

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 499**

21 Número de solicitud: 201631426

51 Int. Cl.:

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.12.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (80.0%)
Pza do Obradoiro s/n
15782 Santiago de Compostela (A Coruña) ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (20.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ VILLAR, Jessica;
MASCAREÑAS CID, José Luis;
RODRÍGUEZ COUCEIRO, José;
MOSQUERA MOSQUERA, Jesús;
VÁZQUEZ SENTÍS, Marcos Eugenio y
SAINZ ANDING, Bruno**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Complejos de Rutenio para el tratamiento del cáncer**

57 Resumen:

Complejos de rutenio para el tratamiento del cáncer.
La presente invención está dirigida al uso de complejos de rutenio (II) para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, especialmente de cáncer que comprende células madre cancerosas. Estos complejos de rutenio son capaces de metalar de forma selectiva los cuádruplex de guanina, lo que provoca un aumento en la expresión del oncogén c-MYC. Este aumento en la proporción de c-MYC podría promover la diferenciación de células madre de cáncer.

ES 2 594 499 A1

DESCRIPCIÓN

Complejos de Rutenio para el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de complejos de rutenio, o de composiciones farmacéuticas que los contienen, para el tratamiento de cáncer, especialmente de cáncer que comprende células madre cancerosas.

10

Antecedentes de la invención

Es conocido que los compuestos metálicos que contienen platino presentan actividades antitumorales significativas. El más conocido de ellos es el cisplatino, el cual se usa
15 actualmente en el tratamiento clínico de numerosos cánceres.

No obstante, el tratamiento antitumoral basado en este tipo de compuestos conlleva efectos secundarios de tipo severo en muchas ocasiones. Por tanto, existe un gran interés en desarrollar compuestos metálicos con actividad antitumoral que sean más selectivos y
20 menos tóxicos que el cisplatino. En este sentido, los complejos de rutenio son una alternativa prometedora debido a su estabilidad cinética y a sus propiedades redox y fotoquímicas. Se han descrito complejos de rutenio que reconocen de forma no-covalente el ADN de doble hebra y también que forman aductos covalentes con el ADN. La mayoría de estos complejos se unen a la doble hebra del ADN. Sin embargo, debido a la relevancia
25 funcional de los cuádruplex de guanina (GQs), sería de gran interés desarrollar complejos capaces actuar mediante su unión a estas estructuras. En este sentido, en Wu et al., Inorg. Chem. 2013, 2, 11332, se describen complejos de rutenio capaces de metalar covalentemente una estructura de GQ, sin embargo esta reacción es poco selectiva.

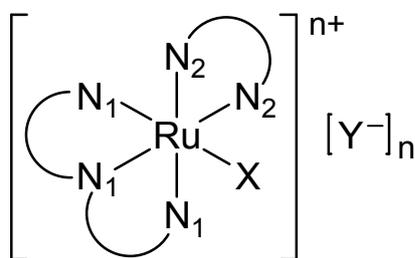
30 En relación con el desarrollo tumoral y la aparición de metástasis, recientemente se ha identificado una población de células denominadas "células madre cancerosas" las cuales presentan capacidad de diferenciación en diferentes tipos celulares y de autorrenovación, por lo que se considera probable que estén relacionadas con los procesos de recaída tras un tratamiento antitumoral y de aparición de metástasis. Por lo tanto, es de gran interés
35 disponer de nuevas terapias antitumorales capaces de actuar sobre este tipo celular.

Por todo ello, existe una necesidad de disponer de métodos alternativos para el tratamiento del cáncer que permitan solventar las deficiencias del estado de la técnica.

5 Sumario de la invención

Los inventores han descubierto que los complejos de rutenio(II) según se definen en este documento son capaces de metalar de forma selectiva las guaninas no apareadas presentes en los cuádruplex de guaninas (GQs) paralelos. Según se ha observado, esta metalación selectiva provoca un aumento de la expresión del oncogen *c-MYC*, el cual está implicado en numerosos procesos celulares. Adicionalmente, los inventores han encontrado que este aumento en la proporción de *c-MYC* podría promover la diferenciación de células madre de cáncer, lo cual hace de estos complejos de rutenio una importante herramienta en biología y medicina. Se ha observado además que la reacción de metalación aumenta al irradiar con luz, en mayor o menor grado dependiendo del tipo de complejo.

Teniendo en cuenta esto, en un primer aspecto la presente invención se relaciona con un complejo de rutenio de fórmula (I)



20

(I)

en donde

$\text{N}_1\text{-N}_1\text{-N}_1$ representa un ligando aza-aromático N,N,N-tridentado;

$\text{N}_2\text{-N}_2$ representa un ligando aza-aromático N,N-bidentado;

X se selecciona de OH_2 , Cl, Br, I y SR_1R_2 ;

25 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ opcionalmente sustituido;

Y⁻ es un anión monovalente; y

n es 1 o 2;

para preparar un medicamento para el tratamiento de cáncer.

En un segundo aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica o un medicamento que comprende un complejo de rutenio de fórmula (I) según se define en este documento para su uso en el tratamiento de cáncer.

- 5 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de rutenio de fórmula (I) según se define en este documento e irradiar con luz.

Descripción de las figuras

10

Figura 1. (Arriba) Reacción de metalación del GMP con el complejo **1** y formación del derivado aquo **2**. (Abajo izquierda) HPLC de la reacción del complejo **1** (250 μ M) y GMP (750 μ M) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: (a) en la oscuridad a t = 0; (b) después de 30 min en la oscuridad; (c) mezcla inicial tras 30 min de irradiación a 455 nm; (d) mezcla inicial tras 2 h en la oscuridad. (Abajo derecha) Espectro de masas del monoadducto **3**.

15

Figura 2. Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **1** (250 μ M) con GMP (3 equiv, 750 μ M), AMP (3 equiv, 750 μ M), TMP (3 equiv, 750 μ M) y CMP (3 equiv, 750 μ M) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: (a) complejo **1**; (b) mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 1 de ACN/H₂O, 0,1% TFA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$.

20

Figura 3. a) Cromatograma de HPLC para la reacción del complejo **1** (250 μ M) y GMP (3 equiv, 750 μ M) en presencia de H-Lys(Boc)-OH (3 equiv, 750 μ M) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: complejo **1**, GMP y H-Lys(Boc)-OH tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 1 de ACN/H₂O, en presencia de TFA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$. El GMP aparece como dos picos porque es una mezcla de isómeros 2' y 3' monofosfato. b) Cromatograma de HPLC para la reacción del complejo **1** (250 μ M) y GMP (3 equiv, 750 μ M) en presencia de Ac-Cys-OH (3 equiv, 750 μ M) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: complejo **1**, GMP y Ac-Cys-OH tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 1 de ACN/H₂O, en presencia de TFA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$.

25

30

Figura 4. (Izquierda) HPLC de una mezcla de c-MYC (10 μ M) y complejo **1** (5 equiv) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl a temperatura ambiente: a) en la oscuridad a t = 0; (b) después de 30 min en la oscuridad; (c) mezcla inicial tras 30 min de irradiación a

35

455 nm, Eluyente: gradiente 3 de ACN/H₂O, en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 260$ nm. (Derecha) Espectro de masas del producto metalado (MYC-[Ru]) que muestra los picos correspondientes al complejo ($m/z = 8089$) y el fragmento desmetalado ($m/z = 7600$).

- 5 **Figura 5.** Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **4** (250 μM) y GMP (750 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: (a) complejo **4**; (b) tras 30 min en la oscuridad; (c) la misma mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 1 de ACN/H₂O, en presencia de TFA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$ nm.
- 10 **Figura 6.** HPLC de una mezcla de c-MYC (10 μM) y complejo **4** (5 equiv) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl a temperatura ambiente: (a) complejo **4**; (b) después de 30 min en la oscuridad; (c) la misma mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 3 de ACN/H₂O, en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 260$ nm.
- 15 **Figura 7.** Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **5** (250 μM) y GMP (750 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl: (a) complejo **5**; (b) tras 30 min en la oscuridad; (c) la misma mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 1 de ACN/H₂O, en presencia de TFA. $\lambda_{\text{obs}} = 260$ nm.
- 20 **Figura 8.** HPLC de una mezcla de c-MYC (10 μM) y complejo **5** (5 equiv) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl a temperatura ambiente: (a) complejo **5**; (b) después de 30 min en la oscuridad; (c) la misma mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 3 de ACN/H₂O, en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 260$ nm.
- 25 **Figura 9.** Cromatogramas de HPLC para el complejo **1** (250 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl a temperatura ambiente: (a) en la oscuridad a $t = 0$; (b) tras 30 min en la oscuridad; (c) la misma mezcla tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 2 de ACN/H₂O, en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$ nm.
- 30 **Figura 10.** Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **2** (250 μM) y GMP (750 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl a temperatura ambiente: (a) en la oscuridad a $t = 0$; (b) tras 30 min en la oscuridad; (c) mezcla inicial tras 30 min de irradiación a 455 nm. Eluyente: gradiente 2 de ACN/H₂O, en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$ nm.

Figura 11. (Izquierda) Análisis de niveles de expresión de *c-MYC* (barras claras) y *ALAS1* (barras oscuras) mediante qRT-PCR. Se incubaron células HeLa durante 16 h o 48 h, ya sea con 100 μ M del complejo **1** (RuCl), TMPyP4 o 50 μ M 5-FU. Los niveles se expresan en relación con los niveles de expresión del gen GAPDH. Los valores son el promedio de tres experimentos, y las barras de error indican el error estándar. (Derecha) Análisis de la expresión de *c-MYC* por Western-blot. Las células HeLa se incubaron durante 16 h con el complejo **1** (RuCl) a 100 μ M, a continuación, se lisaron y *c-MYC* se detectó por SDS-PAGE, seguido de Western-blot con un anticuerpo Anti-MYC (Derecha, panel superior). Se cuantificó la cantidad relativa de proteína en dos experimentos independientes mediante densitometría (Derecha, panel inferior). Los datos se representan como el factor de cambio con respecto a los controles no tratados. Las barras de error indican la desviación estándar del factor de cambio con respecto a los controles no tratados.

