

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 735**

51 Int. Cl.:

**A61K 51/04** (2006.01)

**A61K 51/08** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.10.2004 E 10154938 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2196222**

54 Título: **Complejos de tricarbonilo de renio que comprenden aminoácidos como ligandos bidentados y su uso como agentes quimioterápicos radioterápicos**

30 Prioridad:

**20.10.2003 EP 03078086**

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

**07.10.2014**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
WINTERHURERSTRASSE 190  
8057 ZÜRICH, CH**

72 Inventor/es:

**ALBERTO, ROGER y  
ZOBİ, FABIO**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 503 735 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

Complejos de tricarbonilo de renio que comprenden aminoácidos como ligandos bidentados y su uso como agentes quimioterápicos

5 La presente invención se refiere a complejos de tricarbonilo de metal y a su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

10 Ahora se acepta en general que la citotoxicidad del principal fármaco anticancerígeno, cisplatino, se debe a la formación de aductos 1,2-intracatenarios entre los átomos N7 de dos residuos de guanina adyacentes en el ADN. Los productos de esta interacción son reticulaciones d(GpG) y con menos frecuencia d(ApG).

15 No sólo se han observado estos aductos tanto *in vitro* como *in vivo*, sino que compuestos clínicamente inactivos no logran formar tales reticulaciones.

20 Estudios iniciales de la relación estructura-actividad indicaron que para cualquier análogo de cis-PtA<sub>2</sub>X<sub>2</sub> de cisplatino (A<sub>2</sub> es dos aminas o un ligando amina bidentado y X es un grupo saliente aniónico) el ligando amina portadora tenía que tener al menos: un protón para que el fármaco retenga su actividad anticancerígena. Esta observación, junto con la comprensión de que d(GpG) puede adoptar diferentes conformaciones alrededor del núcleo metálico, condujo a la hipótesis de que interacciones de puentes de hidrógeno entre ligandos G unidos y la amina portadora del fármaco eran importantes para la estabilización de la distorsión de ADN inducida por la lesión intracatenaria. También se demostró que la formación de puentes de H de guanina 06 con hidrógeno del ligando amina portadora no es importante para que las bases adopten una orientación particular alrededor del centro metálico y se planteó la hipótesis de que el tamaño pequeño del grupo NH, en vez de su capacidad para formar de puentes de hidrógeno, es importante para la actividad anticancerígena del fármaco.

30 Una de las principales desventajas del cisplatino son sus efectos secundarios tóxicos graves debido a la no especificidad del fármaco y las cantidades relativamente grandes que deben administrarse. El fármaco no es específico en su interacción con el ADN y puede platinarse prácticamente cualquier base. Además, muchos tumores malignos desarrollan resistencia al fármaco. Además, la esfera de coordinación del ion metálico no puede derivatizarse con agentes de direccionamiento ya que las moléculas así obtenidas pierden su actividad. Por tanto, sigue existiendo mucho interés en la síntesis de complejos de metales que puedan unirse a bases de ADN de un modo similar al cisplatino pero que no presenten las desventajas indicadas anteriormente.

35 La terapia contra el cáncer futura consistirá, entre otras cosas, en una combinación de varios fármacos o varios efectos que se complementan entre sí. Los inventores contemplaron que tal combinación también puede consistir en radioterapia y quimioterapia y puede traer ventajas terapéuticas importantes para curar el cáncer. Tales estrategias terapéuticas serán particularmente versátiles si la radio y quimiotoxicidad se basa en un sólo compuesto. Por tanto, los inventores consideraron que es deseable emplear compuestos que puedan funcionar de manera mecánica como derivados de cisplatino, provocando enlaces intracatenarios de ADN mediante coordinación del centro metálico a dos bases de purina, en combinación con una radiactividad inherente del centro metálico. Tal clase de compuestos actuaría para inhibir la transcripción de ADN suministrando al mismo tiempo una dosis de radiación altamente localizada en los tejidos tumorales diana. Las moléculas también pueden localizarse de manera precisa en el cuerpo mediante técnicas de obtención de imágenes bien establecidas, permitiendo una cuantificación exacta de las cantidades de agente en los tejidos diana.

Zhang *et al* dan a conocer complejos de tricarbonil-renio de aminas derivatizadas con fosfina para su uso como agentes citotóxicos (J. organometallic Chem., 2002 vol. 650, n.º 1-2, págs. 123-132).

50 Basándose en estas consideraciones, el objeto de la presente invención es proporcionar complejos de metales de transición novedosos que combinen ambas propiedades.

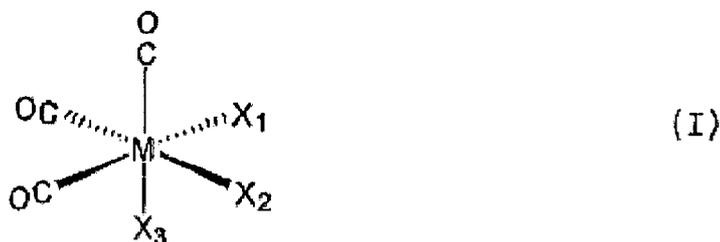
55 Se encontró que el núcleo [M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> (M = Re, Tc) puede unirse a oligonucleótidos que comprenden un motivo GG con buena estabilidad y puede provocar cambios estructurales en el ADN similares a los del cisplatino. Esto fue inesperado dado que el experto en la técnica esperaría que la coordinación de este núcleo a bases de ADN diera como resultado complejos estéricamente demasiado ocupados como para tener buena estabilidad. Se encontró además que el núcleo [M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> rodeado por un conjunto apropiado de ligandos es quimioteráxico y cuando M es un isótopo radiactivo también es radiotóxico.

60 Por tanto, la invención se refiere al uso de compuestos de tricarbonilo de metal [M(CO)<sub>3</sub>L<sub>3</sub>]<sup>+</sup> tal como se define en las reivindicaciones, en los que M es renio y L es un ligando tal como se define, para la preparación de un medicamento quimioteráxico y opcionalmente radioterápico para el tratamiento del cáncer. En el caso de que se use renio no radiactivo el medicamento es quimioteráxico. En el caso de un metal radiactivo el compuesto también es radioterápico.

65 La invención se refiere en particular al uso de compuestos de tricarbonilo de fórmula general [M(CO)<sub>3</sub>L<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, en los que M es un isótopo de renio (en particular Re(I)) y L es un ligando para la preparación de un medicamento para el

tratamiento del cáncer que es tanto quimiotóxico, provocando enlaces intracatenarios en ADN como radiotóxico.

Se da a conocer el uso de los compuestos de tricarbonilo de fórmula general:



5

en la que

M es renio (Re (I)) o un isótopo del mismo; y

10

$X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es un ligando monodentado; o

dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son tales que forman compuestos 4, 6 u 8-13.

15

También se dan a conocer compuestos de fórmulas 4, 6 u 8-13 como tales. Por tanto, la siguiente memoria descriptiva acerca de los compuestos se refiere a los compuestos en sí mismos, así como a los compuestos cuyo uso se reivindica.

20

Los ligandos proporcionan dos características. En primer lugar, mejoran la tasa y estabilidad de unión al ADN. Esto corresponde en particular a los ligandos monodentados. Por tanto, los compuestos descritos pueden tener un ligando monodentado (por ejemplo complejo 16), dos monodentados (por ejemplo complejo 18) o tres monodentados (por ejemplo complejo 2). La presencia de al menos dos ligandos monodentados también sirve para proteger el núcleo  $[M(CO)_3]^+$  frente a la interacción con proteínas séricas. Por tanto, tales compuestos son profármacos. En el espacio intracelular, estos ligandos se liberan y se forma el fármaco. Un ligando bidentado sirve exclusivamente de protección. Los complejos como 6, 10-13 son profármacos. Los ligandos bidentados se liberan y el compuesto se vuelve activo en la reticulación del ADN. Compuestos que comprenden exclusivamente ligandos mono o bidentados no son específicos (como lo es el cisplatino) pero la unión de una biomolécula de direccionamiento a cualquiera de los dos los hace específicos de diana.

30

Los ligandos monodentados pueden ser iguales o diferentes y pueden seleccionarse del grupo que consiste en halógenos, CO, heterociclos aromáticos, tioéteres, isocianuros. Heterociclos aromáticos son anillos aromáticos de cinco o seis miembros en los que uno o más de los miembros del anillo es un elemento distinto de C, por ejemplo N, S, O, P y combinaciones mutuas de los mismos.

35

Dentro de este grupo los halógenos se seleccionan del grupo que consiste en bromo, yodo, flúor, cloro. Se seleccionan ejemplos de heterociclos aromáticos adecuados del grupo que consiste en piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, tiazol, oxazol y moléculas orgánicas que tienen uno de este grupo como parte integral. Se seleccionan ejemplos adecuados de tioéteres del grupo que consiste en dialquil-tioéteres sustituidos lineales o tioéteres cíclicos tales como tetrahidrotiofeno y otras moléculas orgánicas que contienen una funcionalidad tioéter como parte integral de éstas, y se seleccionan ejemplos de isocianuros adecuados de moléculas orgánicas que comprenden un grupo -NC terminal acoplado a una cadena de alquilo que comprende opcionalmente una funcionalidad terminal tal como un grupo -COOH, -NH<sub>2</sub>, -X, -SH, -OH. Cada uno de los halógenos puede combinarse con los mismos uno o dos halógenos o con cada uno de los heterociclos aromáticos y/o con cada uno de los tioéteres y/o cada uno de los isocianuros.

45

Cada uno de los ligandos monodentados puede ser parte de una molécula mayor. Por ejemplo, el imidazol puede ser la cadena lateral de una histidina en un péptido. El péptido a su vez puede ser un péptido de direccionamiento.

50

Los compuestos dados a conocer comprenden un ligando bidentado que puede seleccionarse de aminoácidos y dicarboxilatos.

