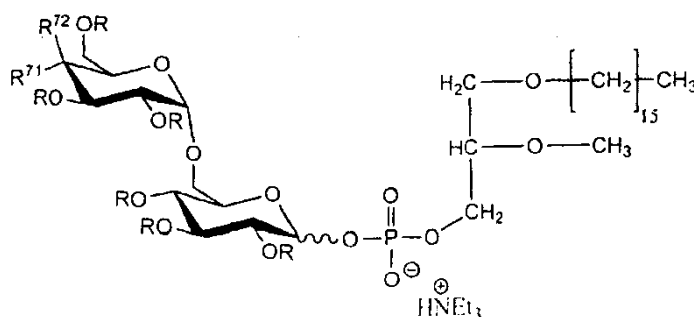
5

R = H o CH₃CO

en la que R₄ significa un grupo Glu-α-(1-4)-Glu, también denominado maltosa o acetilmaltosa,

– Compuesto (O):

10

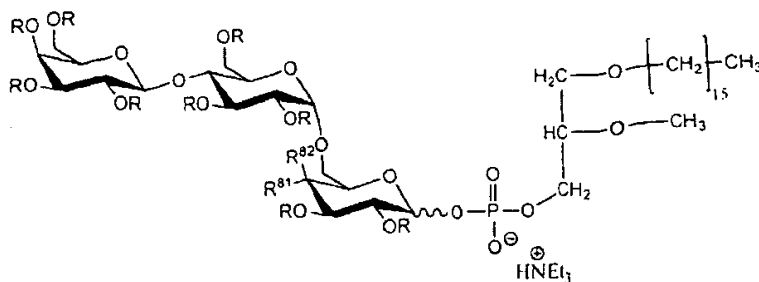


R = H o CH₃CO

en la que R⁷¹ y R⁷² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o acetilo, el cual abarca (i) Gal-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es H y R⁷² es OH u OAc, también denominado melibiosa o acetilmelibiosa y (ii) Glu-α-(1-6)-Glu cuando R⁷¹ es OH u OAc y R⁷² es H.

15

– Compuesto (P):



20

R = H o CH₃CO

en la que R⁸¹ y R⁸² se seleccionan independientemente del grupo que consiste en un átomo de hidrógeno y un grupo hidroxilo o grupo acetilo, el cual abarca (i) lactosa-β- o acetilactosa-β-(1-6)-Gal cuando R⁸¹ es H y R⁸² es OH u OAc y (ii) lactosa-β- o acetilactosa-β-(1-6)-Glu cuando R⁸¹ es OH u OAc y R⁸² es H,

25

para su uso como un medicamento.

10. Un glicerolípido de fórmula (I), como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9.

30 11. Una composición farmacéutica para la prevención de la metástasis que comprende un compuesto de fórmula (I) como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

35 12. Un glicerolípido de fórmula (I) para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en la prevención de la metástasis cancerosa sin efecto sobre el crecimiento del tumor primario.