Figura 12. Análisis de niveles de expresión de *c-MYC* mediante qRT-PCR. Se incubaron células Vero durante 16 h con 100 μ M el complejo **2** (aquo). Los niveles relativos se expresan en relación con los niveles de expresión de GAPDH. Los resultados corresponden a los valores medios de tres experimentos, y las barras de error indican la desviación estándar.

Figura 13. Ensayo de viabilidad de diferentes líneas celulares tratadas con el complejo **1** (RuCl). Se incubaron durante 3 días la línea celular inmortalizada Vero (barras blancas), la línea celular A549 (barras grises claras), y la línea celular HeLa (barras de color gris oscuro) con 100 μ M RuCl o TMPyP4, o 50 μ M 5-FU. Se analizó la viabilidad celular mediante el uso de un ensayo de MTT estándar. Los valores representan el factor de cambio con respecto a las células no tratadas (barras negras) y son el resultado promedio de tres experimentos diferentes, cada uno de ellos realizado por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 14. (Izquierda) Niveles de transcripción de *c-MYC* determinados mediante qRT-PCR en oscuridad (barras negras) o después de la irradiación (60 min, barras blancas). Se incubaron células HeLa durante 16 h con 100 μ M del complejo **5** (RuMet) o del complejo **2** (aquo). Los valores de expresión son relativos a la expresión del gen GAPDH. (Derecha) Niveles de expresión de proteína *c-MYC* determinados mediante Western-blot en presencia o ausencia del complejo **5**. La cantidad relativa de proteína con respecto a los niveles de

expresión de β -actina se cuantificó por densitometría (panel inferior). El procedimiento experimental fue similar al descrito en la Figura 11.

Figura 15. Niveles de expresión de proteína c-MYC determinados mediante Western-blot en presencia o ausencia del complejo **5** (RuMet), complejo **1** (RuCl), o complejo **2** (aquo). Las barras claras corresponden a niveles de expresión de c-MYC en condiciones de irradiación mientras que las barras oscuras corresponden a condiciones de oscuridad. La expresión de c-MYC es representada como el factor de cambio con respecto a la expresión en las muestras sin tratar. Los niveles relativos de proteína con respecto a los niveles de expresión de β -actina se cuantificaron mediante densitometría.

Figura 16. Ensayo de viabilidad de diferentes líneas celulares tratadas con el complejo **5** (RuMet). Se incubaron durante 3 días las líneas celulares Vero y HeLa con 100 μ M complejo **5**. Se analizó la viabilidad celular mediante el uso de un ensayo de MTT estándar. Las barras de color gris claro indican los valores experimentales en condiciones de irradiación y las barras negras los valores determinados en la oscuridad. Los valores representan el factor de cambio con respecto a las células no tratadas en la oscuridad (control) y son la media de tres experimentos diferentes cada uno realizado por triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar.

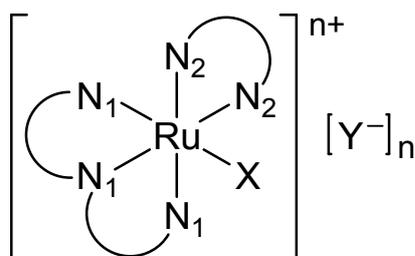
Figura 17. Efectos del complejo **2** (RuH₂O) sobre las células de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). (A) El complejo **2** (RuH₂O) aumenta la expresión de c-MYC en las células PDAC, tal como se determinó mediante Western blot, en las PDAC tratadas con diferentes concentraciones de complejo **2** y durante tiempos diferentes. (B) El complejo **2** (RuH₂O) reduce la capacidad de auto-renovación de células madre cancerosas PDAC. El panel superior muestra el diseño experimental El panel inferior muestra la cuantificación del número de esferas/mL determinado el día 7 después de la siembra por grupo de tratamiento.

30 Descripción detallada de la invención

Los investigadores han encontrado que los complejos de rutenio de fórmula (I) en los que X es Cl son capaces de metalar de forma selectiva el guanósín monofosfato (GMP) mediante transformación previa en el complejo aquo (X = H₂O) activo. Esta reacción se puede acelerar mediante irradiación con luz.

Se ha observado también que estos complejos provocan un aumento en los niveles de expresión del oncogen *c-MYC*, actuando por tanto como activadores de la transcripción. En el caso de los complejos de rutenio en los que X se selecciona de SR_1R_2 , éstos son estables en la oscuridad, pero el ligando tioéter puede intercambiarse fácilmente mediante irradiación con luz dando lugar al complejo aquo activo. En ese caso, se ha comprobado que los complejos de rutenio en los que X se selecciona de SR_1R_2 , son completamente inertes en ausencia de luz, pero provocan un aumento en los niveles de *c-MYC* tras irradiación con luz. Se ha confirmado además que, en el caso de los complejos de rutenio de la invención en los que X es H_2O (complejo aquo), es posible aumentar los niveles del oncogen *c-MYC* tanto en la oscuridad como mediante irradiación con luz.

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un complejo de Ru(II) de fórmula (I)



15

(I)

en donde

$N_1-N_1-N_1$ representa un ligando aza-aromático N,N,N-tridentado;

N_2-N_2 representa un ligando aza-aromático N,N-bidentado;

X se selecciona de OH_2 , Cl, Br, I y SR_1R_2 ;

20 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido;

Y⁻ es un anión monovalente; y

n es 1 o 2;

para preparar un medicamento para el tratamiento de cáncer.

25 Complejos de Rutenio

El término "alquilo" se refiere a un derivado de alcano lineal o ramificado que contiene desde 1 hasta 12 ("alquilo C_1-C_{12} "), preferiblemente desde 1 hasta 6 ("alquilo C_1-C_6 "), más preferiblemente desde 1 hasta 3 ("alquilo C_1-C_3 "), átomos de carbono y que está unido al resto de la molécula a través de un enlace sencillo. Ejemplos ilustrativos de grupos alquilo incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo.

El término “alquenilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado que contiene desde 2 hasta 6 (“alquenilo C₂-C₆”), más preferiblemente desde 2 hasta 3 (“alquenilo C₂-C₃”), átomos de carbono, que contiene al menos un doble enlace y se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Ejemplos ilustrativos incluyen etenilo, propenilo, alilo, butenilo, 1-metil-2-buten-1-ilo, y similares.

El término “alquinilo” se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado que contiene desde 2 hasta 6 (“alquinilo C₂-C₆”), más preferiblemente desde 2 hasta 3 (“alquinilo C₂-C₃”), átomos de carbono, que contiene al menos un triple enlace y se une al resto de la molécula mediante un enlace sencillo. Ejemplos ilustrativos incluyen etinilo, propinilo, butinilo, y similares.

El término “arilo” se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 14, preferiblemente entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1 ó 2 núcleos aromáticos condensados entre sí. Ejemplos ilustrativos de grupos arilo incluyen fenilo, naftilo, indenilo, fenantrilo, etc.

El término “heterociclilo” se refiere a un sistema monocíclico o bicíclico que puede estar completa o parcialmente saturado o ser aromático (“heteroarilo”) que contiene desde 3 hasta 10, preferiblemente de 5 a 10, más preferiblemente de 5 a 7, átomos de anillo que contienen uno o más, específicamente uno, dos, tres o cuatro heteroátomos de anillo seleccionados independientemente de N, O y S, y siendo los átomos de anillo restantes carbono.

El término “halógeno” se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.

El término ligando aza-aromático N,N-bidentado o N,N,N-tridentado se refiere a moléculas aromáticas que pueden tomar dos (bidentados) o tres (tridentados) sitios de coordinación del núcleo metálico de Ru(II) mediante coordinación sólo a través de los átomos de nitrógeno. Preferiblemente, esta molécula aromática es un heteroarilo estable que tiene de 10 a 32, preferiblemente de 12 a 28, más preferiblemente de 12 a 20, miembros (bidentado) o que tiene de 15 a 32, preferiblemente de 18 a 30, más preferiblemente de 18 a 26, miembros (tridentado), formado por átomos de carbono y desde dos (bidentado) o tres (tridentado) hasta seis, preferiblemente 2, 3, 4 o 5, átomos de nitrógeno. La expresión “heteroarilo que tiene de 10 a 32 miembros o que tiene de 15 a 32 miembros” tal como se usa en el presente documento significa un grupo heteroarilo que tiene un esqueleto de desde 10 a 32 átomos o

desde 15 a 32 átomos. Para los propósitos de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillos policíclico, que puede incluir sistemas de anillos unidos o condensados. Ejemplos de ligandos aza-aromático N,N-bidentados y N,N,N-tridentados incluyen, pero no se limitan a, 2,2'-bipiridina, 2,2'-bipirazina, 2,2'-bipirimidina, 1,10-fenantrolina, batofenantrolina, 2,2'-bisquinolina, 1,1'-bisisoquinolina, 2-piridinil-2-quinolina, 3-piridinil-2-quinolina, 1-piridinil-2-isoquinolina, 2-piridinil-2-[1,8]-naftiridina, 2,2':6',2''-terpiridina, 2,6-bis(2'-benzimidazolil)piridina, 2,6-bis(8'-quinolinil)piridina, 2,6-bis(2'-[1,8]-naftiridinil)piridina, 2-piridinil-2-[1,10]-fenantrolina, 2-quinolinil-8-[1,10]-fenantrolina y similares. Estos ligandos aza-aromáticos pueden estar opcionalmente sustituidos.