55

En una realización particular el ligando bidentado es un aminoácido aniónico. La ventaja del mismo es que los aminoácidos se escinden del centro de Re(I) a pH inferior tal como se encuentra por ejemplo en células cancerosas y lisosomas, liberando por tanto la parte activa del complejo como fármaco. Adecuadamente, el aminoácido es un  $\alpha$ -o  $\beta$ -aminoácido no natural. En una realización particularmente útil el aminoácido no natural es N,N-dimetilglicina. Sin desear restringirse por la teoría, se cree que ya que los dos grupos metilo son estéricamente exigentes y el ligando está unido de manera más débil a Re(I) que la glicina no metilada, esto conlleva una liberación más fácil a pH inferior.

En una realización específica un compuesto dado a conocer es un complejo seleccionado de complejos 6, 10, 11, 12 y 13 tal como se representa en la figura 16.

5 Se considera que compuestos de fórmula general I anterior tienen la actividad quimiotóxica requerida si cumplen con los siguientes criterios. Si al menos dos de los ligandos en un compuesto tal como se muestra en la fórmula I se han intercambiado por guanina o guanosina tras 3 días a 3,7°C, estando guanina o guanosina presente en un ligero exceso con respecto a renio, se considera que el complejo de partida tiene la utilidad reivindicada para el tratamiento del cáncer.

10 Los compuestos dados a conocer pueden derivatizarse en el sentido de que  $X_1$  y/o  $X_2$  y/o  $X_3$  se acoplan a un resto de direccionamiento. En la técnica se conocen restos de direccionamiento y el experto puede seleccionar muy bien un resto de direccionamiento que cumpla con sus necesidades. Ejemplos adecuados de restos de direccionamiento son bombesina, neurotensina, somatostatina, glucosamina, nucleósidos, péptidos de secuencia de localización nuclear (péptidos de NLS), oligonucleótidos, moléculas de direccionamiento al núcleo tales como antraciclina, acridinas y otros intercaladores.

15 Los compuestos descritos en el presente documento y usados según la invención se basan en complejos octaédricos mononucleares de iones metálicos que combinan la radiactividad inherente del centro metálico con las propiedades mecánicas del cisplatino. Esto es inesperado ya que en general se cree que complejos octaédricos están estéricamente demasiado ocupados como para interactuar con ADN de una manera comparable. A pesar de eso, los presentes inventores han demostrado que dos purinas de núcleo se unen al centro de Re(I) en disposición cis y lo hacen a una tasa comparable a la de compuestos de platino conduciendo a una actividad quimiotóxica comparable a la del cisplatino.

20 Estructuras de rayos X (véase el ejemplo 4) de complejos de tecnecio y renio unidos específicamente a dos guaninas mediante los átomos N7 junto con datos cinéticos y termodinámicos de la interacción de  $[M(CO)_3(H_2O)_3]^+$  (en el que  $M = Re, Tc$  e isótopos de los mismos) con G y 2dG demuestran experimentalmente las propiedades estructurales pretendidas. De manera correspondiente, la comparación de estos datos con los de  $[Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+}$ , muestra que 1 y 2 son agentes quimiotóxicos potenciales que afectan el ADN como el cisplatino. El modo de acción radiotóxico de Re-186/188 está bien establecido. Como en el caso del Pt, dos ligandos guanina pueden adoptar varias conformaciones en un complejo octaédrico  $[(CO)_3Re(I)(purina)_2X]$  ( $X = H_2O, Br$ ).

25 Los presentes inventores también muestran que complejos de renio con al menos dos sitios de coordinación disponibles influyen en la estructura terciaria del ADN de  $\Phi X174$  alterando la movilidad electroforética de la forma circular abierta y la superenrollada de ADN de plásmido. El resto  $[Re(I)(CO)_3]^+$  presenta un patrón de reactividad con ADN de plásmido principalmente similar, por ejemplo, al del cisplatino. Se une selectivamente a dos guaninas libres, implicando también una posible interacción con guaninas adyacentes en ADN. Los cambios inducidos implican unión covalente a dos bases en vez de interacción electrostática simple.

30 Además, ahora se mostró que a una concentración de 200  $\mu M$  los complejos de renio pueden inhibir la proliferación de determinados tipos de líneas de células cancerosas humanas. Las mejoras de los compuestos mencionados anteriormente con respecto al estado de la técnica actual son las siguientes. Los complejos de  $^{186}Re(I)$  o  $^{188}Re(I)$  octaédricos mononucleares pueden combinar la radiactividad del centro metálico con la capacidad de formación de enlaces intra o intercatenarios en ADN. Tal clase de compuestos puede inhibir la transcripción de ADN suministrando al mismo tiempo una dosis de radiación altamente localizada en los tejidos tumorales diana. Por tanto, este tipo de complejo puede actuar como productos radiofarmacéuticos quimiotóxicos adecuados para la terapia contra el cáncer.

35 Los compuestos de la invención pueden combinarse fácilmente con vectores (es decir polipéptidos) que permiten el direccionamiento, la captación activa y la degradación en el citoplasma. Una biomolécula de direccionamiento puede unirse a  $X_1$  o  $X_2$  o  $X_3$ , o  $X_2/X_3$  puede ser parte de una estructura mayor, por ejemplo la cadena lateral de imidazol de histidina en un péptido o un motivo GG en un oligonucleótido. En el último caso, el motivo GG protege el núcleo activo de Re(I) pero se libera tras la degradación del oligonucleótido en el citoplasma.

40 Además, pueden añadirse sustancias no radiactivas con una estructura idéntica a las radiactivas (adición de indicador) para mejorar la eficacia terapéutica mientras que los compuestos radiactivos análogos permiten monitorizar la biodistribución. Esto no es posible con ningún agente actual quimiotóxico orgánico o basado en metal en uso clínico.

45 Dado que se conoce bien que combinando radioterapia y quimioterapia pueden obtenerse ventajas terapéuticas importantes para curar el cáncer, las moléculas mencionadas anteriormente son el primer ejemplo de una especie molecular que comprende ambas propiedades (es decir radiactividad y quimiotoxicidad) en una molécula.

50 Al contrario que la mayoría de otras estrategias que dan como resultado el diseño de compuestos basados en Re (I) exclusivamente adecuados para fines radioterápicos en los que se impide que el núcleo metálico interactúe adicionalmente en el sitio diana, los compuestos de la invención pueden, tras la administración, participar

activamente en la bioquímica en el sitio tumoral diana deseado.

La invención permite además el descubrimiento de fármacos sistemático. Variando los sustituyentes  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  en posiciones diferentes pueden obtenerse diversos tipos de compuestos sin una carga excesiva. Como consecuencia, las moléculas pueden ajustarse con precisión hacia su interacción con bases de ADN. Naturalmente, la prueba decisiva es si tales compuestos cumplen con los criterios de actividad.

También se describen profármacos. En tales compuestos los ligandos se liberan del profármaco para generar la forma activa del fármaco por ejemplo cuando el pH disminuye como en las células cancerosas. Ejemplos adecuados de profármacos son compuestos de fórmula I en los que al menos dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son un ligando monodentado o parte de un ligando bidentado tal como se definió anteriormente. Además, el profármaco puede acoplarse a agentes de direccionamiento o sustancias metabólicamente activas que pueden aumentar el índice terapéutico. Los ligandos en los profármacos pueden proteger el núcleo  $[M(CO)_3]^+$  y pueden disociarse y liberar la "forma activa" del fármaco en células cancerosas.

En el caso de profármacos, en los compuestos de fórmula I  $X_1$  representa, por ejemplo, un ligando monodentado mientras que  $X_2$  y  $X_3$  son ligandos monodentados o forman juntos un quelante bidentado. Las definiciones de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son tal como se describieron anteriormente.  $X_2X_3$  representa el/los ligando(s) de grupo protector que forma(n) el profármaco que se libera(n) en la célula para formar el fármaco.  $X_1$  influye en la eficacia de unión a ADN y la liberación del profármaco.

Los diferentes aspectos de la descripción se explican en la figura 1. En esta figura el compuesto I reacciona con G o ADN aislado para formar reticulaciones intra o intercatenarias (ejemplos 4, 5 y 7), el compuesto II reacciona con G o ADN para formar reticulaciones intra o intercatenarias (ejemplo 3 y 13). Los compuestos I y II se consideran fármacos ya que también se conjugan con proteínas séricas y por tanto pueden no captarse inmediatamente por la célula, por tanto, son inactivos, el compuesto III es un producto intermedio. Puede reaccionar directamente con el ADN (fármaco) tras captarse en la célula. Ya que no interacciona fuertemente con proteínas séricas, puede considerarse un profármaco (ejemplo 13, complejo 8) o puede perder un ligando, convertirse en el compuesto II y actuar como fármaco. Los profármacos reales son IV y V. Ninguno de los dos reacciona con proteínas séricas (por tanto son profármacos) pero en principio pueden reaccionar directamente con el ADN. Más probablemente, y mostrado en el ejemplo 8, se produce la pérdida de ligandos  $X_2$  y  $X_3$  para formar el compuesto II que luego es el fármaco. Las rutas 1-5 son fármacos, las rutas 6-8 son profármacos.

En esta solicitud las palabras "quimiotóxico" y "citotóxico" se usan de manera intercambiable. Un compuesto es por ejemplo quimiotóxico en sí mismo pero tiene un efecto citotóxico sobre una célula. Por tanto, las pruebas de citotoxicidad se refieren al efecto que tendrá un compuesto sobre una célula, mientras que la quimiotoxicidad es una característica inherente de un compuesto. Además, las palabras "compuesto" y "complejo" se usan de manera intercambiable.

La presente invención se aclarará adicionalmente en los siguientes ejemplos. Se hace referencia a las siguientes figuras:

La figura 1 muestra un esquema general para los compuestos y las rutas de reacción de los compuestos reivindicados.