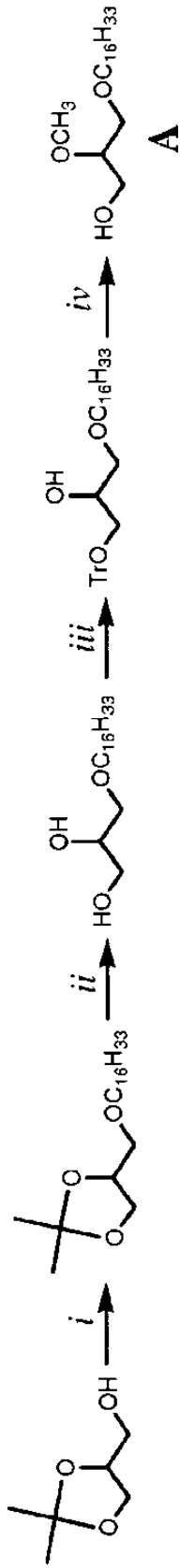


Figure 1

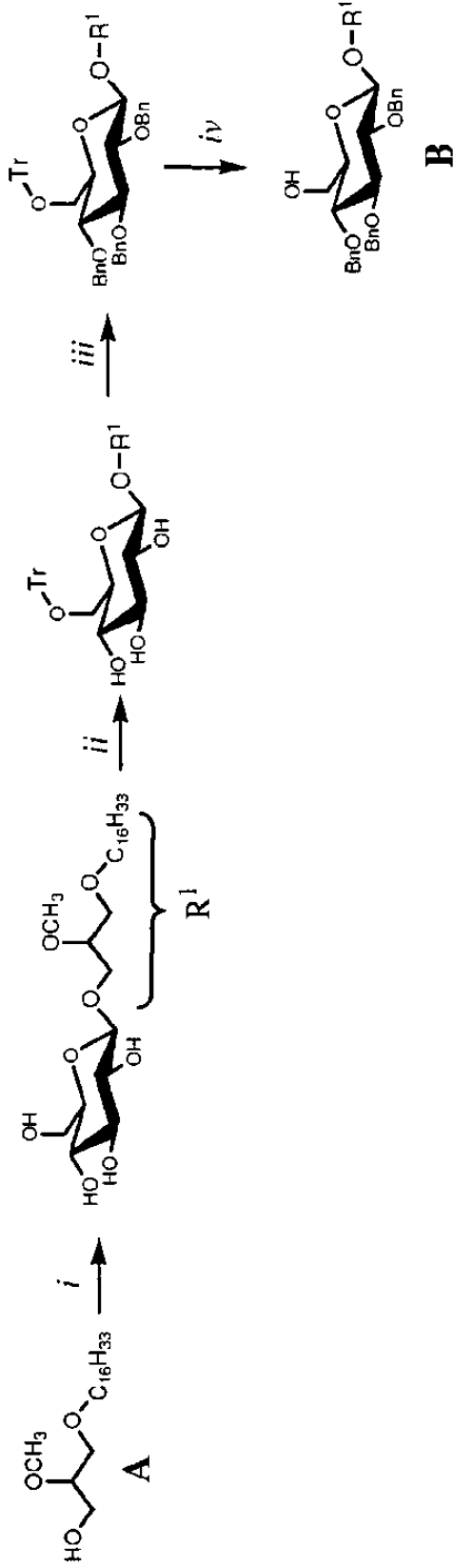


Figure 2

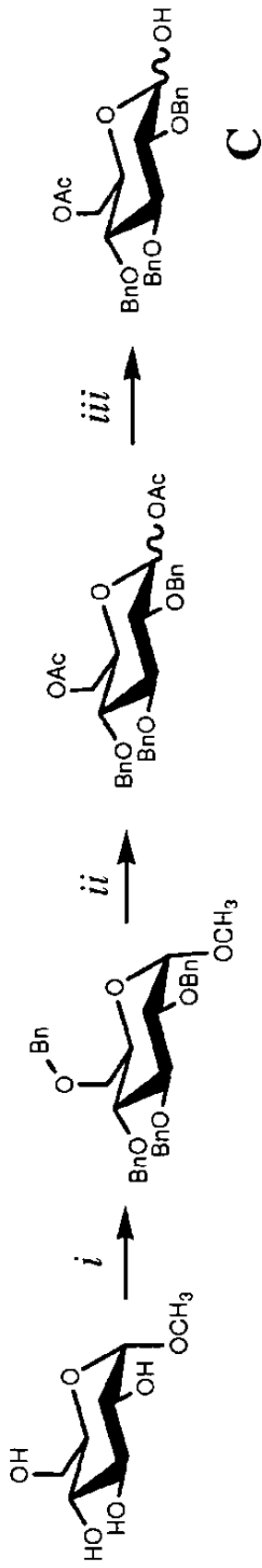


Figure 3

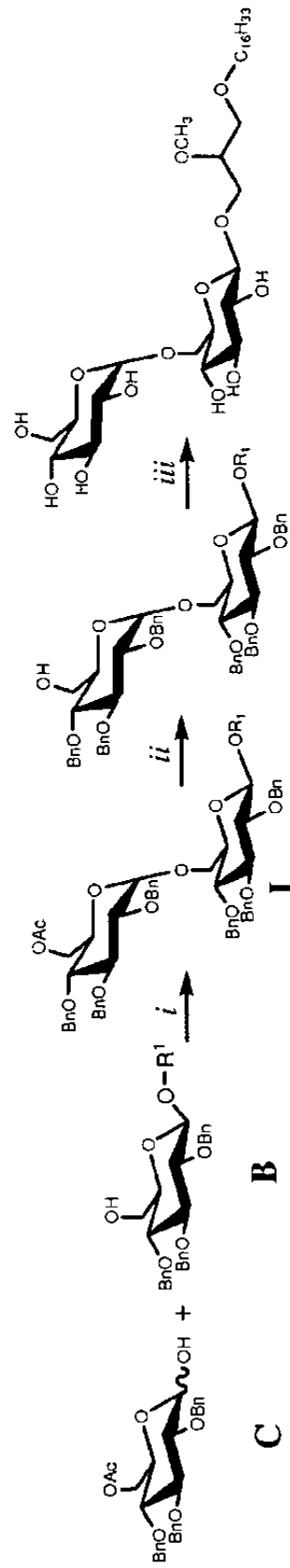


Figure 4

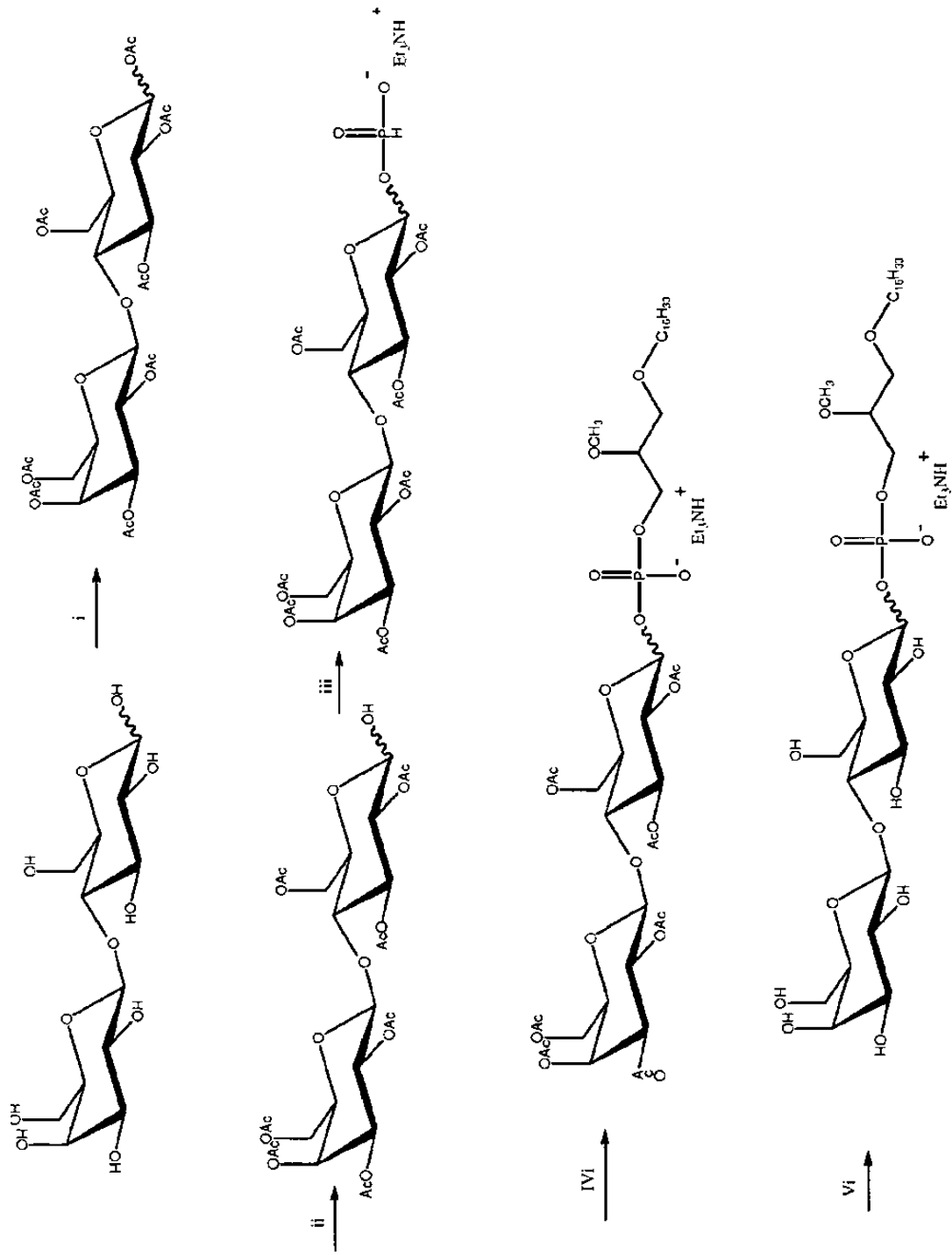