10

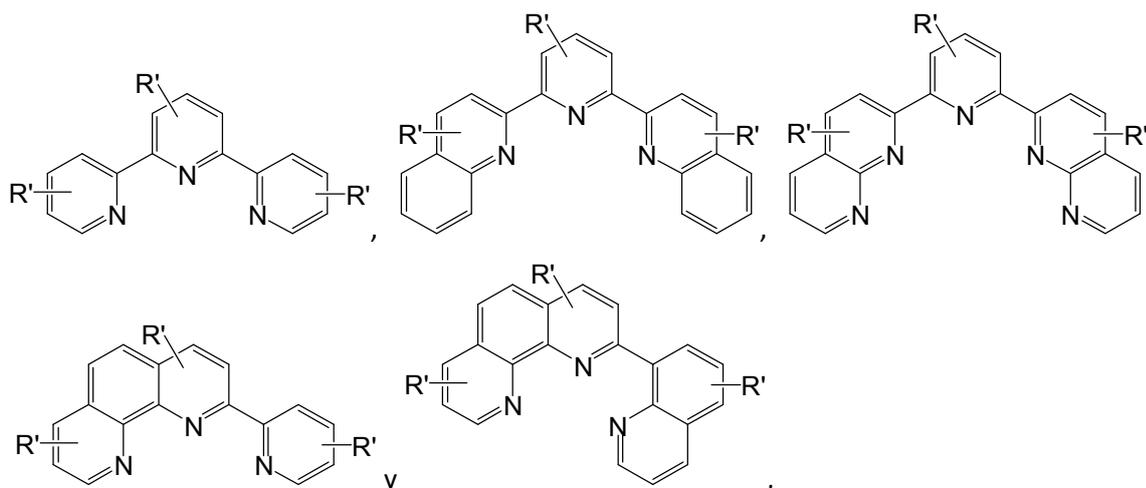
Los grupos mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones disponibles con uno o más grupos adecuados tales como OR, SR, SOR, SO₂R, OSO₂R, SO₃R, NO₂, N(R)₂, N(R)COR, N(R)SO₂R, CN, halógeno, COR, CO₂R, OCOR, OCO₂R, OCONHR, OCON(R)₂, CONHR, CON(R)₂, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄ y heterociclilo de 3 a 10 miembros, en el que cada uno de los grupos R está seleccionado independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄, y heterociclilo de 3 a 10 miembros.

20 En el presente documento, "anión monovalente" se refiere a un anión inorgánico u orgánico con una sola carga negativa que puede formar un enlace iónico con un catión de un complejo de Ru(II). Preferiblemente, el anión monovalente es inorgánico. Ejemplos de aniones monovalentes incluyen PF₆⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻, BF₄⁻, CF₃SO₃⁻, CH₃SO₃⁻, CH₃C₆H₄SO₃NO₃⁻, NO₂⁻, SCN⁻, BrO₃⁻, IO₃⁻, HCO₃⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻, HSO₄⁻, HSO₃⁻ y
25 H₂PO₃⁻.

En una realización particular, N₁-N₁-N₁ es un ligando aza-aromático N,N,N-tridentados seleccionado del grupo formado por 2,2':6',2''-terpiridina, 2,6-bis(2'-benzimidazolil)piridina, 2,6-bis(8'-quinolinil)piridina, 2,6-bis(2'-[1,8]-naftiridinil)piridina, 2-piridinil-2-[1,10]-fenantrolina y 2-quinolinil-8-[1,10]-fenantrolina opcionalmente sustituidas.

30

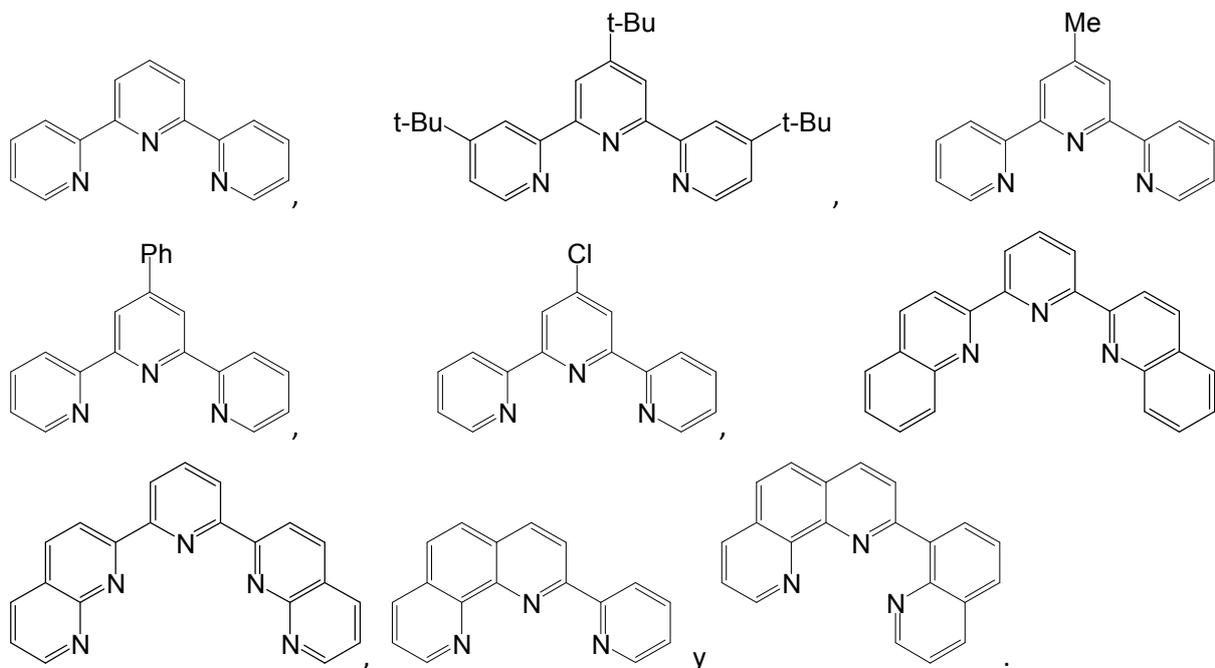
En una realización, N₁-N₁-N₁ se selecciona del grupo formado por:



en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno. Preferiblemente, cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₆ no sustituido, arilo C₆-C₁₄ no sustituido y heteroarilo de 5 a 10 miembros no sustituido. Más preferiblemente, cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, Cl, Br, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular cada grupo R' es hidrógeno.

10

De acuerdo con una realización particular, N₁-N₁-N₁ se selecciona del grupo formado por:



15

En otra realización, N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6,2''-terpiridina opcionalmente sustituida. Preferiblemente, N₁-N₁-N₁ se selecciona de 2,2':6,2''-terpiridina opcionalmente sustituida

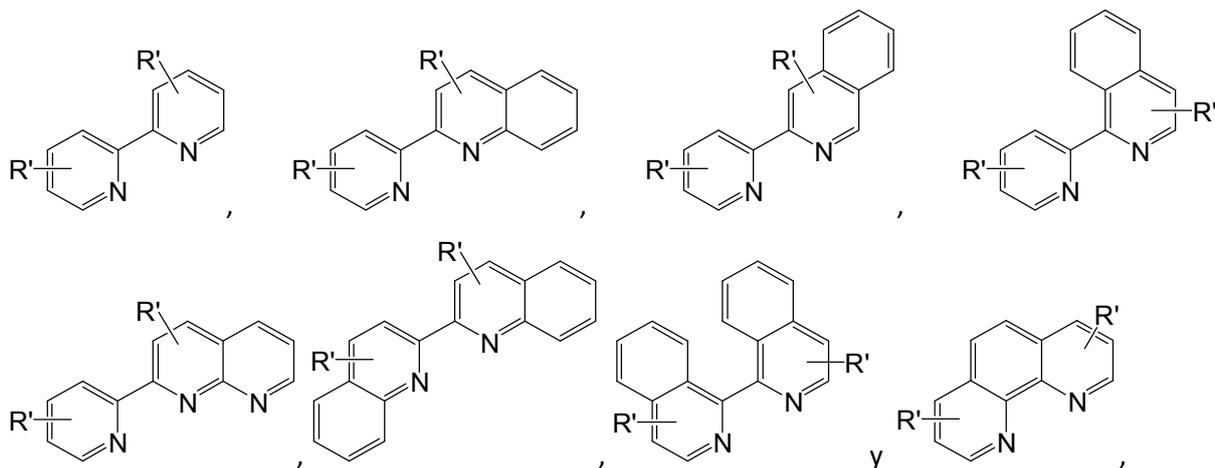
con alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄, heteroarilo de 5 a 10 miembros o halógeno; más preferiblemente 2,2':6',2''-terpiridina opcionalmente sustituida con Cl, Br, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6',2''-terpiridina.

5

De acuerdo con una realización particular de la invención, N₂-N₂ es un ligando azaaromático N,N-bidentados seleccionado del grupo formado por 2,2'-bipiridina, 2,2'-bipirazina, 2,2'-bipirimidina, 1,10-fenantrolina, batofenantrolina, 2,2'-bisquinolina, 1,1'-bisisoquinolina, 2-piridinil-2-quinolina, 3-piridinil-2-quinolina, 1-piridinil-2-isoquinolina y 2-piridinil-2-[1,8]-naftiridina opcionalmente sustituidas.

10

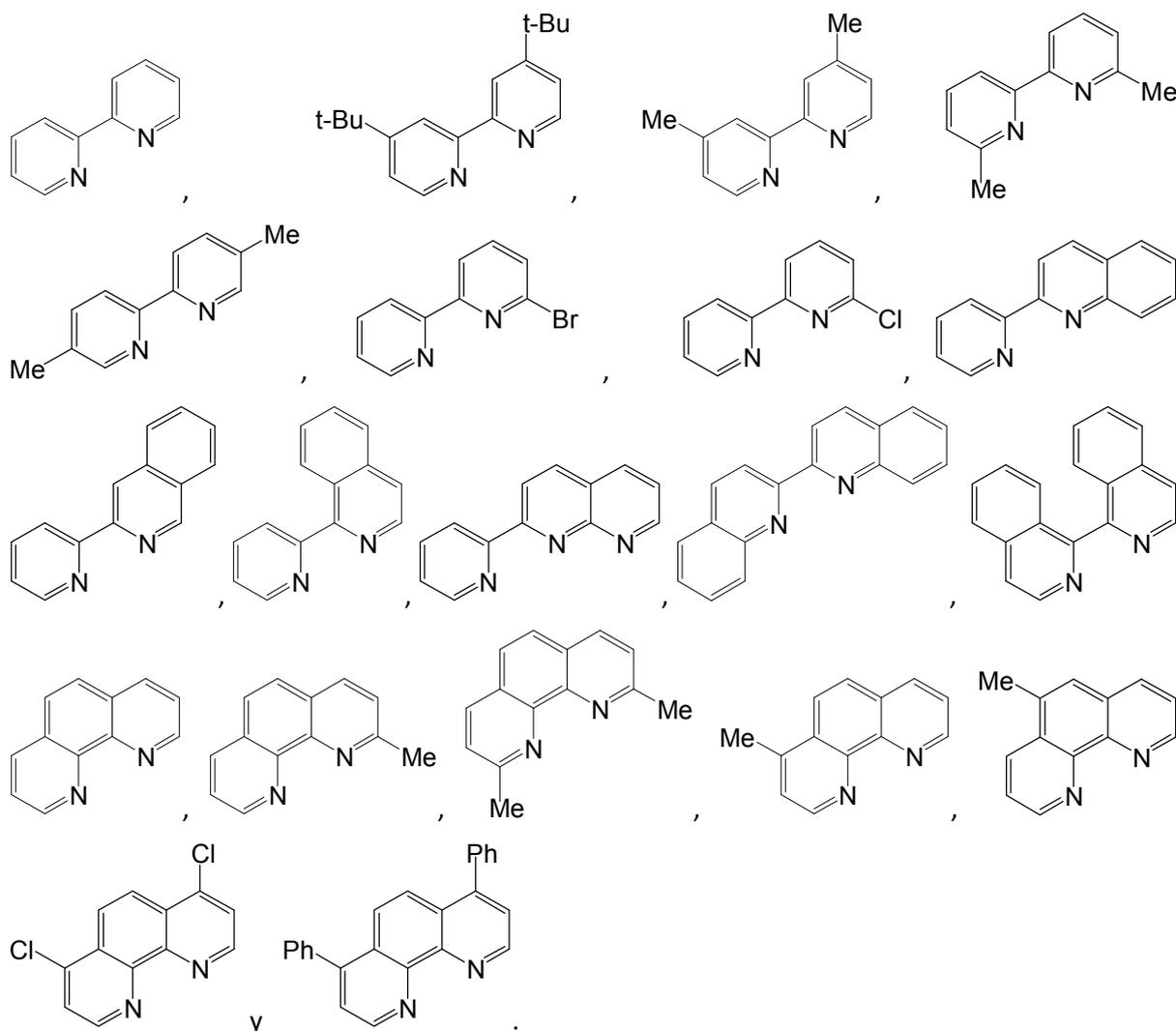
En una realización, N₂-N₂ se selecciona del grupo formado por:



15 en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno. Preferiblemente, cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, halógeno, alquilo C₁-C₆ no sustituido, arilo C₆-C₁₄ no sustituido y heteroarilo de 5 a 10 miembros no sustituido. Más preferiblemente, cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, Cl, Br, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular cada grupo R' es hidrógeno.

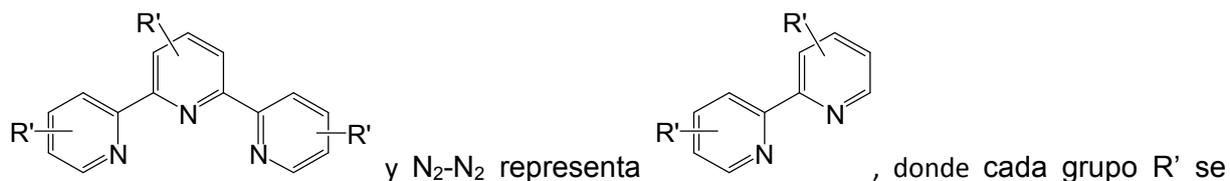
20

De acuerdo con una realización particular, N₂-N₂ se selecciona del grupo formado por:



En otra realización, N_2-N_2 representa 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida. Preferiblemente, N_2-N_2 se selecciona de 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida con alquilo C_1-C_6 , arilo C_6-C_{14} , heteroarilo de 5 a 10 miembros o halógeno; más preferiblemente 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida con Cl, Br, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular N_2-N_2 representa 2,2'-bipiridina.

De acuerdo con una realización de la invención, $N_1-N_1-N_1$ representa

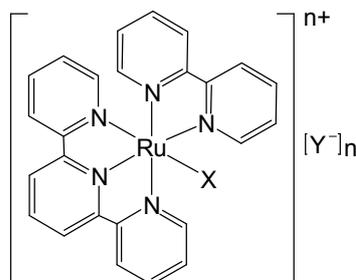


selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, arilo

C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

En una realización particular, el complejo de Ru(II) presenta la siguiente fórmula:

5



en donde X, Y⁻ y n son tal y como se definen en este documento.

El valor de n viene determinado por la estructura química y carga eléctrica de los ligandos seleccionados y la carga eléctrica 2+ del átomo de Ru(II) central. De esta forma, cuando X representa OH₂ o SR₁R₂, entonces n es 2. Cuando X representa Cl, Br o I, entonces el valor de n es 1. El complejo de fórmula (I) es neutro, es decir, su carga global es cero.

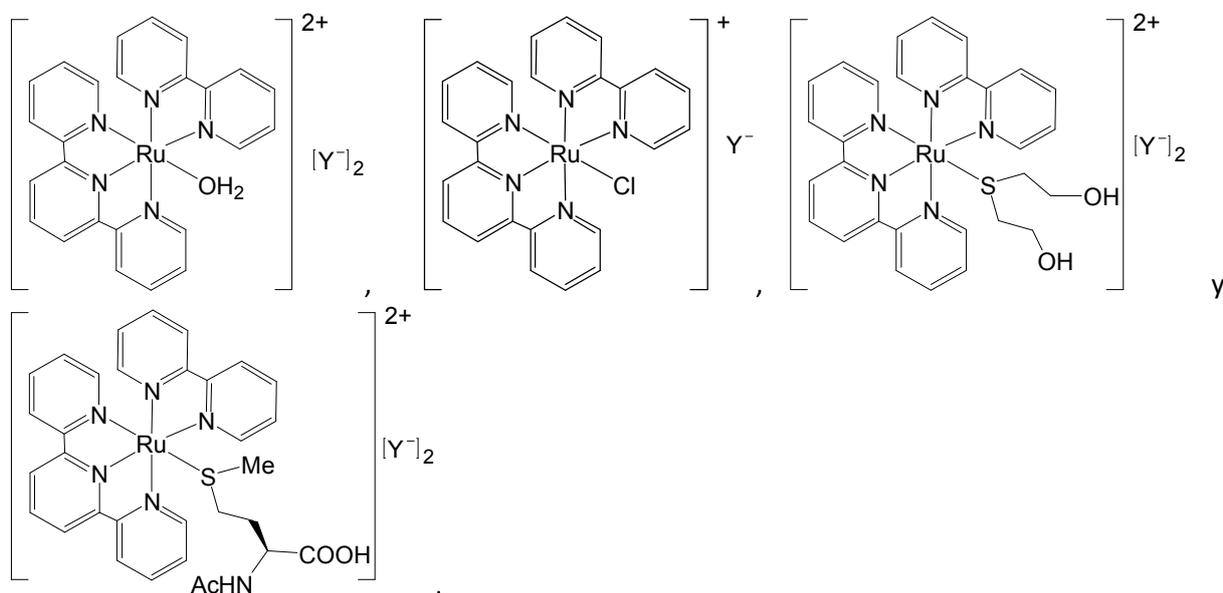
En una realización particular, X representa OH₂. Preferiblemente, N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6',2''-terpiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente, N₂-N₂ representa 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente y X representa OH₂.

En otra realización particular, X representa Cl, Br o I, preferiblemente Cl. En una realización particular, N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6',2''-terpiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente, N₂-N₂ representa 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente y X representa Cl, Br o I, preferiblemente Cl.

En una realización, X representa SR₁R₂, donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido. Preferiblemente, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂, preferiblemente alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de halógeno, OR'', N(R'')₂, N(R'')COR'', CN, NO₂, COR'', CO₂R'', OCOR'', OCO₂R'', OCONHR'', OCON(R'')₂, CONHR'', CON(R'')₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄, y heterociclilo de 3 a 10 miembros, donde cada grupo R'' se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄ y heterociclilo de 3

a 10 miembros. Más preferiblemente, R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de OR'' , $N(R'')COR''$ y CO_2R'' , donde cada grupo R'' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , alquino C_2-C_6 , arilo C_6-C_{14} y heterociclilo de 3 a 10 miembros. Más
 5 preferiblemente, R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de OH , $N(H)COCH_3$ y CO_2H . En una realización, R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de CH_3 , CH_2CH_2OH y $CH_2CH_2CH(COOH)N(H)COCH_3$.

10 En una realización de la invención, el complejo de rutenio se selecciona del grupo formado por:



en donde Y^- es tal y como se define en este documento.

15

En una realización particular, Y^- se selecciona del grupo formado por PF_6^- , Cl^- , Br^- , I^- , F^- , BF_4^- , $CF_3SO_3^-$, $CH_3SO_3^-$, $CH_3C_6H_4SO_3NO_3^-$, NO_2^- , SCN^- , BrO_3^- , IO_3^- , HCO_3^- , $HCOO^-$, CH_3COO^- , HSO_4^- , HSO_3^- y $H_2PO_3^-$. Preferiblemente, Y^- se selecciona del grupo formado por PF_6^- , Cl^- , Br^- , BF_4^- , $CF_3SO_3^-$, $CH_3SO_3^-$ y $CH_3C_6H_4SO_3^-$. En una realización, Y^- es Cl^- o PF_6^- ,
 20 preferiblemente PF_6^- .

25 la materia.

Composiciones farmacéuticas

Los complejos de Ru de la invención se pueden usar para preparar una composición
5 farmacéutica para el tratamiento de cáncer. Por tanto, otro aspecto de la invención es una
composición farmacéutica que comprende un complejo de rutenio de fórmula (I) tal y como
se define en este documento, para su uso en el tratamiento de cáncer.

Tal y como se usa en este documento, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a
10 una formulación que se ha adaptado para administrar una dosis predeterminada de uno o
varios agentes terapéuticos útiles a una célula, un grupo de células, un órgano, un tejido o
un organismo.