La figura 2 muestra la prueba de actividad para los compuestos 16, 16a y 3.

La figura 3 muestra el cromatograma de HPLC-EM del ejemplo 3.

La figura 4 muestra las estructuras cristalinas de rayos X de  $[Re(9-MeG)_2(H_2O)(CO)_3](ClO_4)$  y de  $[^{99}Tc(9-MeG)_2(CH_3OH)(CO)_3](ClO_4)$ .

La figura 5A muestra la región aromática (7,0-9,0 ppm) al final de la reacción de 1 con d(CpGpG).

La figura 5B muestra el estudio de dependencia del pH confirmando que el aducto bis $[Re(CO)_3d(CpGpG)(H_2O)]$  se une a átomos N7 de residuos de guanina.

La figura 6A muestra la acción de cisplatino sobre ADN de plásmido de  $\Phi X174$ . Las bandas 4-8 muestran la cantidad aumentada de reordenamiento como consecuencia de la unión a cis-GG de cisplatino.

La figura 6B muestra la interacción del complejo 1 sobre ADN de plásmido de  $\Phi X174$  en condiciones tal como se describieron anteriormente. El resultado es similar al observado con cisplatino en la figura 6A.

La figura 6C muestra la interacción del complejo catiónico 2 con ADN de plásmido de  $\Phi X174$ . No se observa reordenamiento de ADN.

En la figura 7, las bandas 2-7 muestran que los complejos con dos ligandos lábiles en cis inducen reordenamiento en ADN de plásmido de  $\Phi$ X174, mientras que en las bandas 8-14 no se observa ningún cambio estructural.

5 La figura 8A muestra la interacción de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 con complejos 1 y 6. Obviamente, el complejo 6 provoca reordenamiento de ADN, lo que es indicativo de reticulaciones de GG, comparable a cisplatino.

La figura 8B muestra la estructura del profármaco 6 y el fármaco resultante 1 y la estructura de rayos X del profármaco.

10 La figura 8C muestra la conversión esquematizada del profármaco 6 para dar el fármaco activo.

La figura 9A muestra la incubación de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 con complejos 1 y 7 según el procedimiento descrito en el ejemplo 6.

15 La figura 9B muestra las mismas muestras tras la incubación con histidina para liberar los complejos metálicos y para reconstituir la forma original de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174.

La figura 10 muestra un ensayo típico de proliferación celular con XTT para la determinación de la citotoxicidad de los complejos de renio tal como se usa en los ejemplos 10-13.

20 La figura 11 es una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer de mama MDA-MB-4355 (ATCC n.º TB129).

25 La figura 12 es una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer de ovario OVMZ-6-WT (que pueden obtenerse de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien DSMZ GmbH).

30 La figura 13 es una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer gástrico HSC45-M2 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien DSMZ GmbH).

35 La figura 14A es una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1 a 13 frente a células de melanoma de ratón B16F1 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelllinien DSMZ GmbH).

La figura 14B es una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 2 y 14 a 21 frente a células de melanoma de ratón B16F1 (ATCC) en comparación con cisplatino.

40 La figura 15 muestra el acoplamiento del resto de direccionamiento acridina a N-etilamino-imidazol.

La figura 16 es un resumen de los compuestos 1 a 21.

## Ejemplos

45 Ejemplo 1 (comparativo)

### Síntesis de compuestos con un ligando monodentado

#### 1. Método general

50 Los compuestos de la invención con ligandos monodentados pueden sintetizarse generalmente añadiendo un equivalente del ligando a una disolución de 1.

#### 2. Ejemplo específico ( $[\text{Et}_4\text{N}][\text{ReBr}_2(\text{Im})(\text{CO})_3]$ (16))

55 Como ejemplo, a continuación se facilita el procedimiento de síntesis para 16: Se disolvió  $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  (1,96 mg, 0,12 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 ml). Se añadió imidazol (Im, 8 mg, 0,12 mmol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente. Tras 30 min apareció un sólido blanco. Se filtró y se secó a vacío. Rendimiento: 45 mg, 60%.

60 Análisis elemental calculado para 16,  $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3\text{Br}_2\text{Re}$  (628,38): C, 26,75; H, 3,82; N, 6,68, hallado: C, 26,83; H, 3,71; N, 6,62.

#### Ejemplo 2

65 Síntesis de compuestos de la invención con un ligando bidentado

## 1. Método general

Los compuestos de la invención con ligandos bidentados pueden sintetizarse generalmente añadiendo uno o más equivalentes del ligando a una disolución de 1.

2. Ejemplo específico ( $[\text{Re}(\text{L-Ser})_2(\text{CO})_3]$  (10))

Como ejemplo, a continuación se facilita el procedimiento de síntesis para 10: Se disolvió  $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  (100 mg, 0,13 mmol) en una mezcla de metanol/agua (9:1, 5 ml). Se añadió L-serina (48 mg, 0,46 mmol) y se agitó la mezcla durante 3 h a 50°C a una presión de  $\text{N}_2$  ligera. Se monitorizó la reacción mediante HPLC y se detuvo cuando no se pudo observar ningún cambio adicional (3 h). Se dejó equilibrarse la disolución hasta temperatura ambiente y se purificó mediante HPLC. Se obtuvo un sólido blanco. Rendimiento: 23 mg, 37%. Se obtuvieron cristales adecuados para el análisis de rayos X mediante evaporación lenta de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Análisis elemental calculado para 10,  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{Re}$  (479,41): C, 22,55; H, 2,73; N, 5,84, hallado: C, 23,17; H, 3,20; N, 5,47.

## Ejemplo 3 (comparativo)

Unión de  $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  a guanina

Se realizó la siguiente prueba con el fin de someter a prueba si un tricarbonilo de metal puede unirse a bases de purina. Una disolución acuosa (o mezcla de  $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ ) 1 mM de compuestos de fórmula general I incubada a 37°C durante 3 días con un exceso de 6 veces de guanina muestra más del 50% de unión de una o dos guaninas al centro metálico (figura 2).

En agua (37°C), 16 reacciona gradualmente con 9-MeG. En el gradiente de HPLC, el complejo 16 tiene un tiempo de retención (tr) de 13,9 min. Tras 1 h se observa un segundo pico con tr de 17,4 min. La cromatografía HPLC-EM indica que esta especie es  $[\text{Re}(\text{Im})(9\text{-MeG})(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]$  (16a). Tras 12 h adicionales aparece un tercer y un cuarto pico a 17,0 y 16,2 min que se identificaron mediante cromatografía HPLC-EM como  $[\text{Re}(9\text{-MeG})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3]^+$  (3) y  $[\text{Re}(9\text{-MeG})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{CO})_3]^+$  (3a) respectivamente. La altura relativa de los picos, aumentando la concentración de las especies 3 y 3a, dio el único otro cambio observado tras un periodo de 12 h adicionales de incubación (figura 3).

Este ejemplo muestra que guaninas pueden sustituir al imidazol como ligando protector en compuestos de fórmula general I. El compuesto 3 es un modelo para la característica estructural del resto  $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  tras la reticulación de guaninas en ADN.

## Ejemplo 4 (comparativo)

Formación de un aducto de bisguanina de  $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  ( $\text{M} = {}^{99}\text{Tc}$  (I),  $\text{Re}$  (I))  $[\text{Re}(9\text{-MeG})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{CO})_3](\text{ClO}_4)$  (3)

Se disolvió  $(\text{Et}_4\text{N})_2[\text{ReBr}_3(\text{CO})_3]$  (30 mg, 0,04 mmol) en agua caliente (~ 40°C) (3 ml). Se añadió  $\text{AgClO}_4$  (28 mg, 0,14 mmol) y se agitó la mezcla durante 3 h, tiempo tras el cual se retiró por filtración  $\text{AgBr}$ . Se añadió 9-metilguanina (16,5 mg, 0,1 mmol) y se calentó la mezcla hasta 50°C a una presión de  $\text{N}_2$  ligera. La disolución incolora se volvió de color amarillo claro en el plazo de minutos. Se monitorizó la reacción mediante HPLC y se detuvo tras 3,5 h cuando no pudo observarse ningún cambio adicional. Se dejó equilibrarse la disolución hasta temperatura ambiente, se concentró y luego se purificó en una columna C18 corta.

A la fracción de metanol que contenía el complejo purificado se le añadió el 3% de  $\text{H}_2\text{O}$  (v/v). Se dejó difundir el pentano al interior de la disolución depositando cristales de calidad para rayos X. Rendimiento: cuantitativo.

Análisis elemental calculado para 3,  $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{ClN}_{10}\text{O}_{10}\text{Re}$  (718,01): C, 25,09; H, 2,25; N, 19,51, hallado: C, 25,34; H, 2,70; N, 19,45.

En la figura 4 se muestra la estructura cristalina de rayos X.

## Ejemplo 5 (comparativo)

Interacción de  $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$  con oligonucleótidos

La figura 5A muestra el espectro de  ${}^1\text{H}$ -RMN de la reacción de  $[\text{Re}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+(1)$  con 1 eq. de  $d(\text{CpGpG})$  en  $\text{D}_2\text{O}$ . A 37°C la adición de 1 a una disolución de  $d(\text{CpGpG})$  provoca la desaparición en el espectro de las resonancias debidas a las señales de H8 de  $d(\text{CpGpG})$  libre y la aparición de un nuevo conjunto de picos agudos bien separados de los protones H8 no equivalentes.

La figura 5A muestra la región aromática (7,0-9,0 ppm) al final de la reacción de 1 con  $d(\text{CpGpG})$  (incubación

durante 1 h).

Las dos bases de guanina se unen al Re(I) a través de N7, un hecho corroborado mediante la independencia del pH de las resonancias de H8 a valores de pH cercanos a 2 (figura 5B). De hecho no se afecta ningún desplazamiento químico de H8 disminuyendo el pH por debajo de 4, al contrario de lo que se espera para un N7 de guanina libre.