Figure 5

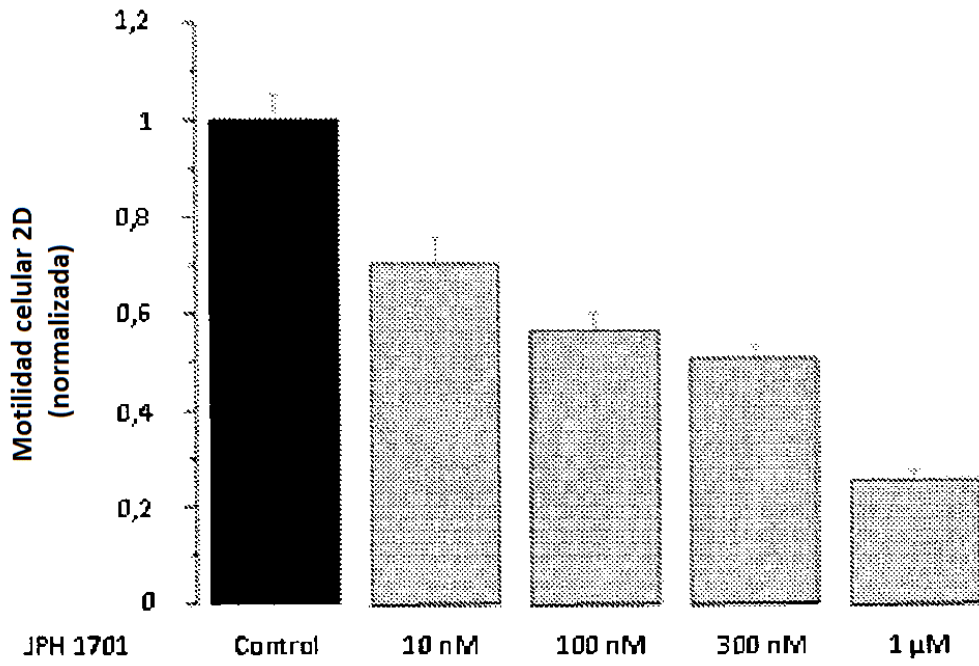


Figura 6A

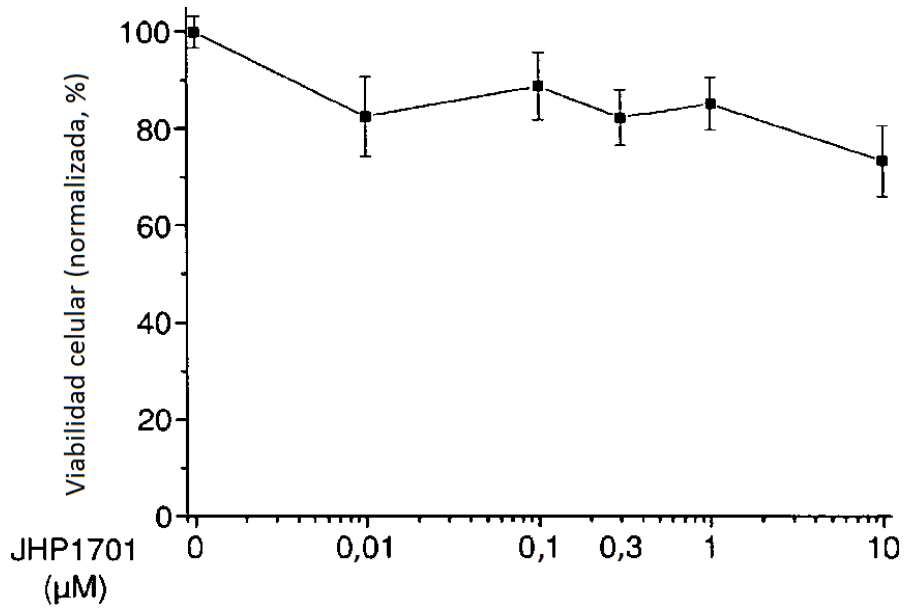


Figura 6B

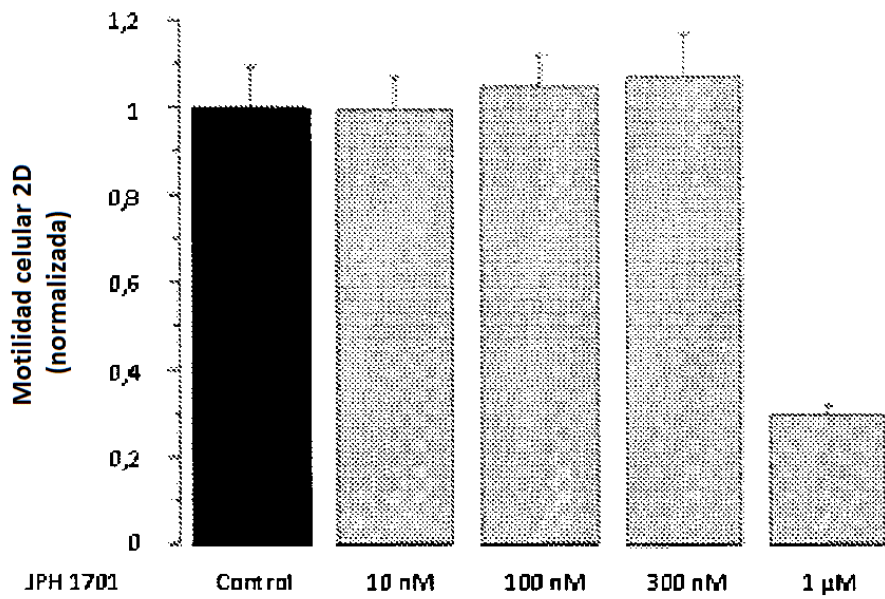


Figura 6C

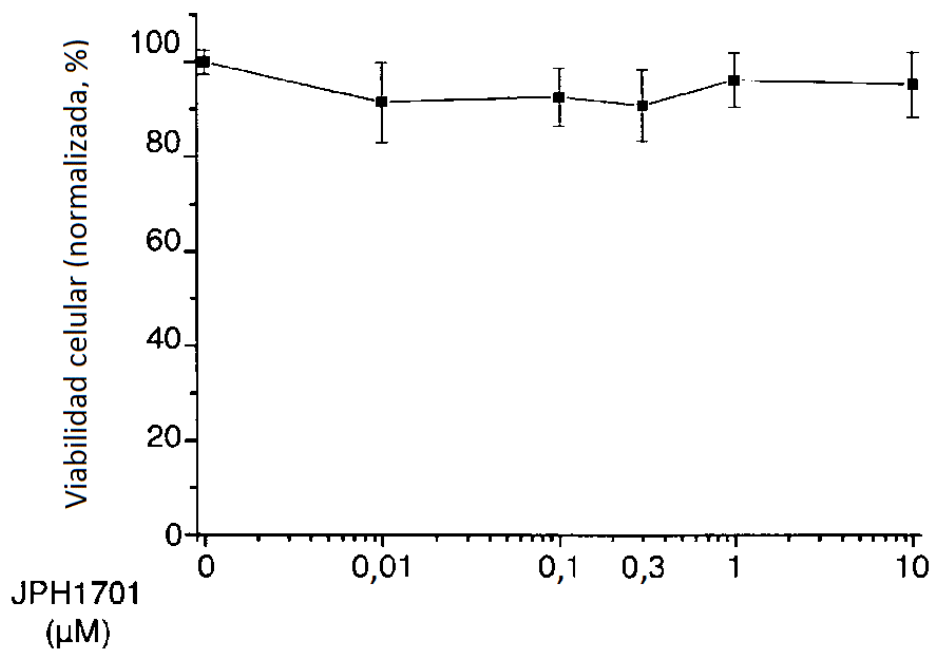


Figura 6D