Los complejos de rutenio se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una
15 “cantidad terapéuticamente eficaz” se entiende como una cantidad que puede proporcionar
un efecto terapéutico y que puede determinarse por el experto en la técnica mediante
medios usados comúnmente. La cantidad eficaz variará con el trastorno particular que está
tratándose, la edad y la condición física del sujeto que está tratándose, la intensidad del
trastorno, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea o de
20 combinación (si la hay), la vía específica de administración y factores similares dentro del
conocimiento y la experiencia del profesional sanitario. Generalmente se prefiere que se use
una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta según el criterio médico razonable. Por
ejemplo, si el sujeto tiene un tumor, una cantidad eficaz puede ser la cantidad que reduce el
volumen o la carga tumoral (según se determina, por ejemplo, mediante obtención de
25 imágenes del tumor). También pueden evaluarse cantidades eficaces mediante la presencia
y/o frecuencia de células cancerosas en la sangre u otro líquido o tejido corporal (por
ejemplo, una biopsia). Si el tumor afecta al funcionamiento normal de un tejido u órgano,
entonces la cantidad eficaz puede evaluarse midiendo el funcionamiento normal del tejido u
órgano. Los expertos en la técnica apreciarán que también pueden determinarse
30 dosificaciones con las directrices de Goodman and Goldman’s The Pharmacological Basis of
Therapeutics, novena edición (1996), apéndice II, págs. 1707-1711 y de Goodman and
Goldman’s The Pharmacological Basis of Therapeutics, décima edición (2001), apéndice II,
págs. 475-493.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en este documento, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” significa una carga, diluyente, material de encapsulación o adyuvante de formulación sólido, semisólido o líquido, inerte, no tóxico, de cualquier tipo que es aceptable para el paciente desde un punto de vista farmacológico/toxicológico y para el químico farmacéutico de fabricación desde un punto de vista físico/químico referente a la composición, formulación, estabilidad, aceptación por parte del paciente y biodisponibilidad. Remington's Pharmaceutical Sciences. Ed. por Gennaro, Mack Publishing, Easton, Pa., 1995 describe diversos vehículos usados en la formulación de composiciones farmacéuticas y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; goma tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorio; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; detergentes tales como TWEEN™ 80; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y disoluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como también pueden estar presentes agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes en la composición, según el criterio del formulador. Si la filtración u otros métodos de esterilización terminal no son viables, las formulaciones pueden fabricarse en condiciones asépticas.

Composiciones farmacéuticas de la invención incluyen cualquier composición sólida (tabletas, píldoras, cápsulas, granulado, etc.), semi-sólida (cremas, ungüentos, etc.) o líquida (solución, suspensión o emulsión).

Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden administrarse a un paciente mediante cualquier medio conocido en la técnica incluyendo las vías oral y parenteral. Según tales realizaciones, las composiciones de la invención pueden administrarse mediante inyección (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular,

intraperitoneal). En una realización particular, los complejos de rutenio de la invención se administran de manera sistémica, por ejemplo mediante infusión o inyección i.v. Pueden formularse preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles según la técnica conocida usando agentes de suspensión y agentes de
5 dispersión o humectantes adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una disolución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico, aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer, U.S.P., y solución de cloruro de sodio isotónica. Además,
10 convencionalmente se emplean aceites estériles, fijos, como disolvente o medio de suspensión. Con este fin puede emplearse cualquier aceite fijo suave incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de productos inyectables se usan ácidos grasos tales como ácido oleico. Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o mediante
15 incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Las composiciones pueden comprender el complejo de rutenio como único agente o en
20 combinación con otro agente terapéutico, tal como un fármaco anticancerígeno. En una realización, la composición farmacéutica o el medicamento de la invención comprende la combinación de un complejo de rutenio de fórmula (I) y un fármaco anticancerígeno formulada para su administración simultánea, separada o secuencial. Esto implica que la combinación de los dos compuestos puede ser administrada:

- 25
- como una combinación que forma parte de la misma formulación farmacéutica o medicamento, administrando los dos compuestos de manera simultánea; o
 - como una combinación de dos formas de dosificación, cada una conteniendo una de las
30 sustancias, dando lugar a la posibilidad de una administración simultánea, secuencial o separada.

En una realización particular, el complejo de rutenio de fórmula (I) y el fármaco anticancerígeno se administran de manera independiente (es decir, en dos formas de
35 dosificación) pero al mismo tiempo.

En otra realización particular, el complejo de rutenio de fórmula (I) se administra primero, y a continuación se administra el otro fármaco anticancerígeno separada o secuencialmente.

- 5 En una realización particular adicional, el otro fármaco anticancerígeno se administra primero y a continuación se administra el compuesto de fórmula (I), separada o secuencialmente, según se defina.

10 El término “fármaco anticancerígeno”, tal como se utiliza en el presente documento, también denominado “agente anticancerígeno”, “agente antitumoral” o “agente antineoplásico”, hace referencia a un agente que es útil en el tratamiento de cáncer. Agentes antitumorales de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitación, alquilantes, antimetabolitos, inhibidores de la topoisomerasa y antraciclinas.

15 El término “agente alquilante”, tal como se emplea aquí, también denominado “agente antineoplásico alquilante”, se refiere a un agente que media en la transferencia de un grupo alquilo de una molécula a ADN. El grupo alquilo puede transferirse como un carbocatión de alquilo, un radical libre, un carbanión o un carbeno (o sus equivalentes). Los agentes alquilantes se usan en quimioterapia para dañar el ADN de células cancerosas. Los agentes alquilantes se separan generalmente en seis clases:

- mostazas de nitrógeno, tales como mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, etc.;
- derivados de etilenamina y metilenamina, incluyendo altretamina, tiotepa y similares;
- sulfonatos de alquilo, tales como busulfano, etc.;
- 25 - nitrosoureas, tales como carmustina, lomustina, etc.;
- triazenos, tales como dacarbazina, procarbazona, temozolomida, etc.; y
- agentes antineoplásicos que contienen platino, tales como cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, que se clasifican habitualmente como agentes alquilantes, aunque no alquilan el ADN, sino que provocan la formación de aductos metálicos covalentes con el
- 30 ADN mediante un medio diferente, etc.

El término “antimetabolito”, tal como se emplea aquí, se refiere a un producto químico que inhibe el uso de un metabolito, que es otro producto químico que es parte del metabolismo normal. Tales sustancias tienen con frecuencia una estructura similar a la del metabolito con el que interfieren, tales como los antifolatos que interfieren con el uso de ácido fólico. La

presencia de antimetabolitos puede tener efectos tóxicos sobre células, tales como detener el crecimiento celular y la división celular, de modo que estos compuestos se usan como quimioterapia para el cáncer. Los antimetabolitos se hacen pasar por una purina o una pirimidina, evitando su incorporación en el ADN durante la fase S (del ciclo celular),
 5 deteniendo el desarrollo y la división normales. También afectan a la síntesis de ARN. Sin embargo, dado que la timidina se usa en el ADN pero no en el ARN (en el que se usa uracilo en su lugar), la inhibición de la síntesis de timidina por timidilato sintasa inhibe selectivamente la síntesis de ADN con respecto a la síntesis de ARN. Los antimetabolitos pueden seleccionarse de:

- 10 - análogos de purina, tales como azatioprina, mercaptopurina, tioguanina, fludarabina, pentostatina, cladribina, etc.;
- análogos de pirimidina, tales como 5-fluorouracilo (5FU), floxuridina (FUDR), arabinósido citosina (citarabina), 6-azauracilo (6-AU), etc.; o
- antifolatos, tales como metotrexato, pemetrexed, proguanilo, pirimetamina, trimetoprima,
 15 etc.

El término “inhibidor de la topoisomerasa”, tal como se emplea aquí, se refiere a un agente diseñado para interferir con la acción de enzimas topoisomerasas (topoisomerasa I y II). Se piensa que los inhibidores de la topoisomerasa bloquean la etapa de ligación del ciclo
 20 celular, generando roturas mono y bicatenarias que dañan la integridad del genoma. La introducción de estas roturas conduce posteriormente a la apoptosis y muerte celular. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inhibidores de la topoisomerasa incluyen etopósido, tenipósido, topotecán, irinotecán, diflomotecán o elomotecán.

25 El término “antraciclina”, tal como se emplea aquí, se refiere a una clase de fármacos (CCNS o no específicos del ciclo celular) usados en la quimioterapia contra el cáncer derivados de cepas de bacterias Streptomyces. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de antraciclinas incluyen daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, valrubicina, mitoxantrona, etc.

30

Otros agentes anticancerígenos de acuerdo a la presente invención incluyen, sin limitación, los siguientes agentes:

- inhibidores de la angiogénesis, tales como angiostatina, endostatina, fumagilina, genisteína, minociclina y estaurosporina;

- inhibidores de la síntesis del ADN, tales como aminopterina, ganciclovir e hidroxiurea;
 - inhibidores de enzimas, tales como S(+)-camptotecina, curcumina, ácido 2-imino-1-imidazolidinacético (ciclocreatina), hispidina, formestano y mevinolina;
 - inhibidores de microtúbulos, tales como colchicina y dolastatina 15; y
- 5 - otros agentes antitumorales, tales como 17-(alilamino)-17-desmetoxigeldanamicina, apigenina, cimetidina, hormona liberadora de la hormona leutinizante, y pifitrina α .

Usos

10 Un aspecto de la invención es el uso de un complejo de rutenio tal como se define en este documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

Otro aspecto de la invención se refiere a un complejo de rutenio tal como se define en este documento para su uso en el tratamiento de cáncer.

15

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende administrar a un paciente que necesita de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de rutenio tal como se define en este documento.

20 Según son utilizados en el presente documento, los términos “tratar”, “que trata” y “tratamiento” incluyen en general la erradicación, eliminación, reversión, alivio, modificación o control del cáncer tras su comienzo.

El término “cáncer”, tal como se emplea en el presente documento, también denominado
25 “carcinoma”, hace referencia a una enfermedad caracterizada por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos. Dentro del contexto de la presente invención, este término incluye cualquier tipo de cáncer o tumor. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos cánceres o tumores incluyen cánceres hematológicos (e.g., leucemias o linfomas), tumores neurológicos (e.g.,
30 astrocitomas o glioblastomas), melanoma, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, tumores gastrointestinales (e.g., cáncer de estómago, páncreas o colorrectal (CCR)), cáncer de hígado (e.g., carcinoma hepatocelular), cáncer de células renales, tumores genitourinarios (e.g., cáncer de ovario, cáncer vaginal, cáncer de cuello de útero, cáncer de vejiga, cáncer de testículo, cáncer de próstata), tumores óseos, tumores
35 vasculares, etc.

En una realización particular, el cáncer es un cáncer que comprende células madre cancerosas.