Ejemplo 6 (comparativo)

#### Interacción de complejos 1 y 2 con ADN de plásmido de $\Phi$ X174

Se adquirieron plásmidos de  $\Phi$ X174 de Promega y se usaron sin purificación adicional. Se mezcló ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 RP (0,1 mg) con los complejos de renio correspondientes en H<sub>2</sub>O a [complejo]/[pb] 0,018-1,8/1. Se incubaron las mezclas en agua a 37°C durante 22 h en la oscuridad antes de analizarlas mediante electroforesis en gel. El pH de las mezclas permaneció constante a  $\approx$  7 en todos los casos. Experimentos realizados en NaClO<sub>4</sub> 1 mM o 10 mM no mostraron ninguna diferencia significativa en la unión de 1 a ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 RF.

Se examinó la unión a ADN mediante ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética en gel a través de geles de losa de agarosa al 0,75% de 9 cm con tampón de ejecución de TAE. Se ejecutaron los geles a TA, con voltajes variables de entre 50 y 75 V. El tiempo de ejecución dependió del voltaje y habitualmente fue de entre 1,5-2 h. Se tiñeron los geles resultantes con bromuro de etidio en el tampón a una concentración de  $\approx$  0,3  $\mu$ g/ml. Se visualizaron bandas mediante software de transiluminación UV equipado con una cámara digital.

La figura 6A muestra la acción de cisplatino sobre ADN de plásmido de  $\Phi$ X174. Las bandas 4-8 muestran la cantidad aumentada de reordenamiento como consecuencia de la unión a cis-GG de cisplatino.

La figura 6B muestra la interacción del complejo 1 sobre ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 en condiciones tal como se describieron anteriormente. El resultado es similar al observado con cisplatino en la figura 6A.

La figura 6C muestra la interacción del complejo catiónico 2 con ADN de plásmido de  $\Phi$ X174. No se observa reordenamiento de ADN.

Se desprende que  $[M(CO)_3]^+$  interacciona con ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 de un modo similar a cisplatino. También se muestra que la interacción no se debe a efectos electrostáticos.

Ejemplo 7

#### Se requieren dos ligandos lábiles en cis para inducir cambios estructurales de ADN de plásmido de $\Phi$ X174

En este ejemplo, se ha incubado ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 con diferentes complejos que contenían ligandos mono o bidentados. Los complejos 1 y 3 comprenden ligandos lábiles en cis mientras que los complejos 4 y 5 son estables frente a la sustitución con dos G.

En la figura 7, las bandas 2-7 muestran que los complejos con dos ligandos lábiles en cis inducen reordenamiento en ADN de plásmido de  $\Phi$ X174, mientras que en las bandas 8-14 no se observa ningún cambio estructural. Si los dos ligandos lábiles en cis sólo se liberan lentamente, entonces el complejo precursor puede considerarse un profármaco. En el ejemplo 8 se describe este comportamiento.

Ejemplo 8

#### Preparación de un profármaco

Un profármaco que contiene el complejo 1 como fármaco eficaz contiene dos ligandos lábiles en disposición cis que se liberan lentamente del centro de Re(I). Tras la escisión de los ligandos lábiles se forma un complejo de la composición  $[M(X_1)(OH)_2(CO)_3]$  que representa el fármaco activo. En este caso se describe la síntesis de tal profármaco que contiene N,N-dimetil-glicina como ligando lábil en cis.

Se disolvió complejo 1  $(Et_4N)_2[ReBr_3(CO)_3]$  (100 mg, 0,13 mmol) en una mezcla de metanol/agua (4:1, 10 ml). Se añadió N,N-dimetil-glicina (70 mg, 0,7 mmol) y se agitó la mezcla durante 12 h a 50°C a una presión de N<sub>2</sub> ligera. Se dejó equilibrar la disolución hasta temperatura ambiente, se concentró y se purificó en un filtro C18 corto. Se obtuvo un sólido cristalino blanco. Rendimiento: 20 mg, 40%.

Se obtuvieron cristales adecuados para difracción de rayos X mediante difusión lenta de éter en una disolución en CH<sub>3</sub>CN del complejo. Análisis elemental calculado para 6, C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>15</sub>Re<sub>3</sub> (1117,05): C, 22,58; H, 2,17; N, 3,76, hallado: C, 23,19; H, 2,78; N, 3,84. <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, d/ppm): 4,18 (s, 2H), 3,46 (s, 3H), 3,15 (s, 3H).

FT-IR para 6 (KBr,  $-v/cm^{-1}$ ): (C = O) 2022 (s), (C = O) 1911 (b), (C = O) 1890 (s), (C = O) 1866 (s). ESI-EM para 6 (ESI+, 40 V, m/z): 1117,0 ([M]<sup>+</sup>). Tr. de HPLC para 6 (HPLC, gradiente 1, min): 15,7.

5 La figura 8A muestra la interacción de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 con complejos 1 y 6. Obviamente, el complejo 6 provoca reordenamiento de ADN lo que es indicativo de reticulaciones de GG, comparable a cisplatino.

La figura 8B muestra la estructura del profármaco 6 y el fármaco resultante 1 y la estructura de rayos X del profármaco.

10 Se ha estudiado la interacción del complejo 6 con guanina según la prueba explicada resumidamente en el ejemplo 4. Experimentos de RMN y HPLC muestran claramente que el ligando bidentado N,N-dimetil-glicina se escinde y se reemplaza por dos guaninas, lo mismo que sucede en ADN de plásmido de  $\Phi$ X174. La figura 8C muestra la conversión esquematizada del profármaco 6 para dar el fármaco activo.

15 Ejemplo 9 (comparativo)

#### Estabilidad del aducto de ADN de plásmido de $\Phi$ X174 de $[M(CO)_3]^+$

20 Tal como se explicó resumidamente en el ejemplo 6, pueden unirse complejos con ligandos lábiles en cis a ADN de plásmido de  $\Phi$ X174, supuestamente a través de reticulaciones inter o intracatenarias de GG. En el caso de cisplatino que se une a ADN, esta interacción es irreversible. Se han realizado estudios *in vitro* con los complejos 1 y 7 para evaluar esta estabilidad para dos ejemplos de compuestos reivindicados en el presente documento.

25 Se incubaron complejos 1 y 7 con ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 tal como se describió en el ejemplo 6. Posteriormente, se expuso el plásmido a histidina para escindir los complejos de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174. Aunque se empleó un exceso de 100 veces de histidina, no pudo observarse ninguna liberación, es decir no pudieron invertirse los cambios estructurales en el ADN de plásmido de  $\Phi$ X174. En la figura 9A se muestran los perfiles de electroforesis en gel tras 22 h.

30 La figura 9A muestra la incubación de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174 con complejos 1 y 7 según el procedimiento descrito en el ejemplo 6. La figura 9B muestra las mismas muestras tras la incubación con histidina para liberar los complejos metálicos y para reconstituir la forma original de ADN de plásmido de  $\Phi$ X174.

Ejemplo 10

35

#### Procedimiento de citotoxicidad

40 En un experimento típico (véase la figura 10) se hicieron crecer un promedio de 2000 células en placas de microtitulación (calidad para cultivo tisular, 96 pocillos, fondo plano) en un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de cultivo por pocillo en una atmósfera humidificada (37°C, > 6,5% de CO<sub>2</sub>). Tras 24 h se añadió el complejo de renio a los pocillos (concentraciones finales de 200  $\mu$ M basándose en el Re) y se hicieron crecer las células durante 24 h adicionales bajo una atmósfera humidificada. Tras el periodo de incubación se añadieron 50  $\mu$ l de la mezcla de marcaje de XTT a cada pocillo. Se incubaron las placas otra vez durante 4 h. Tras este periodo de incubación final se midió la absorbancia espectrofotométrica (densidad óptica, DO) de cada pocillo a 450 nm.

45

Se realizaron experimentos de control tal como se describió anteriormente sin la adición de los compuestos de renio. Se obtuvieron blancos añadiendo 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O en lugar de la mezcla de marcaje de XTT. Se realizaron experimentos por duplicado y los resultados representan el promedio.

50 Se calculó el % de supervivencia celular basándose en la DO relativa de las muestras. Se fijó la DO de control máxima al 100% de supervivencia celular.

Ejemplo 11

#### Citotoxicidad de complejos de $[Re(I)(CO)_3]^+$ (200 $\mu$ M) frente a la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-4355

60 La figura 11 muestra una representación gráfica de la citotoxicidad (% de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer de mama MDA-MB-4355. Los resultados indican claramente que los compuestos 1, 3 y 4 inhiben la proliferación celular. El complejo 5 es estable en las condiciones indicadas en el ejemplo 3 y no muestra citotoxicidad frente a esta línea celular de cáncer de mama.

Ejemplo 12

#### Citotoxicidad de complejos de $[Re(I)(CO)_3]^+$ (200 $\mu$ M) frente a la línea celular de cáncer de ovario OVMZ-6-WT

65

El procedimiento es tal como se describió en el ejemplo 10 y la figura 10. Sólo varía la línea de células cancerosas.

La figura 12 muestra una representación gráfica de la citotoxicidad (es decir % de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer de ovario OVMZ-6-WT. Los resultados indican claramente que el compuesto 1 inhibe la proliferación celular en esta línea de células cancerosas.

Ejemplo 13

#### Citotoxicidad de complejos de $[\text{Re}(\text{I})(\text{CO})_3]^+$ (200 $\mu\text{M}$ ) frente a la línea celular de cáncer gástrico HSC45-M2

El procedimiento es tal como se describió en el ejemplo 10 y la figura 10. Sólo varía la línea de células cancerosas.