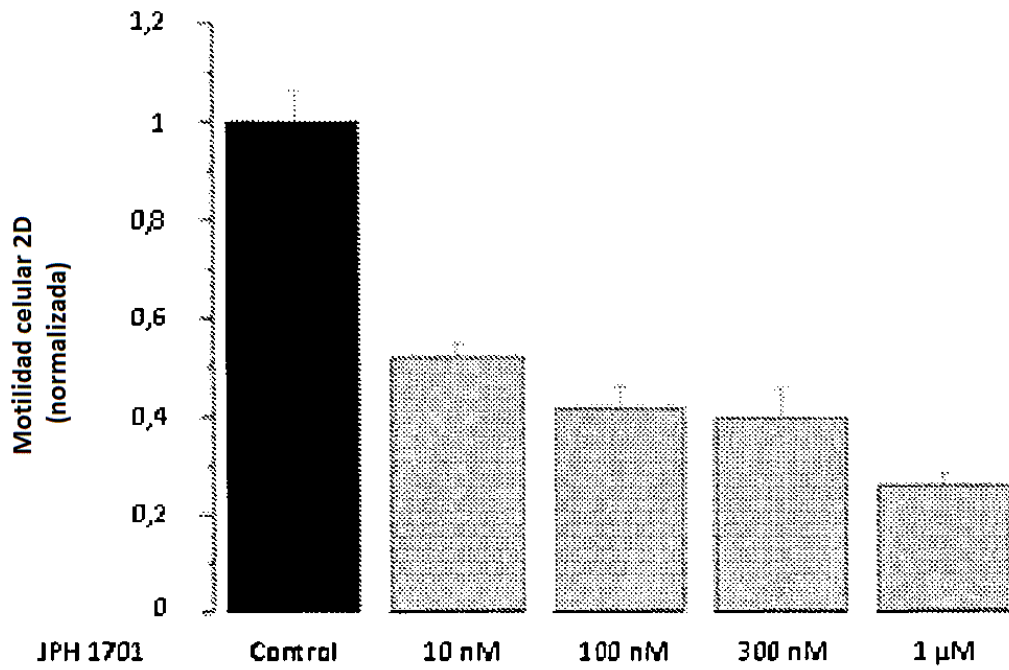


Figura 6E

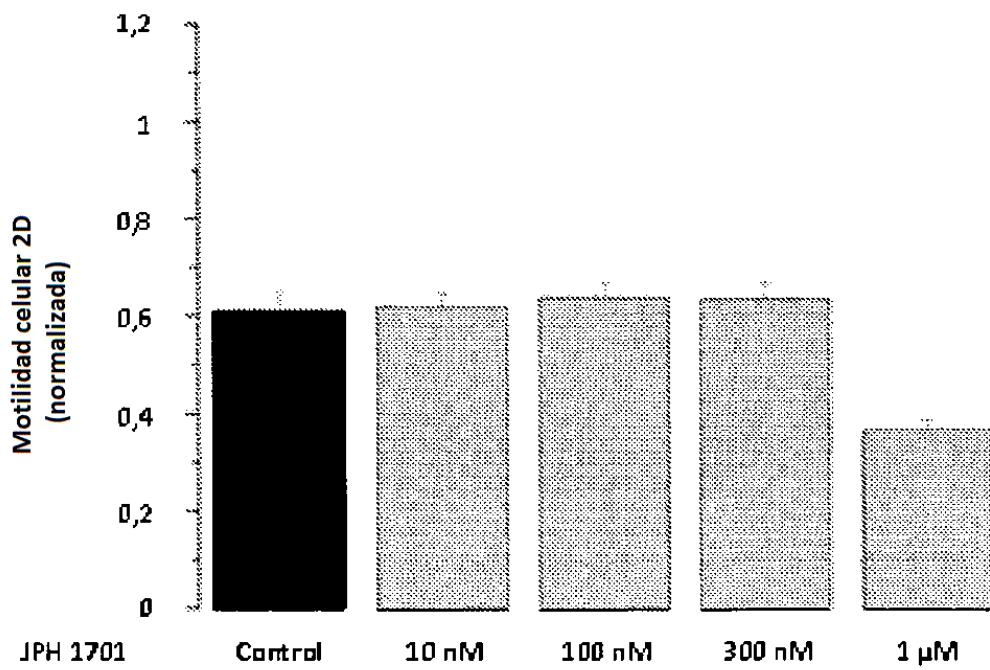


Figura 6F

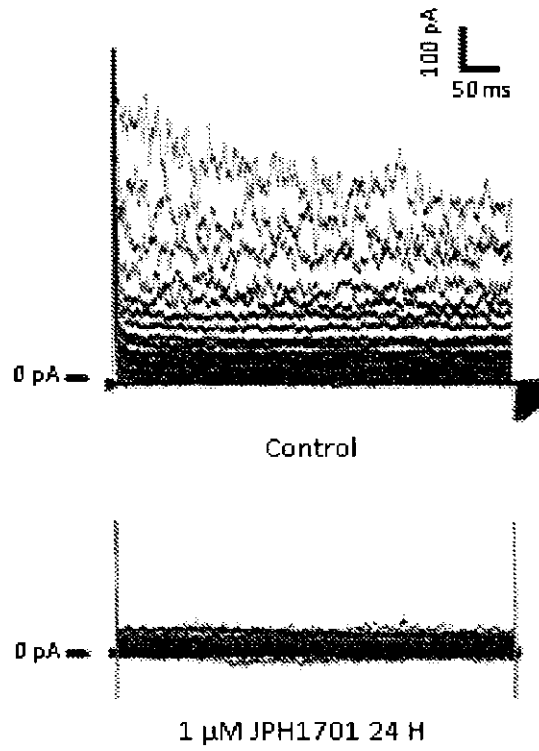


Figura 7A

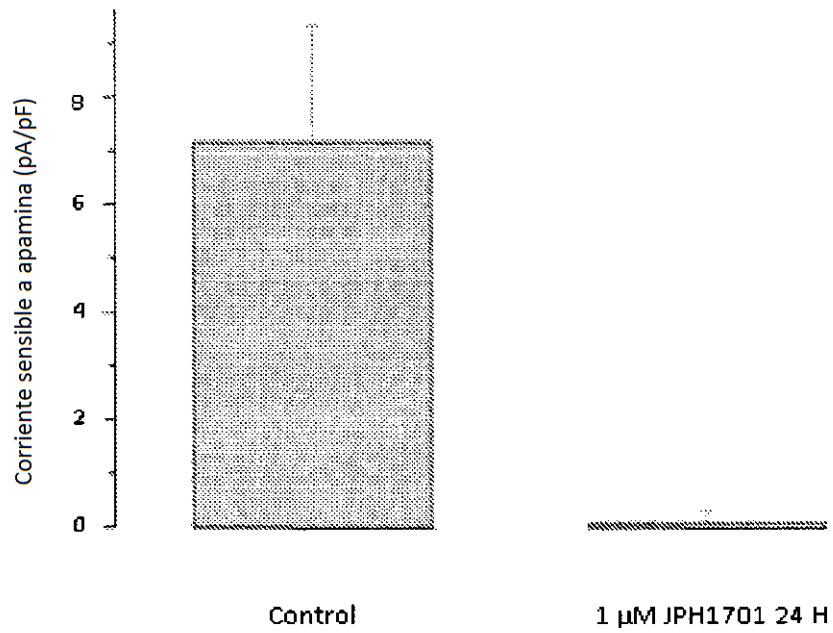


Figura 7B

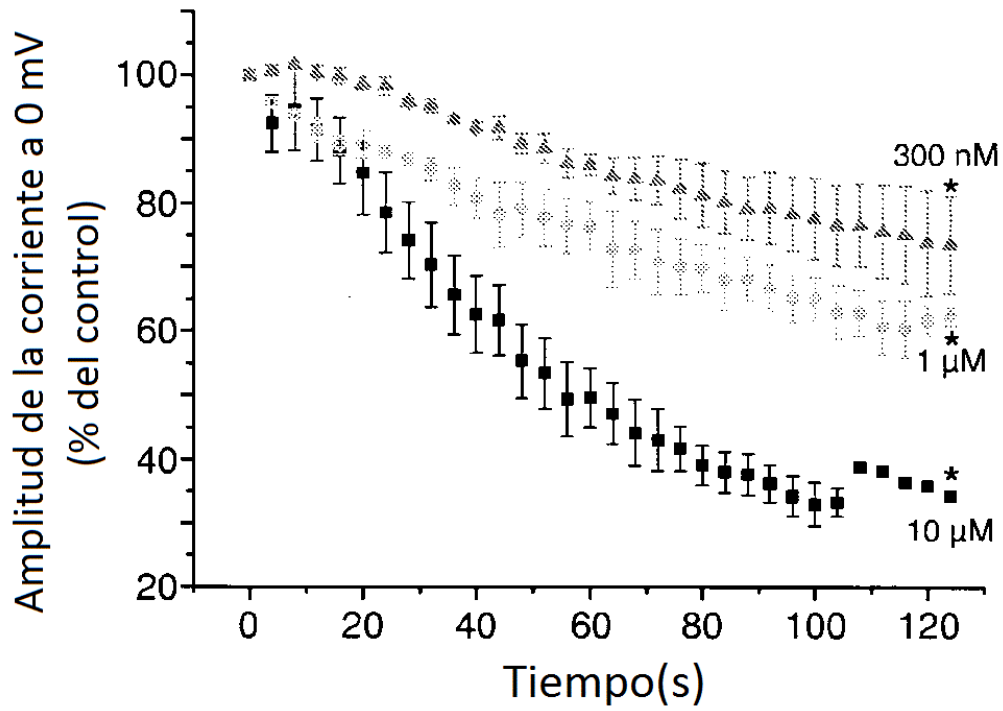


Figura 8A