- 5 El término “célula madre cancerosa”, tal como se utiliza aquí, también conocido como “célula madre cancerígena” o “CSC” (de las siglas en inglés, “cancer stem cell”) o con sus siglas en castellano “CMC”, hace referencia a un tipo de célula madre que conserva las capacidades de autorenovación y de diferenciación y que además es capaz de originar tumores. Las células madre cancerígenas son altamente tumorigénicas y quimioresistentes. Se cree que estas células podrían estar relacionadas con los procesos de recaída tumoral y/o metástasis tras la quimioterapia. La presencia de este tipo de células ha sido descrita en diversos tipos de tumores incluyendo, sin limitación, neoplasia hematológica (Lapidot T et al. 1994 Nature 367(6464): 645-648), cáncer de mama (Al-Hajj M et al. 2003 Proc Natl Acad Sci USA 100(7): 3983-3988), cáncer de pulmón (Kim CF et al. 2005 Cell 121(6): 823-835), cáncer de colon (O’Brien CA et al. 2007 Nature 445(7123): 106-110), cáncer de próstata (Collins AT et al. 2005 Cancer Res 65(23): 10946-10951), cáncer de ovario (Szotek PP et al. 2006 Proc Natl Acad Sci USA 103(30): 11154-11159) y cáncer de páncreas (Li C et al. 2007 Cancer Res 67(3): 1030-1037).
- 10
- 20 En una realización particular, el cáncer se selecciona de neoplasia hematológica, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical y cáncer renal. En una realización aún más particular, el cáncer es cáncer de páncreas, preferiblemente adenocarcinoma de páncreas.
- 25 El término “neoplasia hematológica”, tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un grupo heterógeno de cánceres que afectan a la sangre, la médula ósea y los ganglios linfáticos. Este término incluye las leucemias (que afectan a la médula ósea y se extienden a la sangre periférica) y los linfomas (originados en los diferentes tejidos linfoides: ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas). Las neoplasias hematológicas, atendiendo a su origen, pueden ser mieloides o linfoides.
- 30

Las neoplasias hematológicas mieloides incluyen:

- Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP): incluyen Leucemia mieloide crónica, BCR-ABL positiva, Leucemia neutrofílica crónica, Policitemia vera, Mielofibrosis primaria,

Trombocitopenia esencial, Leucemia eosinofílica crónica, Mastocitosis sistémica y Neoplasias mieloproliferativas inclasificables.

- Neoplasias mieloides y linfoides con eosinofilia y anomalías de *PDGFRA*, *PDGFRB* o *FGFR1*.
- 5 - Síndromes mielodisplásicos (SMD): incluyen Citopenia refractaria con displasia unilineal, Anemia refractaria sideroblástica, Citopenia refractaria con displasia multilineal, Anemia refractaria con exceso de blastos, Síndrome mielodisplásico con del(5q) aislada, Síndrome mielodisplásico inclasificable y Síndrome mielodisplásico infantil.
- Neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/MP): incluyen Leucemia mielomonocítica crónica, Leucemia mieloides crónica atípica *BCR-ABL* negativa, Leucemia mielomonocítica juvenil y Neoplasia mielodiplásica/mieloproliferativa inclasificable.
- 10 - Leucemia mieloides agudas (LMA): incluyen LMA con alteraciones genéticas recurrentes, LMA con t(8;21)(q22;q22) *RUNX1*, LMA con cambios relacionados con mielodisplasia, LMA relacionadas con terapias previas, LMA sin características propias de las categorías anteriores, Sarcoma mieloides, Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down y Neoplasia de células blasticas dendríticas plasmocitoide.
- 15 - Leucemias agudas de linaje ambiguo.

Las neoplasias hematológicas linfoides incluyen:

- 20 - Neoplasias linfoides de células precursoras: incluyen Linfoma/leucemia linfoblástico de células B y Linfoma/leucemia linfoblástico de células T.
- Neoplasias de células B maduras.
- Neoplasias de células T y células NK maduras.
- Linfoma de Hodgkin.

25

El término “cáncer de mama”, tal como se utiliza en el presente documento, también conocido como “neoplasia maligna de mama” o “tumor de mama”, hace referencia a un cáncer originado en el tejido mamario, habitualmente en el revestimiento interno de los conductos de la leche o de los lóbulos que suministran leche a los conductos. Dependiendo del estado de receptor detectado mediante inmunohistoquímica, en particular de la presencia o ausencia de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y del nivel de expresión de HER2/neu (expresión normal/subexpresión frente a sobreexpresión), los cánceres de mama se pueden dividir en cáncer de mama positivo para ER (ER+), cáncer de mama negativo para ER (ER-), cáncer de mama positivo para PR (PR+), cáncer de mama negativo para PR (PR-), cáncer de mama positivo para HER2 (HER2+) (cáncer que

35

sobreexpresa HER2), cáncer de mama negativo para HER2 (HER2-) (cáncer que expresa niveles normales de HER2 o subexpresa HER2, o que no expresa un nivel detectable de HER2), cáncer de mama negativo para receptores de hormonas, es decir, cáncer de mama sin receptores de estrógeno ni de progesterona (abreviado mediante cáncer de mama ER-
5 /PR-); y cáncer de mama triple negativo, es decir, cáncer de mama sin receptores de estrógenos ni de progesterona y con expresión normal/subexpresión (o con la ausencia de un nivel de expresión detectable) de HER2 (abreviado mediante cáncer de mama ER-/PR-/HER2-).

10 El término “cáncer de pulmón”, como se usa en el presente documento, también denominado “cáncer pulmonar” o “tumor pulmonar”, se refiere a cualquier crecimiento celular incontrolado en los tejidos del pulmón, incluyendo, pero no limitado a, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma microcítico combinado, carcinoma de pulmón no microcítico, carcinoma sarcomatoide, tumor de las glándulas salivares, tumor carcinoide, carcinoma
15 adenoescamoso, blastoma pleuropulmonar y tumor carcinoide.

El término “cáncer de próstata”, tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un crecimiento incontrolado (maligno) de células originarias de la glándula de la próstata.

20

El término “cáncer de ovario”, tal como se utiliza en el presente documento, también denominado “cáncer ovárico” o “tumor ovárico”, hace referencia a un grupo de tumores que se originan en los ovarios e incluye, sin limitación, cáncer ovárico seroso, cáncer ovárico no invasor, cáncer ovárico de fenotipo mezclado, cáncer ovárico mucinoso, cáncer ovárico
25 endometroide, cáncer ovárico de células claras, cáncer ovárico seroso papilar, célula de Brenner y adenocarcinoma sin diferenciar.

El término “cáncer de páncreas”, tal como se utiliza en el presente documento, también denominado “cáncer pancreático” o “tumor pancreático”, hace referencia al cáncer que
30 deriva de células pancreáticas incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinomas, carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células en anillo de sello, carcinomas hepatoides, carcinomas coloides, carcinomas sin diferenciar, carcinomas sin diferenciar con células gigantes de tipo osteoclasto y carcinomas de células de isletas.

El término “cáncer cervical”, tal como se utiliza en el presente documento, también denominado “carcinoma de cérvix”, o “cáncer de cuello de útero”, hace referencia a un tumor maligno desarrollado en la porción fibromuscular inferior del útero que se proyecta dentro de la vagina.

5

El término “cáncer renal”, tal como se utiliza en el presente documento, también denominado “cáncer de riñón”, “adenocarcinoma renal”, o “cáncer de células renales”, hace referencia a cualquier trastorno proliferativo maligno de células del riñón, en particular a un cáncer formado por células malignas en los túbulos del riñón.

10

Los inventores han observado que la reacción de metalación aumenta al irradiar con luz. Por tanto, en una realización preferida, los complejos de rutenio de la invención se utilizan en el tratamiento de cáncer en presencia de irradiación con luz. En una realización, la irradiación se realiza con luz ultravioleta (UV), visible o de infrarrojo (IR) cercano. En una realización particular, se irradia con luz de una longitud de onda de entre 200 y 1000 nm, preferiblemente entre 300 y 800 nm, más preferiblemente entre 400 y 600 nm. Preferiblemente, se irradia con luz de longitud de onda de entre 400 y 500 nm.

15

Por tanto, en una realización la invención se dirige a un complejo de rutenio según se define en este documento para su uso en el tratamiento de cáncer mediante irradiación con luz, preferiblemente con luz de una longitud de onda de entre 200 y 1000 nm, más preferiblemente entre 300 y 800 nm, más preferiblemente entre 400 y 600 nm. En una realización particular, se irradia con luz de longitud de onda de entre 400 y 500 nm.

20

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende administrar a un paciente que necesita de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de rutenio según se define en este documento, y donde dicho método comprende irradiar ese complejo de rutenio con luz, preferiblemente con luz de una longitud de onda de entre 200 y 1000 nm, más preferiblemente entre 300 y 800 nm, más preferiblemente entre 400 y 600 nm. En una realización particular, se irradia con luz de longitud de onda de entre 400 y 500 nm.

25

30

Los métodos adecuados para irradiar a la longitud de onda deseada son conocidos por el experto en la materia.

35

- Adicionalmente, se ha observado que los complejos de rutenio de fórmula (I) en los que X se selecciona de SR_1R_2 son cinéticamente estables y sólo reaccionan con c-myc mediante irradiación con luz. Por tanto, en estos casos es posible disponer de un derivado no activo que se puede manejar cómodamente, y que se puede activar de forma controlada en el momento y lugar precisos en los que se desee que actúe mediante irradiación con luz. Esto representa una importante ventaja en el tratamiento de cáncer. Por tanto, una realización preferida de la invención se refiere a los complejos de rutenio según se definen en este documento en los que X se selecciona de SR_1R_2 .
- 10 Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitaciones de su alcance.

Ejemplos

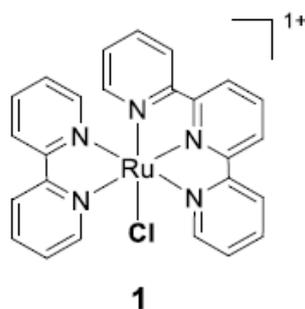
- 15 La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo utilizando un equipo de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 1100. El HPLC analítico se llevó a cabo utilizando una columna de fase reversa Phenomenex Luna-C18 analítica (10 x 250 mm, 5 μ m), 1 mL/min, con diferentes gradientes (ver más abajo). La purificación de los aductos se realizó en una columna de fase reversa Phenomenex Luna-C18 analítica (250 x 10 mm). La espectrometría de masas de ionización por electroespray (ESI/MS) se realizó con un modelo Agilent 1100 Series LC/MSD VL G1956A en modo de polaridad positivo.