La figura 13 muestra una representación gráfica de la citotoxicidad (es decir % de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 3, 4 y 5 frente a células de cáncer gástrico HSC45-M2. Los resultados indican claramente que el compuesto 5 inhibe la proliferación celular en esta línea de células cancerosas.

Ejemplo 14

#### Citotoxicidad de diferentes complejos de renio frente a células de melanoma de ratón B16F1

El procedimiento es tal como se describió en el ejemplo 10 y la figura 10. Sólo varía la línea de células cancerosas.

La figura 14A muestra una representación gráfica de la citotoxicidad (es decir % de supervivencia celular) presentada por los complejos 1 a 13 frente a células de melanoma de ratón B16F1. Los resultados indican claramente que los compuestos 1 y 2 inhiben fuertemente la proliferación celular. Debido a la escasa solubilidad en agua, la concentración de los compuestos 4, 5, 6 y 11 a 13 es inferior a 200  $\mu\text{M}$ . Por consiguiente los compuestos mencionados anteriormente pueden mostrar citotoxicidad superior a 200  $\mu\text{M}$ .

La figura 14B muestra una representación gráfica de la citotoxicidad (es decir % de supervivencia celular) presentada por los complejos 1, 2 y 14 a 21 frente a células de melanoma de ratón B16F1. Los resultados indican claramente que los compuestos 1, 2 y 14 a 18 inhiben la proliferación celular hasta un grado comparable al cisplatino.

Ejemplo 15 (comparativo)

#### Acoplamiento de los compuestos de la invención a un resto de direccionamiento

En este ejemplo, el resto de direccionamiento representa acridina (A), una molécula orgánica que no se une a un receptor pero de direccionamiento al núcleo. Se ha derivatizado la acridina con un grupo isocianuro y uno imidazol para unirse al resto  $[\text{M}(\text{CO})_3]^+$ . Las estructuras básica y activa son las de los complejos 16 y 18, ambas de las cuales se ha mostrado que reticulan ADN de plásmido de  $\Phi\text{X174}$ . En la figura 15 se facilita el esquema de reacción general para la preparación de los agentes de direccionamiento al núcleo.

Se ha acoplado compuesto A a N-etilamino-imidazol mediante técnicas de acoplamiento convencionales. Se disolvió A en THF y se activó 15 con dicitlohexilcarbodiimida (DCC) y N-hidroxisuccinimida. Tras completarse la activación, se añadieron 0,9 eq. del derivado de imidazol y se agitó la mezcla durante 12 h a TA. La HPLC mostró conversión cuantitativa de A  $\rightarrow$  B. Se usó el compuesto sin purificación adicional.

Se activó compuesto A tal como se describió anteriormente y se mezcló con un exceso de 50 veces de 1,2-diaminoetano en THF. Se dejó agitar la disolución durante la noche. Se eliminó el disolvente a vacío y se lavó el residuo varias veces con  $\text{NaHCO}_3$  saturado. Se disolvió el residuo en metanol y se purificó mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$  1/3 v/v). Luego se mezcló compuesto C con éster etílico del ácido isocianoacético y se hizo reaccionar durante 48 h. Tras este tiempo se convirtió C cuantitativamente en D. Se purificó la mezcla de reacción mediante cromatografía en columna (gel de sílice,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{hexano}$  2/1).

Ahora se hace reaccionar un equivalente de compuesto D con 1 para producir un compuesto  $[\text{Re}(\text{D})\text{Br}_2(\text{CO})_3]^+$ , una composición según la fórmula I.

Ejemplo 16 (comparativo)

#### Monitorización de la biodistribución de los compuestos de la invención

Se sintetizan los complejos de fórmula general I con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (I) siguiendo los mismos procedimientos tal como se explicaron resumidamente para el renio. Se prepara el complejo de partida 1 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (I)) a partir del kit Isolink o según un procedimiento publicado (Alberto *et al.* J. Am. Chem. Soc. 1999, 121 (25), 6076-6077). Se mezclan los complejos de renio citotóxicos "no radiactivos" con los complejos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (I) o  $^{188/186}\text{Re}$  (I) radiotóxicos "radiactivos". Dado que

estos complejos con isótopo o bien de Tc (I) o bien de Re (I) son análogos entre sí, la obtención de imágenes con cámaras de SPECT de técnicas convencionales permite realizar el seguimiento de dónde están acumulándose los compuestos.

5 Los antecedentes a la invención pueden encontrarse en los siguientes puntos:

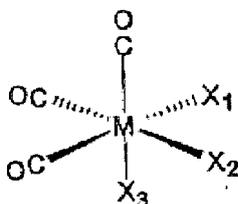
1. Uso de compuestos de tricarbonilo de metal de fórmula general  $[M(CO)_3L_3]^+$ , en el que M es renio o tecnecio o un isótopo de los mismos y L es un ligando, para la preparación de un medicamento quimioterápico y opcionalmente radioterápico para el tratamiento del cáncer.

10

2. Uso según el punto 1, en el que el medicamento es quimioterápico provocando enlaces intracatenarios en ADN.

3. Uso según el punto 1 ó 2, en el que al menos uno de L no es  $OH_2$ .

15 4. Uso según uno cualquiera de los puntos 1-3, en el que los compuestos de tricarbonilo son de fórmula general:



20 en la que M es renio o tecnecio o un isótopo de los mismos; al menos uno de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  es un ligando monodentado; o dos de  $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$  son parte de un ligando bidentado y el otro es opcionalmente un ligando monodentado.

5. Uso según el punto 4, en el que el ligando monodentado se selecciona del grupo que consiste en halógenos, CO, heterociclos aromáticos, tioéteres, isocianuros.

25

6. Uso según el punto 5, en el que los halógenos se seleccionan del grupo que consiste en bromo, yodo, flúor, cloro.

7. Uso según el punto 5, en el que los heterociclos aromáticos se seleccionan del grupo que consiste en piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, tiazol, oxazol y moléculas orgánicas que tienen uno de este grupo como parte integral.

30

8. Uso según el punto 7, en el que la purina es guanina o 9-metilguanina.

9. Uso según el punto 5, en el que los tioéteres se seleccionan del grupo que consiste en dialquil-tioéteres sustituidos lineales o tioéteres cíclicos tales como tetrahidrotiofeno y otras moléculas orgánicas que contienen una funcionalidad tioéter como parte integral de éstas.

35

10. Uso según el punto 5, en el que los isocianuros se seleccionan del grupo que consiste en moléculas orgánicas que comprenden un grupo -NC terminal acoplado a una cadena de alquilo que comprende opcionalmente una funcionalidad tal como un grupo -COOH, -NH<sub>2</sub>, -X, -SH, -OH.

40

11. Uso según el punto 5, en el que el ligando bidentado es un aminoácido o dicarboxilato.

12. Uso según el punto 11, en el que el aminoácido es un aminoácido aniónico.

45

13. Uso según el punto 11, en el que el aminoácido es un  $\alpha$ - o  $\beta$ -aminoácido no natural.

14. Uso según el punto 13, en el que el aminoácido no natural es N,N-dimetilglicina

50

15. Uso según uno cualquiera de los puntos 4-14, en el que al menos dos de los ligandos del complejo de tricarbonilo mostrado en la fórmula I se intercambian por guanina o guanosina tras 3 días a 37°C, estando guanina o guanosina presente en un ligero exceso con respecto a renio o tecnecio.

55

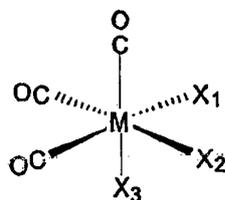
16. Uso según uno cualquiera de los puntos 4-15, en el que el compuesto se selecciona de los compuestos tal como se representan en la figura 16 y combinaciones de los mismos.

17. Uso según uno cualquiera de los puntos 4-16, en el que  $X_1$  y/o  $X_2$  y/o  $X_3$  se acoplan a un resto de direccionamiento.

18. Uso según el punto 17, en el que el resto de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en bombesina, neurotensina, somatostatina, glucosamina, nucleósidos, péptidos de secuencia de localización nuclear (péptidos de NLS), oligonucleótidos, moléculas de direccionamiento al núcleo tales como antraciclinas, acridinas y otros intercaladores, y derivados o análogos de los mismos.

5

19. Compuestos de tricarbonilo de fórmula general:



10 en la que M es renio o tecnecio o un isótopo de los mismos; al menos uno de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> es un ligando monodentado seleccionado del grupo que consiste en halógenos, CO, heterociclos aromáticos, tioéteres, isocianuros; o dos de X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> son parte de un ligando bidentado seleccionado de aminoácidos y dicarboxilatos y el otro es opcionalmente un ligando monodentado seleccionado del grupo que consiste en halógenos, CO, heterociclos aromáticos, tioéteres, isocianuros.

15

20. Compuestos según el punto 19, en los que los halógenos se seleccionan del grupo que consiste en bromo, yodo, flúor, cloro.

20 21. Compuestos según el punto 19 ó 20, en los que los heterociclos aromáticos se seleccionan del grupo que consiste en piridina, pirimidina, pirazina, imidazol, pirazol, triazol, tetrazol, tiazol, oxazol y moléculas orgánicas que tienen uno de este grupo como parte integral.

22. Compuestos según el punto 21, en los que la purina es guanina o 9-metilguanina.

25 23. Compuestos según uno cualquiera de los puntos 19-22, en los que los tioéteres se seleccionan del grupo que consiste en dialquil-tioéteres sustituidos lineales o tioéteres cíclicos tales como tetrahidrotiofeno y otras moléculas orgánicas que contienen una funcionalidad tioéter como parte integral de éstas.

30 24. Compuestos según uno cualquiera de los puntos 19-23, en los que los isocianuros se seleccionan del grupo que consiste en moléculas orgánicas que comprenden un grupo -NC terminal acoplado a una cadena de alquilo que comprende opcionalmente una funcionalidad tal como un grupo -COOH, -NH<sub>2</sub>, -X, -SH, -OH.