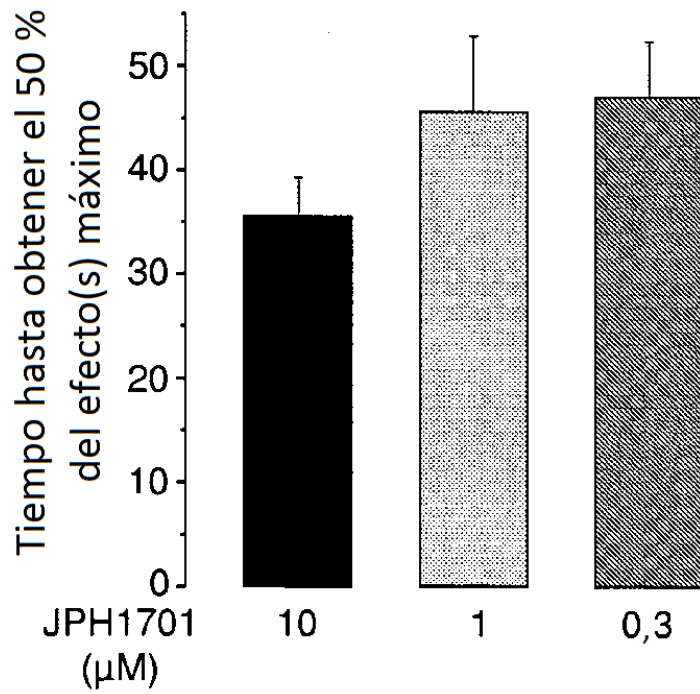


Figura 8B

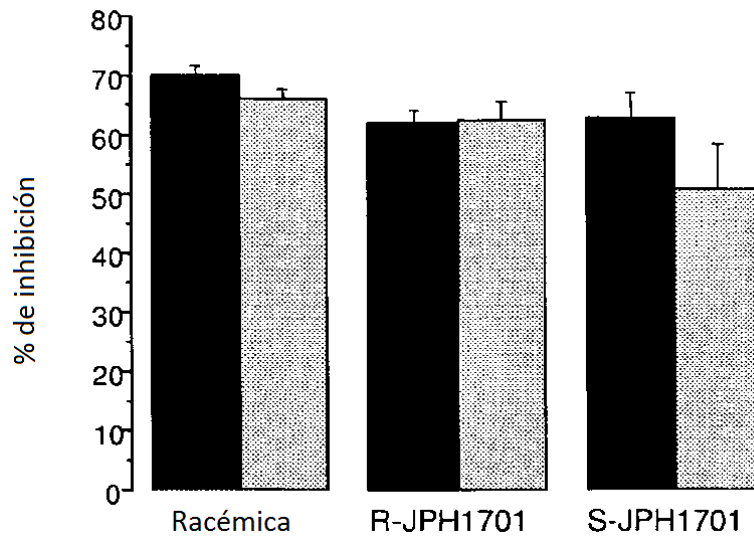


Figura 8C

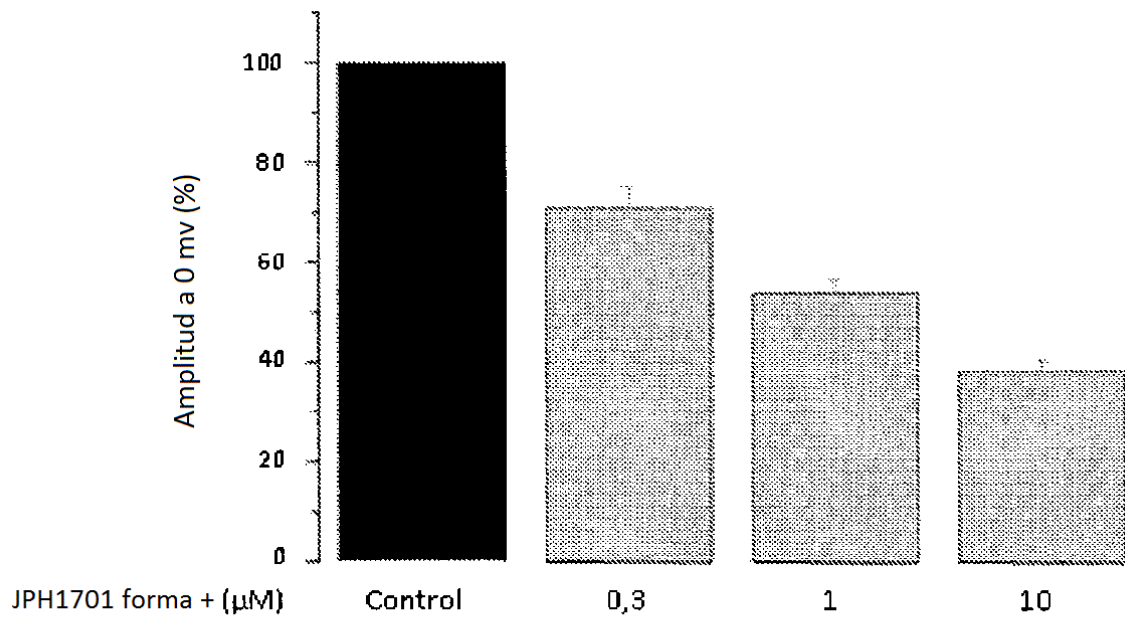


Figura 8D

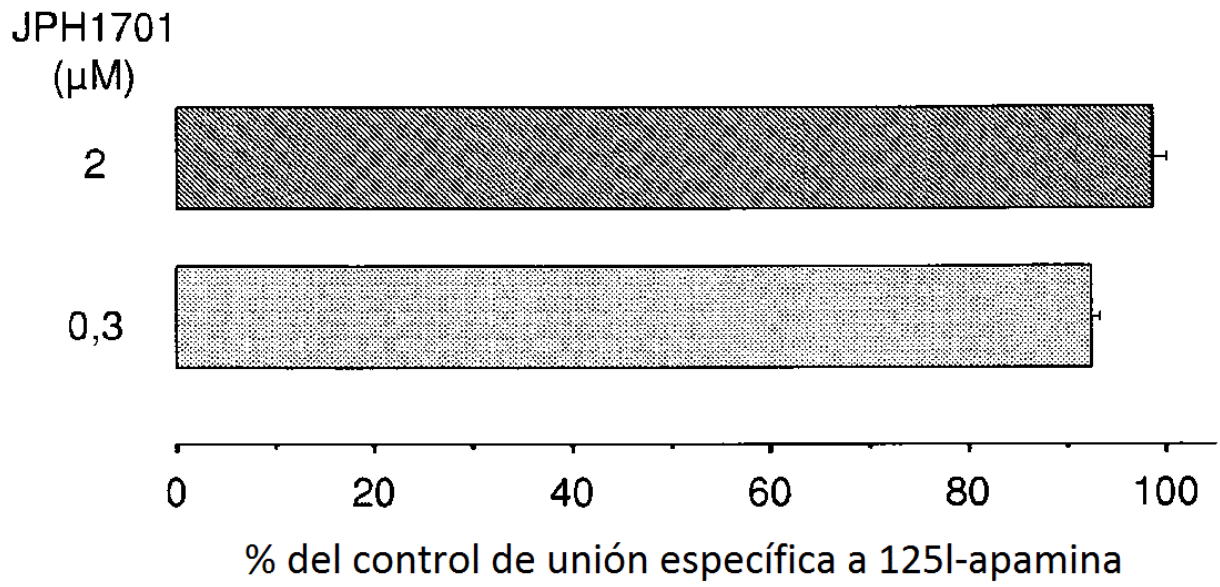


Figura 8E

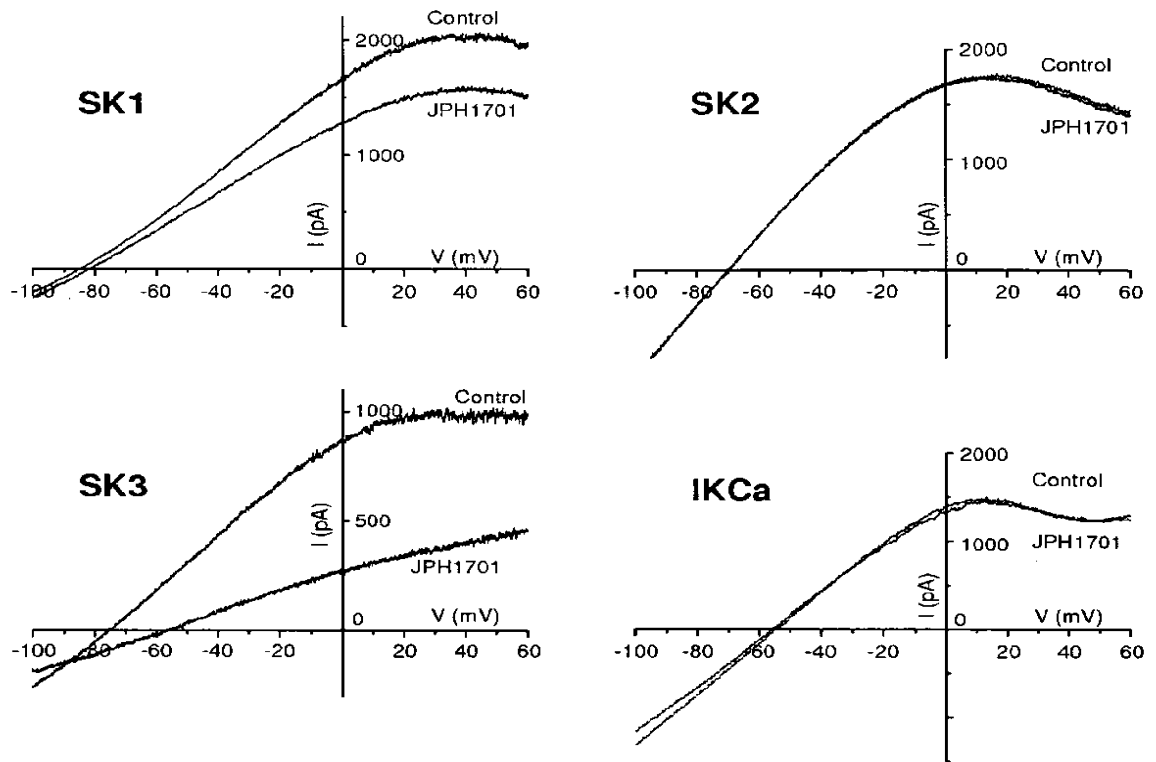