Fases móviles:

- 25 a) **A:** H_2O que contiene 0,1% de TFA, **B:** ACN que contiene 0,1% de TFA.
GRADIENTE 1: 0% \rightarrow 50% de B durante 40 min.
- b) **A:** 95:5 H_2O :ACN que contiene 100 mM de TEAA, **B:** 70:30 ACN: H_2O que contiene 100 mM de TEAA.
GRADIENTE 2: 0% B durante 5 min seguido de 0% \rightarrow 100% de B durante 55 min.
- 30 GRADIENTE 3: 10% \rightarrow 50% de B durante 40 min.

Ejemplo 1. Síntesis de los complejos de rutenio(II)

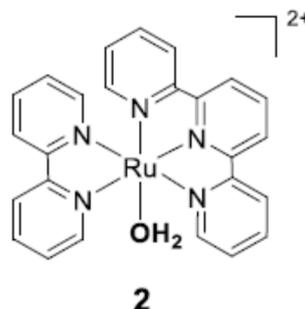
Ejemplo 1A. Síntesis del complejo 1



El complejo de rutenio **1** se preparó siguiendo el procedimiento descrito en Kaveevivitchai et al., *Inorg. Chem.* 2012, 51, 2930. Se disolvió $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (500 mg, 2 mmol) y 2,2':6',2'' terpiridina (460 mg, 1 equiv) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 desoxigenada (20 mL), y se calentó a reflujo durante 4h en la oscuridad. El precipitado resultante se lavó con EtOH ($\times 3$) y Et_2O y se utilizó directamente en una segunda etapa que implicó el tratamiento con 2,2'-bipiridina (312 mg, 1 equiv) en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 desoxigenada (20 mL) y se calentó a reflujo durante la noche. Precipitación con un exceso de KPF_6 dio lugar a la sal $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})\text{Cl}]\text{PF}_6$ **1** como un polvo marrón en un 60% de rendimiento global (800 mg).

10 EM-ESI⁺ (m/z): Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{19}\text{ClN}_5\text{Ru}$: 525,0. Encontrado: 526,0 $[\text{M}+1\text{H}]^+$.

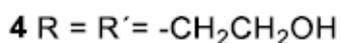
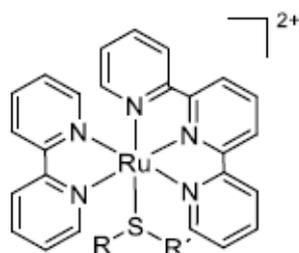
Ejemplo 1B. Síntesis del complejo 2



El complejo de rutenio **2** se preparó siguiendo un procedimiento modificado de la literatura (Takeuchi et al., *Inorg. Chem.* 1984, 23, 1845). El complejo **1** (150 mg, 0,22 mmol) se disolvió en una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 1:1 desoxigenada (20 mL) y se calentó a reflujo durante 1h. El crudo se concentró, y el producto se purificó mediante HPLC en fase reversa (HPLC-FR), 4 mL/min, gradiente 5 a 95% de B durante 35 min (A: H_2O que contiene 0,1% de TFA, B: ACN con 0,1% de TFA), y se identificó como el producto deseado mediante espectrometría de masas (78% de rendimiento). EM-ESI⁺ (m/z): Calculado para $\text{C}_{25}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{ORu}$: 509,1. Encontrado: 508,0 $[\text{M}-1\text{H}]^+$.

15
20

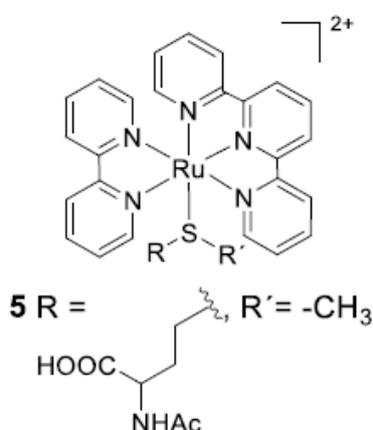
Ejemplo 1C. Síntesis del complejo 4



El complejo de rutenio **4** se preparó siguiendo un procedimiento modificado de la literatura (Bahreman et al., Eur. J. 2012, 18, 10271). El complejo **1** (50 mg, 0,07 mmol) se disolvió en tiodietanol (10 μ L, 1,3 equiv) y se calentó a reflujo durante la noche en la oscuridad. El producto se purificó mediante HPLC-FR, 4 mL/min, gradiente 5 a 95% de B durante 35 min (A: H₂O que contiene 0,1% de TFA, B: ACN que contiene 0,1% de TFA) y se identificó como el producto deseado mediante espectrometría de masas y RMN (33 mg, 65% de rendimiento). ¹H RMN (500 MHz, D₂O) δ 9,70 (m, 1H), 8,55 (m, 3H), 8,38 (m, 2H), 8,31 (m, 1H), 8,23 (m, 2H), 7,90 (m, 3H), 7,72 (m, 3H), 7,24 (ddd, J = 7,6, 5,6, 1,3 Hz, 2H), 7,13 (dt, J = 4,1, 2,0 Hz, 1H), 6,98 (ddd, J = 7,2, 4,8, 1,3 Hz, 1H), 3,20 (t, J = 5,9 Hz, 4H), 1,87 (m, 4H). ¹³C RMN (500 MHz, D₂O) δ 157,68 (C), 157,15 (C), 156,62 (C), 152,96 (CH), 151,72 (CH), 149,42 (CH), 138,62 (CH), 138,02 (C), 137,56 (CH), 136,56 (CH), 128,01 (CH), 127,29 (CH), 126,52 (CH), 124,63 (C), 124,25 (CH), 123,77 (CH), 123,37 (CH), 57,57 (CH₂), 35,01 (CH₂). EM-ESI⁺ (m/z): Calculado para C₂₉H₂₉N₅O₂RuS: 613,1. Encontrado: 612,0 [M-1H]⁺.

15

Ejemplo 1D. Síntesis del complejo **5**



El complejo de rutenio **5** se preparó siguiendo un procedimiento modificado de la literatura (Goldbach et al., Chem. Eur. J. 2011, 17, 9924). Se disolvió el complejo **1** (50 mg, 0,07 mmol) y *N*-acetil-L-metionina (19 mg, 5 equiv) en una mezcla H₂O:EtOH 1:1 desoxigenada (2 mL) y se calentó a reflujo durante la noche en la oscuridad. El producto se purificó

mediante HPLC-FR, 4 mL/min, gradiente 5 a 95% de B durante 35 min (A: H₂O que contiene 0,1% de TFA, B: ACN que contiene 0,1% de TFA) y se identificó como el producto deseado mediante espectrometría de masas (24 mg, 45% de rendimiento). EM-ESI⁺ (m/z): Calculado para C₃₂H₃₂N₆O₃RuS: 682,1. Encontrado: 681,0 [M-1H]⁺.

5

Ejemplo 2. Ensayos de unión a GMP y c-MYC

Procedimiento general para los ensayos de metalación de ADNs utilizando irradiación

10 Los oligonucleótidos (10 μM) se trataron con los complejos de rutenio en tampón de fosfato potásico 10 mM con 100 mM KCl, pH = 7,5, durante 30 min a temperatura ambiente. Las disoluciones se incubaron en la oscuridad o se irradiaron con un LED de alta potencia. Para la irradiación las muestras se colocaron en una cubeta estándar de 10 mm en un soporte de muestras y se irradiaron con una unidad de LED de alta potencia a 455 nm con 900 mW
15 durante 30 min (Thorlabs, Inc., nº Catálogo: M455L3). La luz de los LED es colimada por una lente plano-convexa con una longitud focal corta con el fin de maximizar la potencia de irradiación.

Ejemplo 2A. Ensayos de unión del complejo 1 a GMP

20

En primer lugar se estudió la capacidad del complejo **1** para metalar el guanosín monofosfato (GMP). Para ello, se mezcló el complejo **1** (250 μM) con 3 equivalentes de GMP (750 μM) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl. Tras 30 min a temperatura ambiente se observó la formación parcial (más del 50%) del complejo aquo
25 [Ru(terpy)(bpy)H₂O]²⁺ (**2**), mientras que el GMP permaneció esencialmente sin reaccionar (Figura 1, línea b). La incubación posterior de la muestra durante 2h dio lugar al producto metalado **3** y al complejo aquo **2**, con consumición total del complejo de cloro de partida (Figura 1, línea d). La irradiación de la muestra durante 30 min (λ = 455 nm) dio lugar a la formación exclusiva del monoadducto **3** (conversión de aproximadamente 80% en base a la
30 desaparición del GMP, Figura 1, línea c).

Para comprobar que la metalación del GMP es totalmente ortogonal, se llevaron a cabo experimentos competitivos con los otros tres nucleótidos (AMP, CMP y TMP). En concreto, se mezcló el complejo **1** (250 μM) con GMP (3 equiv, 750 μM), AMP (3 equiv, 750 μM), TMP
35 (3 equiv, 750 μM) y CMP (3 equiv, 750 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM

NaCl. Tras irradiar a 455 nm durante 30 min se observó la formación del complejo aquo $[\text{Ru}(\text{terpy})(\text{bpy})\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (**2**) y la modificación exclusiva del GMP dando lugar al monoadducto **3** (Figura 2).

- 5 También se comprobó la selectividad de la metalación del GMP en presencia de derivados de lisina y cisteína. Para ello, se mezcló el complejo **1** (250 μM) con GMP (3 equiv, 750 μM) en presencia de H-Lys(Boc)-OH (3 equiv, 750 μM) o de Ac-Cys-OH (3 equiv, 750 μM) en tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl. Tras irradiar a 455 nm durante 30 min se observó la modificación exclusiva del GMP dando lugar al monoadducto **3** (Figura 3).

10

Ejemplo 2B. Ensayos de unión del complejo 1 a c-MYC

Se trató una disolución 10 μM del cuádruplex paralelo de c-MYC d[TTGAG₃TG₃TAG₃TG₃TA₃] (SEQ ID NO: 1) con 5 equivalentes del complejo de rutenio **1** en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl y se irradió la mezcla durante 30 min (λ = 455 nm) a temperatura ambiente. Se observó la formación de un producto con la masa correspondiente al derivado monoadducto MYC-[Ru] con un 81% de conversión (Figura 4, línea c). También se observó reacción en ausencia de luz, con una conversión aproximada del 41% tras 30 min a temperatura ambiente (Figura 4, línea b).