35 25. Compuestos según uno cualquiera de los puntos 19-24, en los que el ligando bidentado es un aminoácido o dicarboxilato.

26. Compuestos según el punto 25, en los que el aminoácido es un aminoácido aniónico.

27. Compuestos según el punto 25, en los que el aminoácido es un α- o β-aminoácido no natural.

40 28. Compuesto según el punto 27, en el que el aminoácido no natural es N,N-dimetilglicina.

45 29. Compuestos según uno cualquiera de los puntos 19-28, en los que al menos dos de los ligandos del complejo de tricarbonilo mostrado en la fórmula I se intercambian por guanina o guanosina tras 3 días a 37°C, estando guanina o guanosina presente en un ligero exceso con respecto a renio o tecnecio.

30. Compuesto tal como se representa en la figura 16.

50 31. Compuesto según el punto 30, que es los complejos 6, 10, 11, 12, 13 y 18 tal como se representan en la figura 16.

32. Compuestos según uno cualquiera de los puntos 19-31, en los que X<sub>1</sub> y/o X<sub>2</sub> y/o X<sub>3</sub> se acoplan a un resto de direccionamiento.

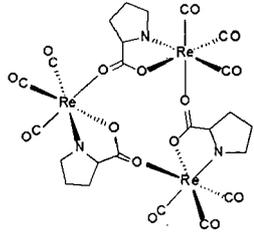
55 33. Compuestos según el punto 32, en los que el resto de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en bombesina, neurotensina, somatostatina, glucosamina, nucleósidos, péptidos de secuencia de localización nuclear

(péptidos de NLS), oligonucleótidos, moléculas de direccionamiento al núcleo tales como antraciclinas, acridinas y otros intercaladores, y derivados y análogos de los mismos.

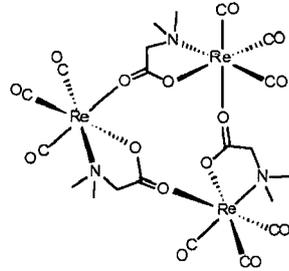
REIVINDICACIONES

1. Compuesto de tricarbonilo de metal seleccionado de los compuestos tal como se representan a continuación:

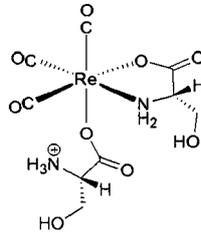
5



4



6



10

2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que uno o más de los ligandos se acoplan a un resto de direccionamiento, en el que el resto de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en bombesina, neurotensina, somatostatina, glucosamina, nucleósidos, péptidos de secuencia de localización nuclear (péptidos de NLS), oligonucleótidos, moléculas de direccionamiento al núcleo tales como antraciclinas o acridinas.
3. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en terapia.
4. Compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para su uso en el tratamiento del cáncer.
5. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para la preparación de un medicamento quimioterápico y opcionalmente radioterápico para el tratamiento del cáncer.