Figura 9A

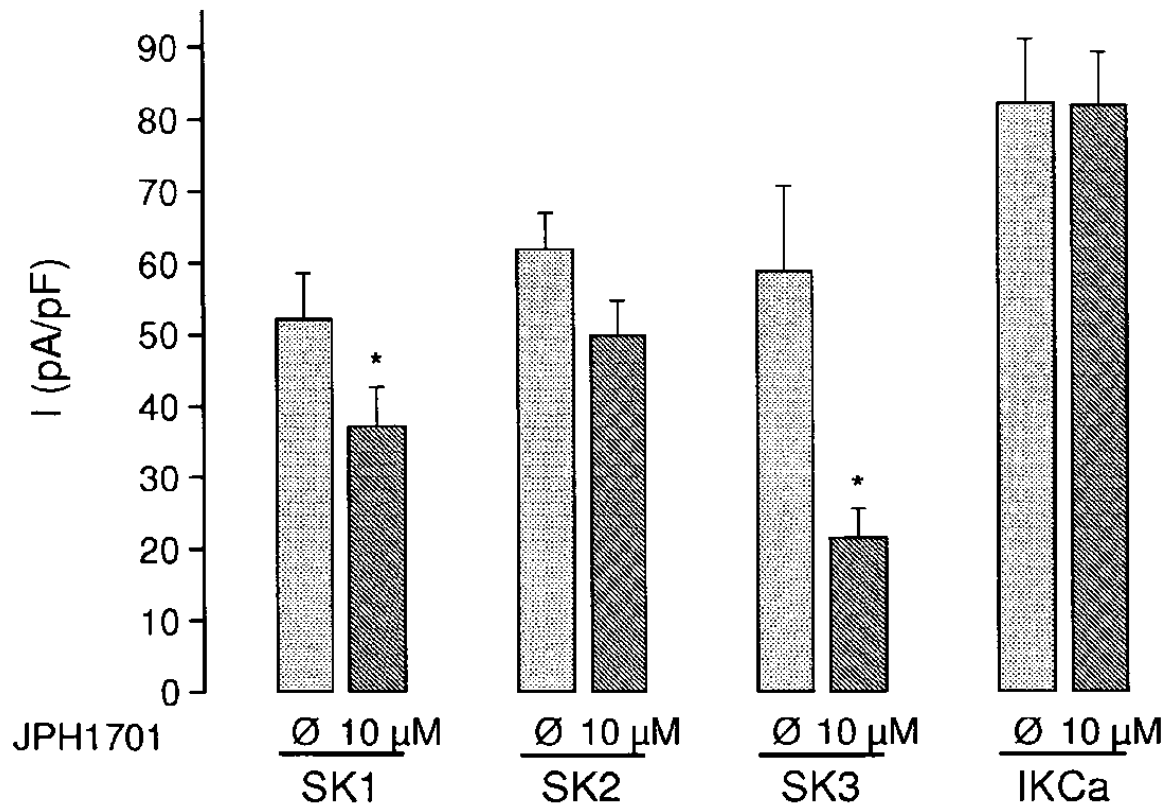


Figura 9B

vehículo

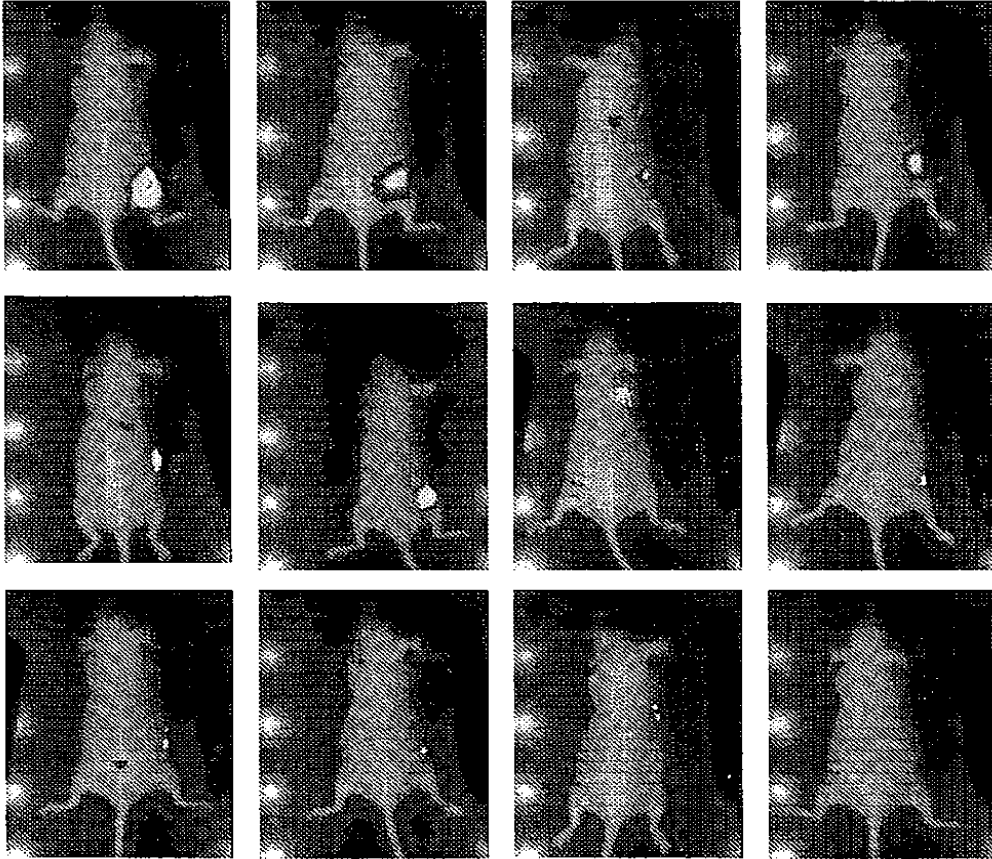


Figura 10A

JPH1701

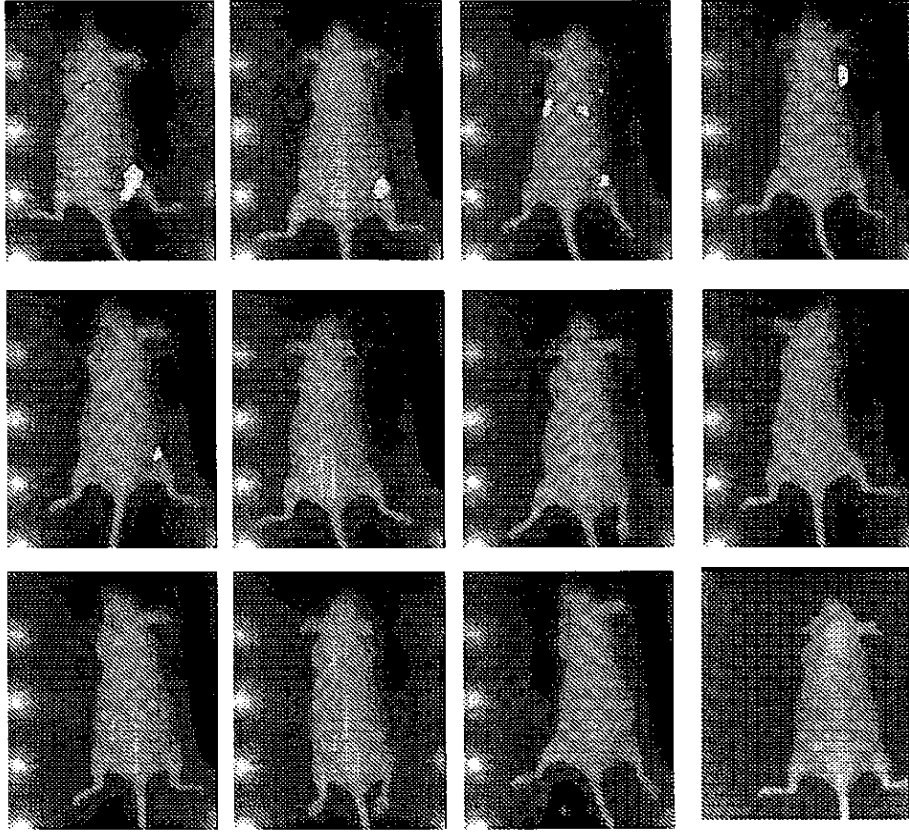


Figura 10B

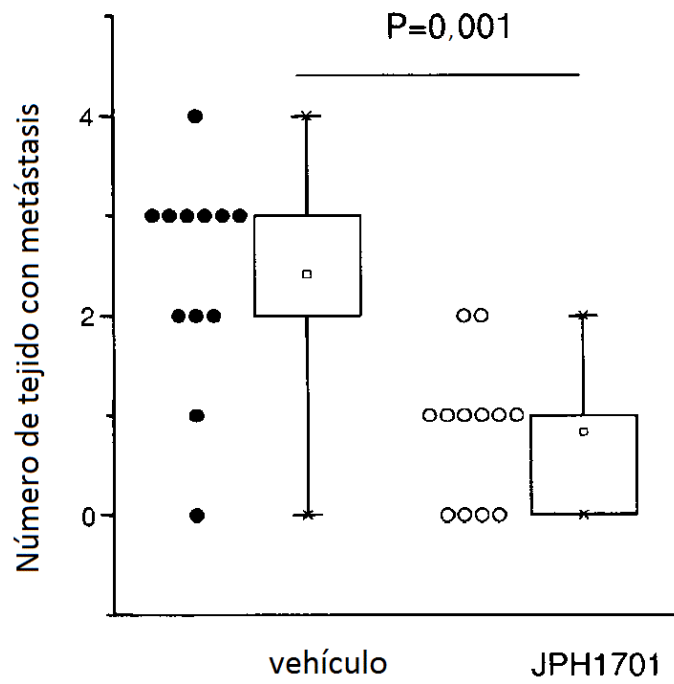


Figura 10C

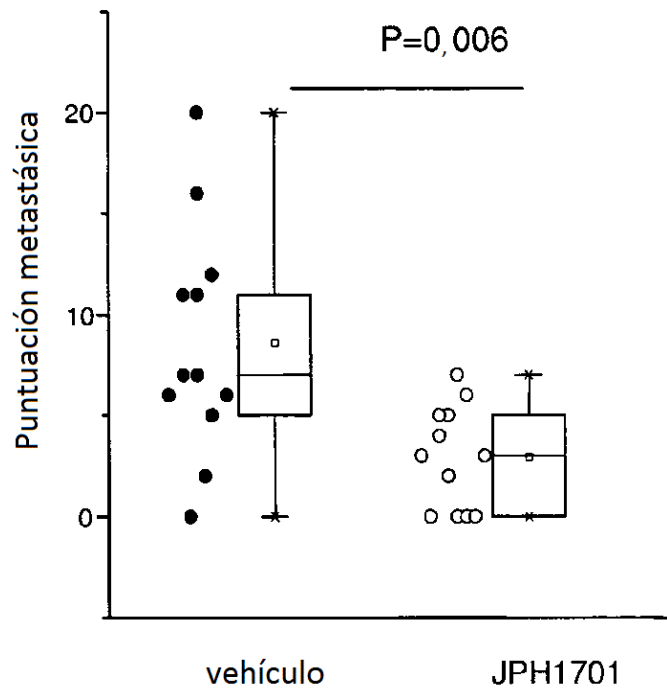


Figura 10D

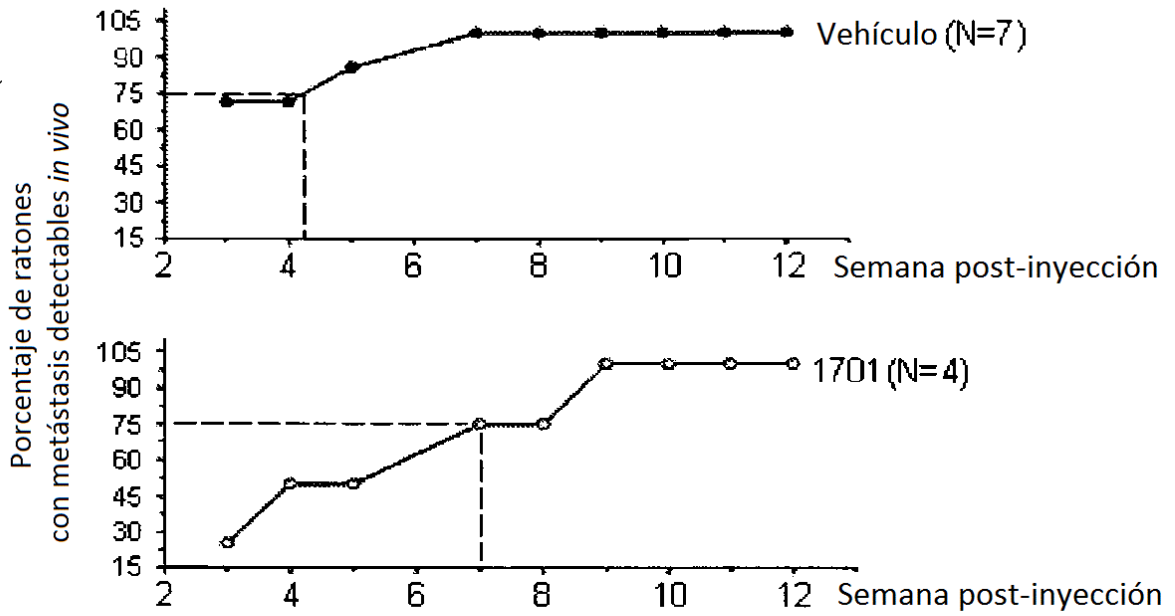


Figura 10E

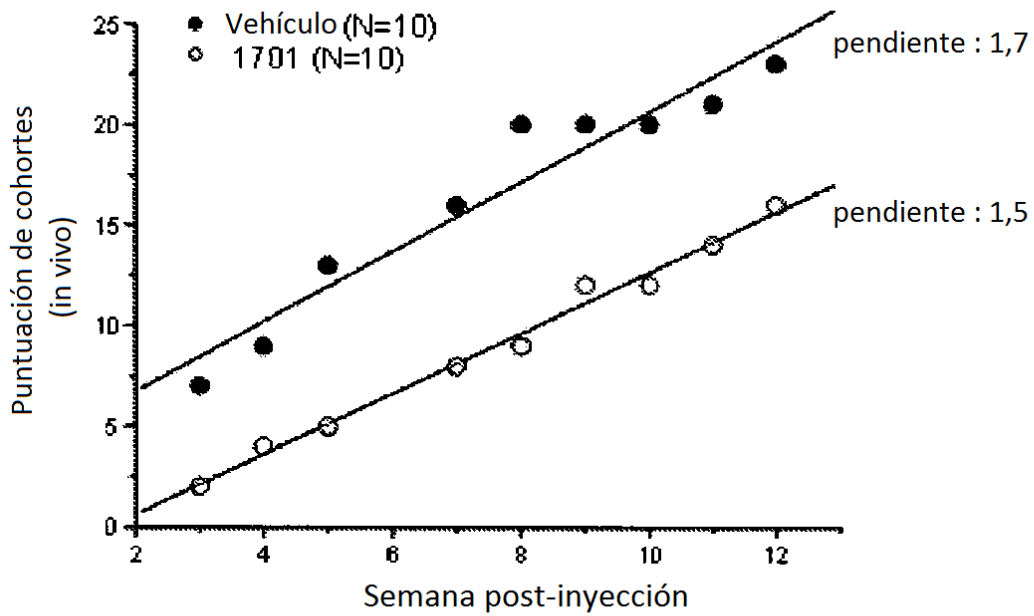


Figura 10F

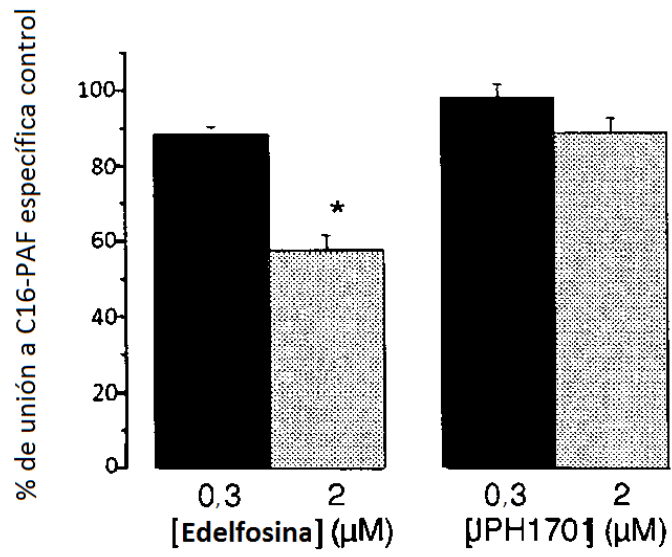


Figura 11A

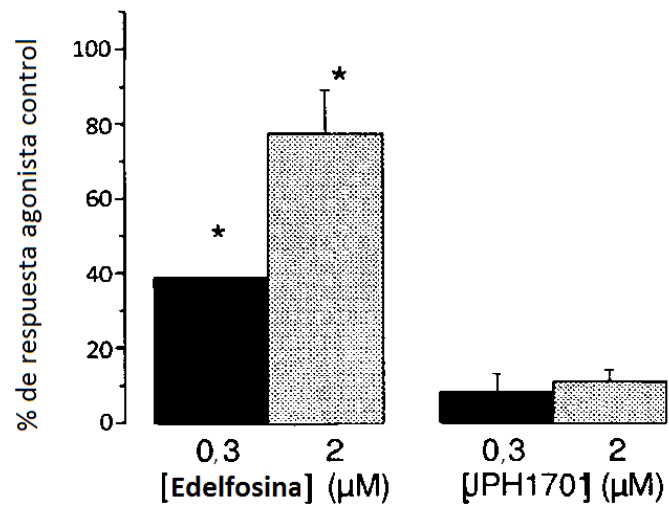