10

15

20

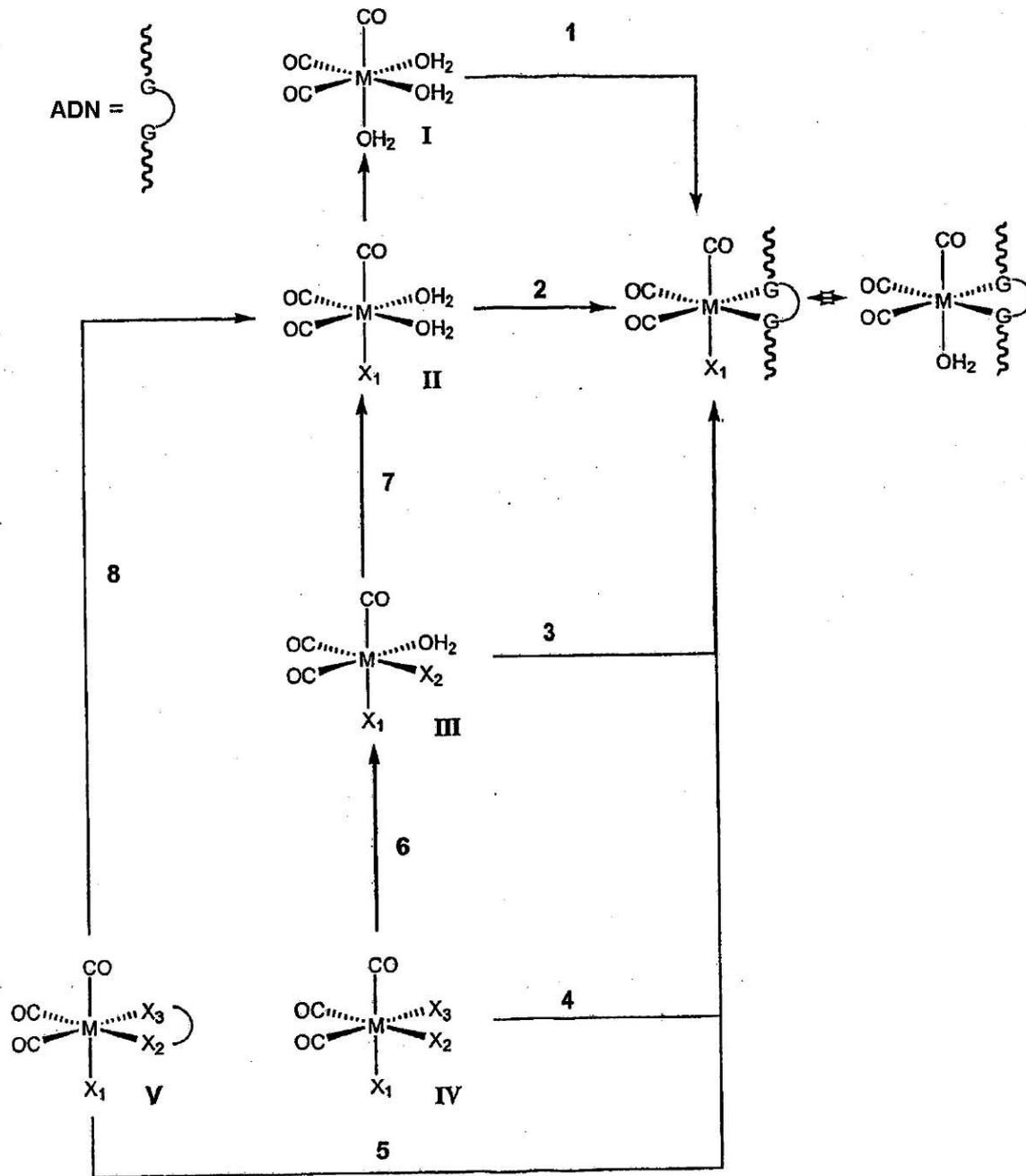


Fig. 1

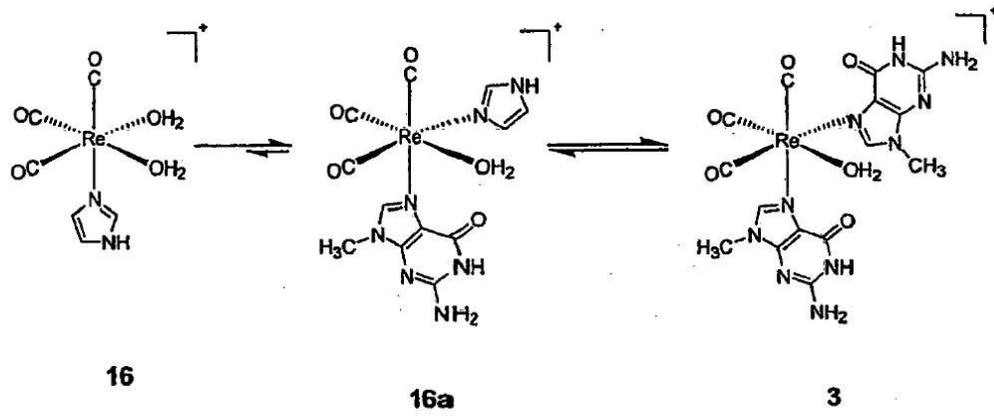


Fig. 2

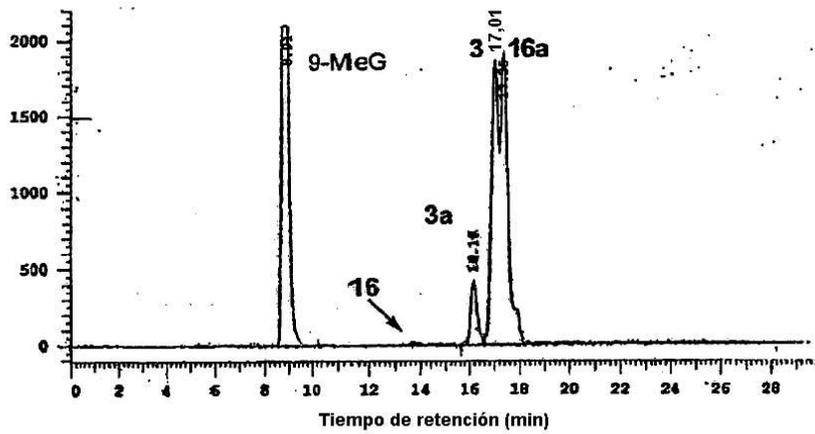


Fig. 3

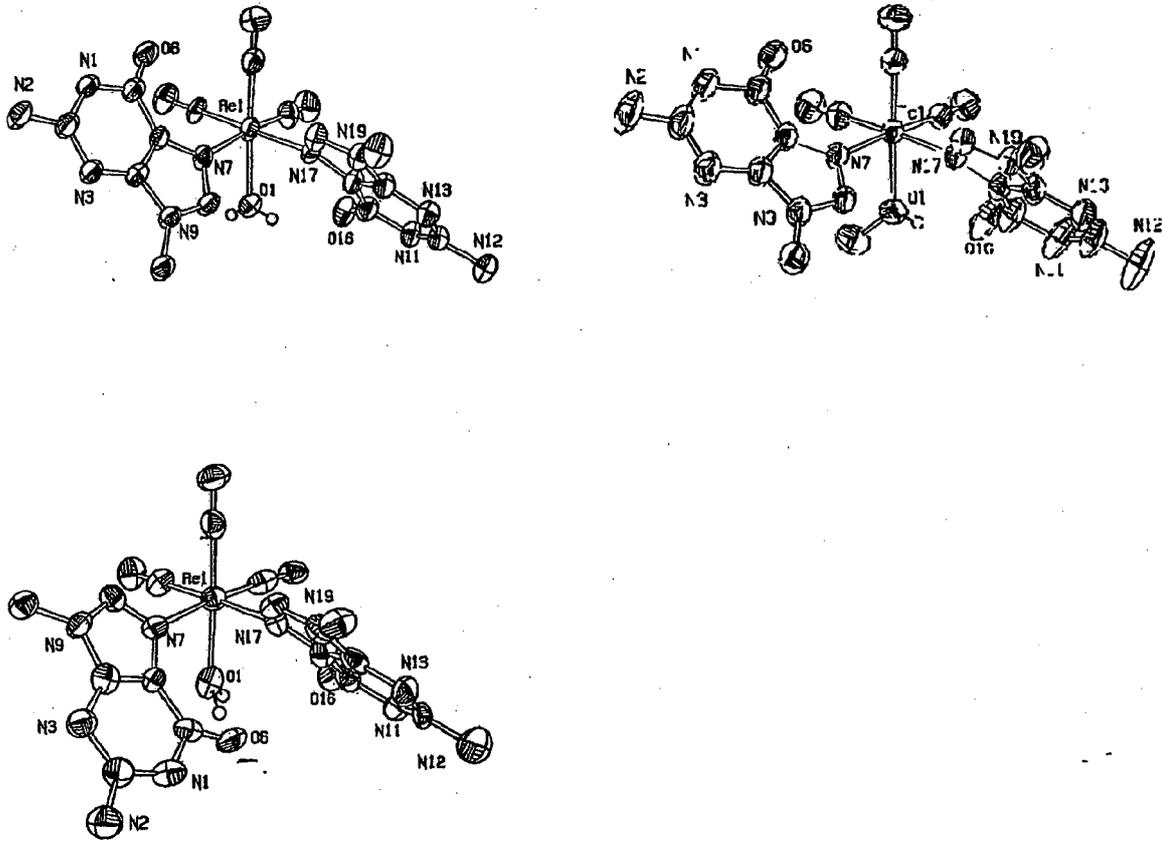


Fig. 4

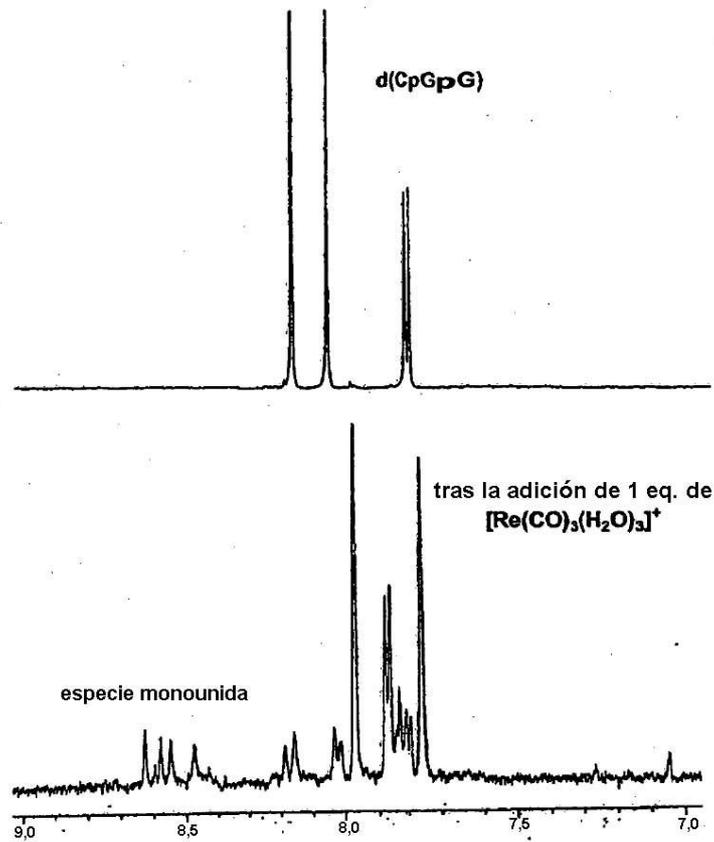


Fig. 5A

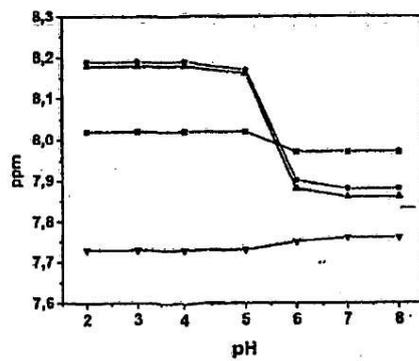


Fig. 5B

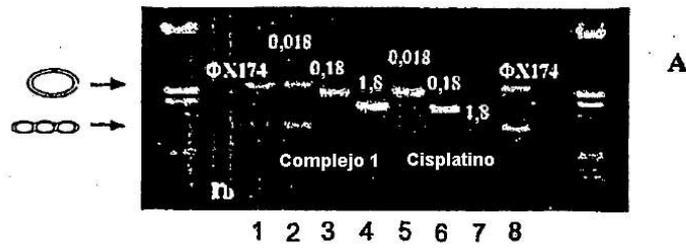


Fig. 6A

H<sub>2</sub>O, incubado a 37°C, 22 h

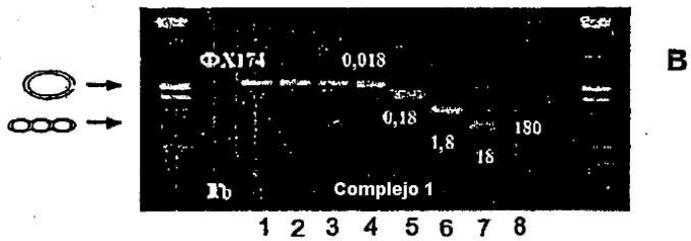


Fig. 6B



Fig. 6C

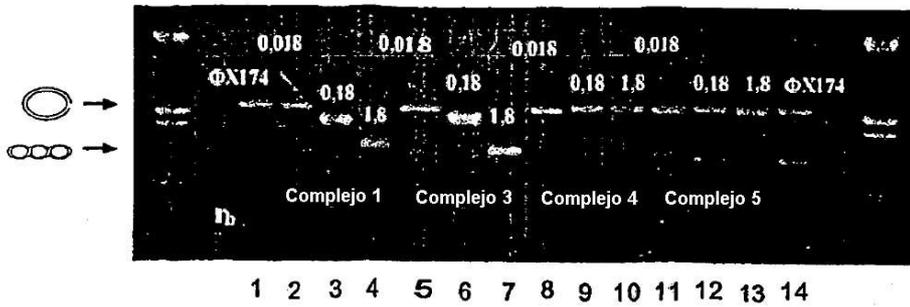


Fig. 7

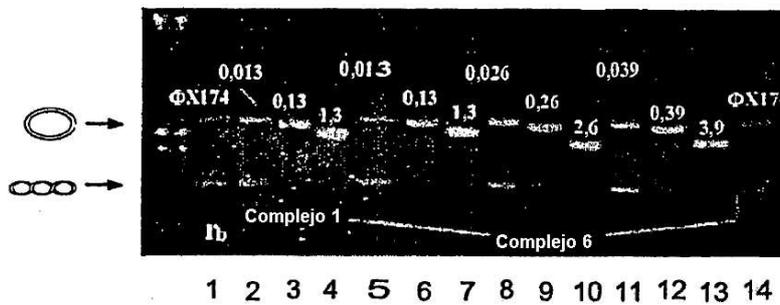
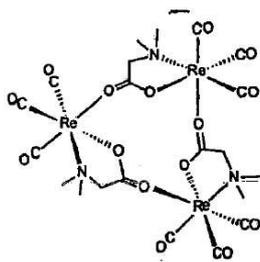


Fig. 8A



Profármaco 6

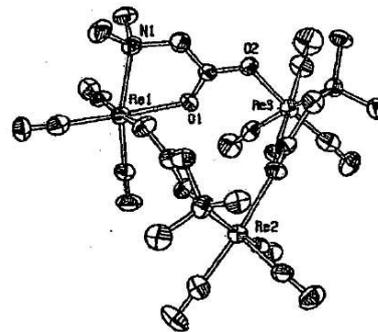
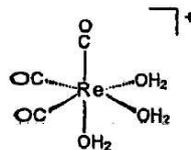