Figura 11B

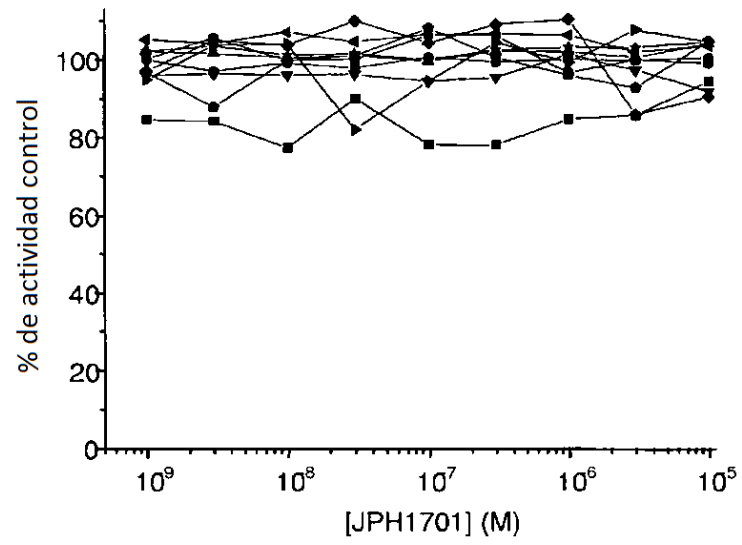


Figura 11C

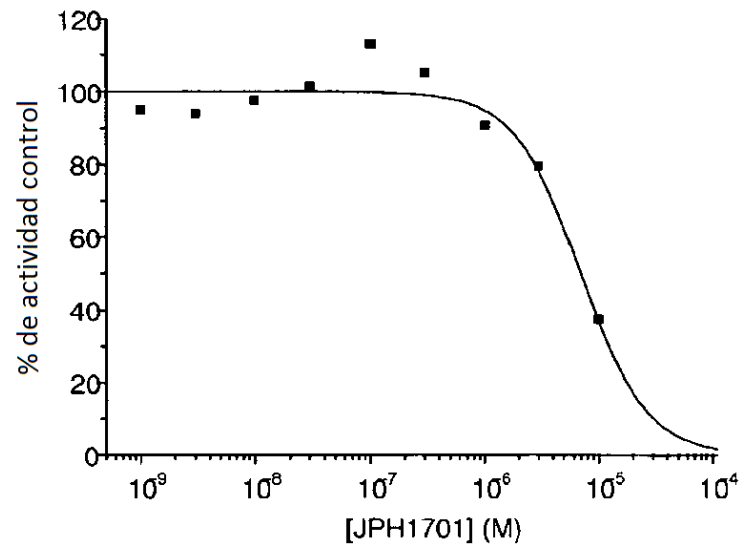


Figura 11D

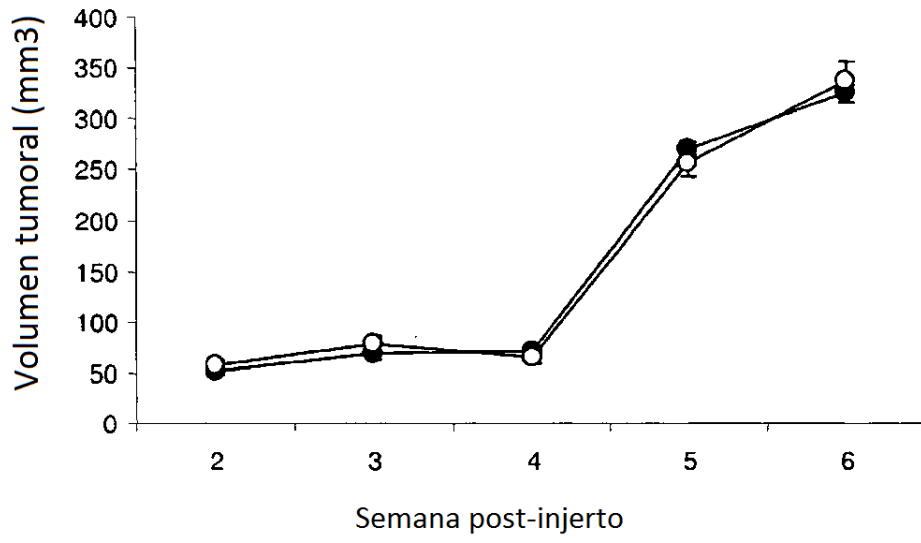


Figura 12A

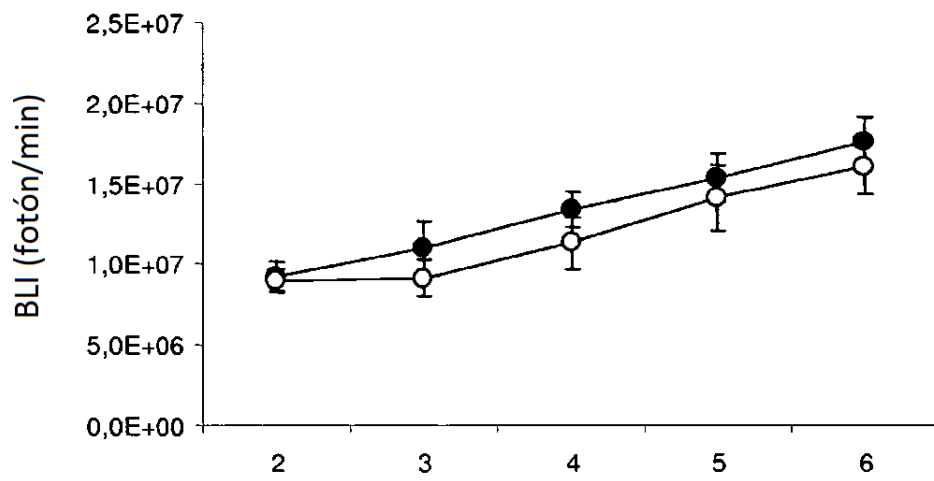


Figura 12B