Fig. 8B

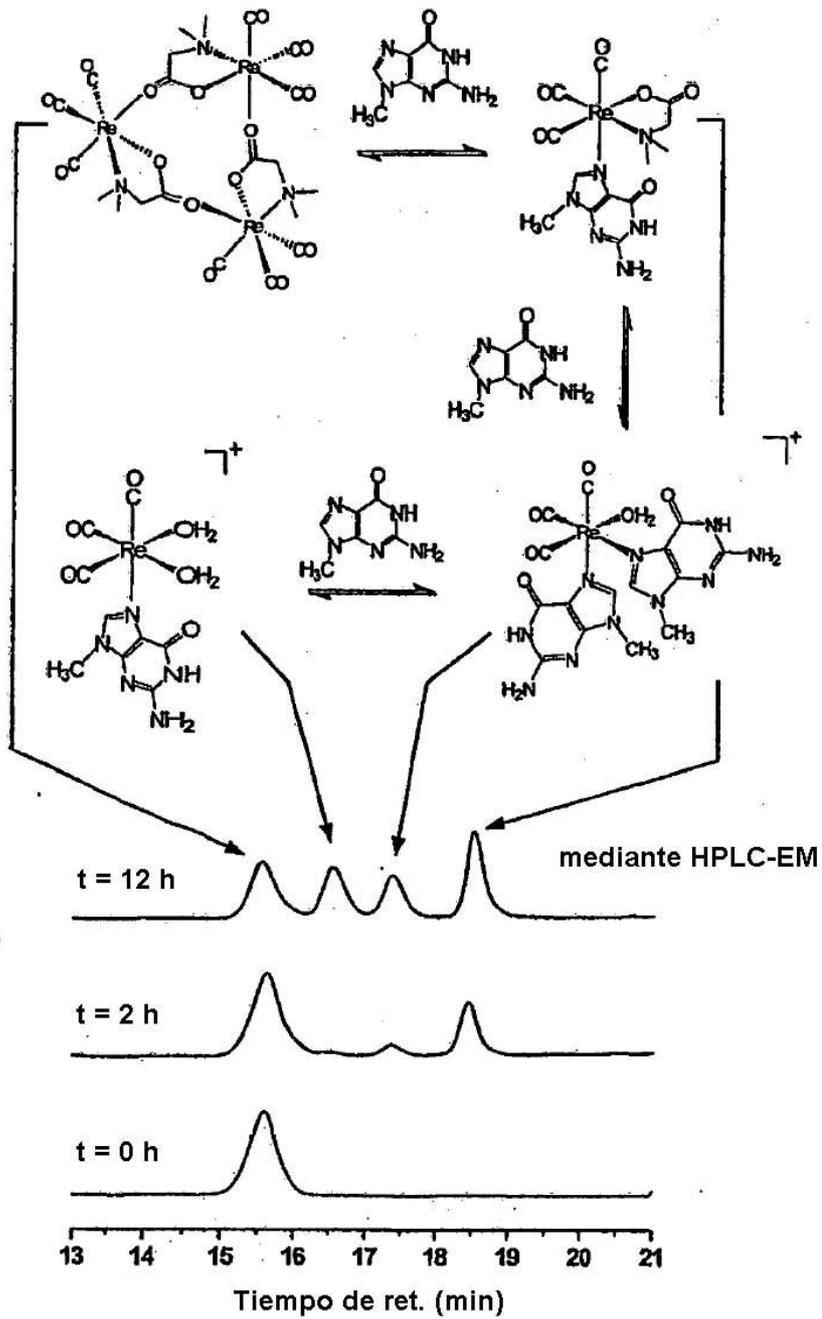


Fig. 8C

Fig. 9

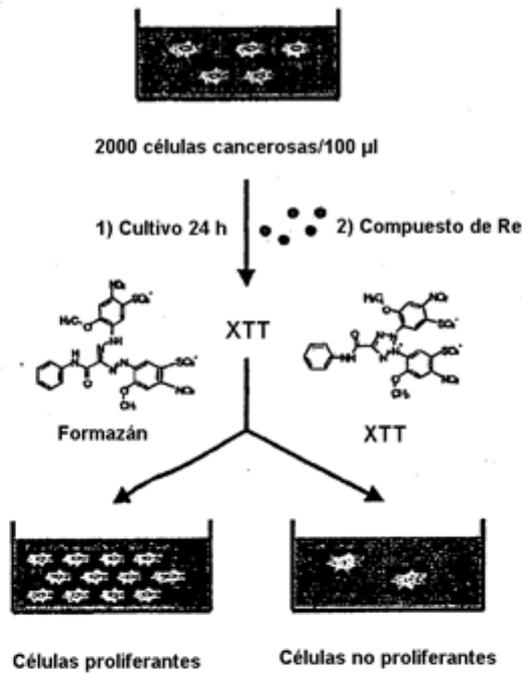
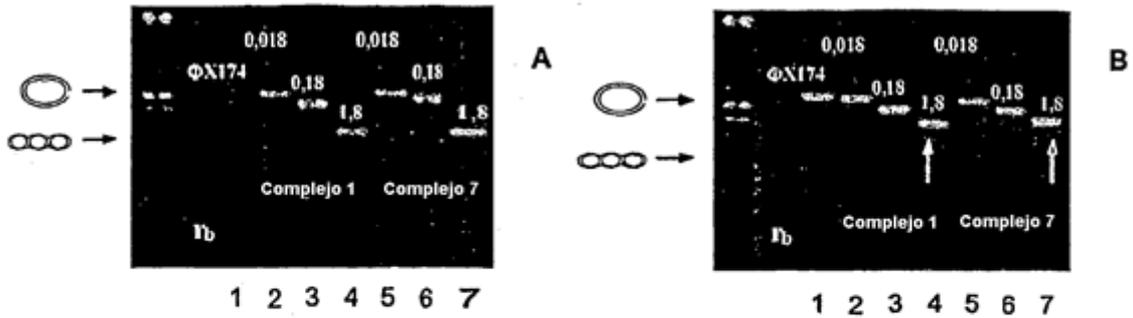
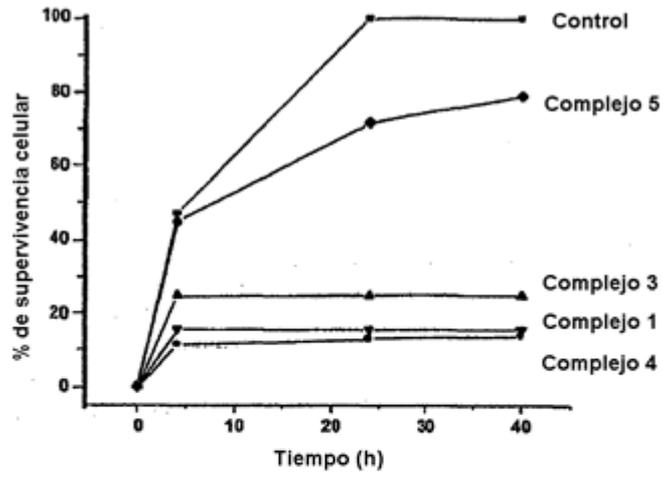
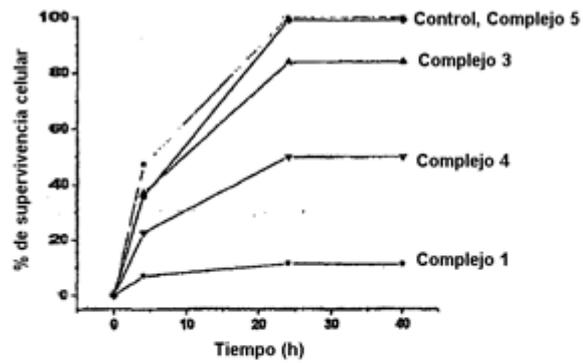


Fig. 10



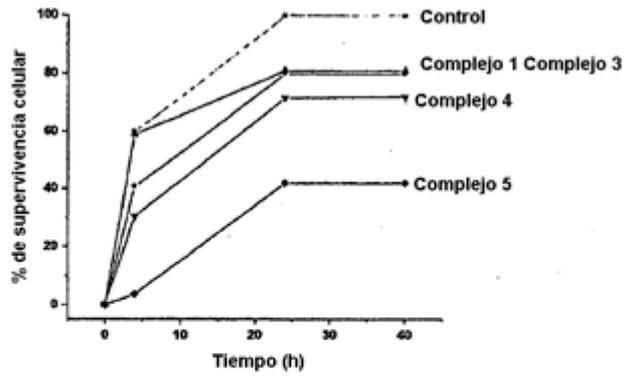
Efecto de los compuestos de Re sobre la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-4355

Fig. 11



Efecto de los compuestos de Re sobre la proliferación de células de cáncer de ovario OVMZ-6-WT

Fig. 12



Efecto de los compuestos de Re sobre la proliferación de células de cáncer gástrico HSC45-M2

Fig. 13

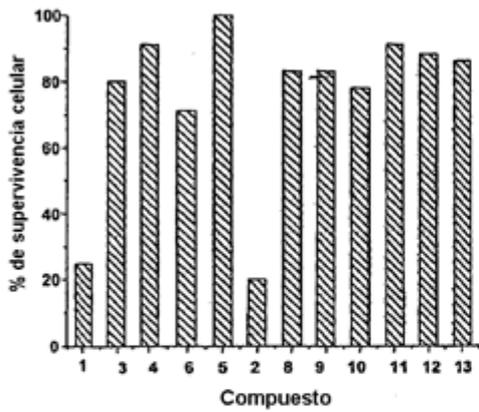


Fig. 14A

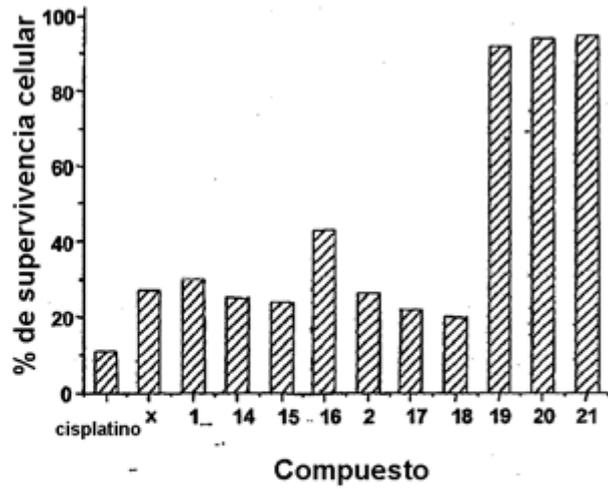


Fig. 14B

Fig. 15