20

Ejemplo 2C. Ensayos de unión del complejo 4 a GMP

Se mezcló el complejo **4** (250 μM) con 3 equivalentes de GMP (750 μM) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl. Tras 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad no se observó la formación de ningún producto nuevo (Figura 5, línea b). Sin embargo, cuando la muestra inicial se irradió durante 30 min (λ = 455 nm) se observó la formación exclusiva del monoadducto **3** (Figura 5, línea c).

30

Ejemplo 2D. Ensayos de unión del complejo 4 a c-MYC

Se trató una disolución 10 μM de cuádruplex c-MYC con 5 equivalentes del complejo de rutenio **4** en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl. La irradiación de la mezcla durante 30 min (λ = 455 nm) a temperatura ambiente dio lugar a la formación del producto MYC-[Ru] (Figura 6, línea c). Cuando la reacción se llevó a cabo en la oscuridad no se observó la formación de producto metalado tras 30 min (Figura 6, línea b).

35

Ejemplo 2E. Ensayos de unión del complejo 5 a GMP

Se mezcló el complejo **5** (250 μ M) con 3 equivalentes de GMP (750 μ M) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl. Tras 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad no se observó la formación de ningún producto nuevo (Figura 7, línea b). Sin embargo, cuando la muestra inicial se irradió durante 30 min (λ = 455 nm) se observó la formación exclusiva del monoadducto **3** (Figura 7, línea c).

10 Ejemplo 2F. Ensayos de unión del complejo 5 a c-MYC

Se trató una disolución 10 μ M de cuádruplex c-MYC con 5 equivalentes del complejo de rutenio **5** en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM KCl. La irradiación de la mezcla durante 30 min (λ = 455 nm) a temperatura ambiente dio lugar a la formación del producto MYC-[Ru] (Figura 8, línea c). Cuando la reacción se llevó a cabo en la oscuridad no se observó la formación de producto metalado tras 30 min (Figura 8, línea b).

Ejemplo 3. Hidrólisis del complejo [Ru]-Cl (1) a [Ru]-H₂O (2)

20 Se observó que el complejo **1** (250 μ M) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl evolucionaba lentamente al derivado aquo **2** en la oscuridad. Esta hidrólisis se acelera considerablemente mediante irradiación (λ = 455 nm), puesto que se observó conversión completa tras 30 min (Figura 9, línea c). La reacción del derivado aquo **2** (250 μ M) con 3 equivalentes de GMP (750 μ M) en un tampón fosfato 10 mM (pH = 7,5) y 100 mM NaCl en la oscuridad dio lugar a un 63% de conversión tras 30 min (Figura 10, línea b). La irradiación con luz (λ = 455 nm) aceleró el proceso dando lugar a un conversión total tras 30 min (Figura 10, línea c).

Ejemplo 4. Determinación de los niveles de expresión de c-MYC

30

Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las líneas celulares se cultivaron en DMEM suplementado con 10% (v /v) de FCS (“fetal calf serum”, Gibco), penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 U/mL). Los cultivos celulares se mantuvieron en un 5% de CO₂, humedad y 37 °C.

5 PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Se sembraron 3x10⁵ células HeLa (línea celular de cáncer cervical) o Vero (línea celular epitelial renal) por pocillo en placas de 6 pocillos. Después de un día, se añadieron al medio de cultivo celular los compuestos en ensayo y se incubaron las células durante 16 h o 48 h. El ARN total se extrajo con un kit comercial (RNeasy Mini Kit de Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se cuantificó en un Nanodrop ND-1000. Cantidades iguales de ARN se emplearon en la qRT-PCR (GoTaq 1-Step RT-qPCR System de Promega) en un equipo CFX96 Real Time System (Bio-Rad). Los cebadores utilizados fueron: c-MYC: sentido: 5'-CTG AGG AGG AAC AAG AAG ATG AG-3 ' (SEQ ID NO:2), antisentido: 5'-TGT GAG GA GGT TTG CTG TG-3' (SEQ ID NO:3); ALAS: sentido: 5'-GTT TGG AGC AAT CAC CTT CG-3 ' (SEQ ID NO:4), antisentido: 5'-ACC CTC CAA CAC AAC AAC AG-3' (SEQ ID NO:5); GAPDH: sentido: 5'-GGT GTG AAC CAT GAG AAG TAT GA-3 ' (SEQ ID NO:6), antisentido: 5'-GAG TCC TTC GAT CAC CAC AAA G-3 ' (SEQ ID NO:7).

Western blot

20 Se incubaron células HeLa a una confluencia del 50% en presencia de las concentraciones indicadas de los agentes ensayados durante 16 h. Las células se lisaron en tampón Laemli de SDS-PAGE y se sometieron a SDS-PAGE y Western-blot de acuerdo con procedimientos estándar. La proteína c-MYC se detectó mediante un anticuerpo anti-MYC (Santa-Cruz Biotechnologies). Para la detección de señal de la proteína inmunorreactiva se siguió un método de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences).

ICP-MS (“Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry”, Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente)

30 Las células HeLa se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3x10⁵ células por pocillo. Al día siguiente se añadió al medio de cultivo celular el complejo **1** en concentración 100 µM y las células se incubaron durante 16 h. Las células fueron lavadas dos veces con medio fresco y se lisaron en 70% HNO₃/H₂O. Las muestras se diluyeron a un volumen total de 3 mL de agua y se analizaron por ICP-MS (7700x Agilent).

35 Ensayos citotoxicidad (MTT)

Se sembraron 4000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 h. Se añadieron al medio de cultivo diferentes concentraciones de los agentes ensayados y las células se dejaron en el incubador durante 72 h adicionales. A continuación, se añadió MTT a una concentración final de 0,5 mg/ml y se incubó durante 4 h. Las células se lisaron y los precipitados de formazan se solubilizaron mediante la adición de un volumen de una disolución de solubilización que contiene HCl 0,1 M y 10% de SDS en agua. Se determinó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Tecan Infinito F200 Pro.

Fraccionamiento celular

10 Las células HeLa se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células por pocillo. Al día siguiente, se añadió al medio de cultivo celular el complejo 1 en concentración 100 μ M y se incubaron las células durante 16 h. Se siguió el siguiente protocolo para el aislamiento nuclear: las células se lavaron con PBS y se sedimentaron por centrifugación. A continuación, se resuspendieron en tampón de lisis celular [HEPES 10 mM; pH = 7,5, KCl 10
15 mM, EDTA 0,1 mM, ditioneitol 1 mM (DTT) y 0,5% Nonidet-40] y se dejaron sobre hielo durante 15-20 min, mezclándose de modo intermitente. Los tubos se agitaron vigorosamente para romper las membranas celulares y después se centrifugó a 12.000 g a 4 °C durante 10 min. Se confirmó la integridad de los núcleos depositados mediante microscopía de contraste de fase en un equipo Nikon Eclipse TiE. La fracción de sobrenadante que contiene
20 el citoplasma y el sedimento que contenía los núcleos se homogeneizaron en 70% HNO₃/H₂O y se analizaron mediante ICP-MS como se describió anteriormente. Para la extracción de la cromatina, se empleó un kit comercial (Chromatin Extraction kit, Abcam). La cromatina aislada se resuspendió en 70% HNO₃/H₂O y se analizó mediante ICP-MS.

25 Resultados

Los inventores analizaron el efecto de los complejos de la invención en los niveles de expresión del oncogén *c-MYC*, tanto a nivel de expresión de mensajero como a nivel de expresión de proteína.

30

Las Figuras 11 y 12 muestran los datos de expresión de ARN mensajero en células HeLa y Vero, respectivamente. Se empleó como control la porfirina TMPyP4, un compuesto que se une a un cuádruplex de guanina e inhibidor de la expresión de *c-MYC*.

Como se muestra en la Figura 11, las células HeLa tratadas con el complejo **1** (100 μ M) en DMEM, mostraron un aumento moderado pero significativo en la transcripción de *c-MYC* con respecto a las células no tratadas (80% a las 16 h y 200% en 48 h). De acuerdo a lo esperado, el tratamiento alternativo con TMPyP4 condujo a una disminución del 60% en los niveles celulares de ARNm de *c-MYC* después de 48 h.

La Figura 11 muestra los datos de expresión de proteína *c-MYC*. En conformidad a lo observado en relación con los niveles de mensajero, el tratamiento de las células con una concentración 100 μ M del complejo **1**, dio lugar a un notable aumento en los niveles de *c-MYC* (Figura 11, un promedio de 40% de aumento).

Estos datos confirman que, a diferencia de la mayoría de los agentes dirigidos a cuádruplex, el complejo **1** promueve un aumento en lugar de una disminución en el nivel de expresión génica, actuando así como un activador transcripcional.

El análisis mediante ICP-MS de núcleos aislados y de cromatina obtenidos después del tratamiento con el complejo **1** confirmaron la presencia de cantidades relativamente importantes de rutenio, en consonancia con una captación celular eficiente y transporte nuclear de los complejos, tal como se recoge en las Tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1. Análisis ICP de extractos celulares

Muestra	Concentración (μ g/L)	Desviación estándar relativa
Blanco (HNO ₃ 20%)	0,0190	8,8148
Células control	0,0955	9,9068
Células tratadas con el complejo 1	50,1941	1,9250

Tabla 2. Análisis ICP de extractos celulares

		Concentración Ru (pmol)	Desviación estándar relativa
Complejo 1	Cromatina	29,49	11,95
	Núcleo	59,45	21,39
	Citoplasma	290,03	106,95
Control	Cromatina	1,85	1,46
	Núcleo	1,87	1,27
	Citoplasma	9,39	6,34

Por otro lado, los ensayos de viabilidad celular confirmaron que el complejo **1** es esencialmente no citotóxico (Figura 13).

5 En relación a los complejos activados por luz (complejo **5**), el análisis de la expresión de ARN mensajero del gen *c-MYC* mediante qRT-PCR mostró que los niveles de ARN aumentaron tras la irradiación, siendo similares a los observados con el complejo **2** (aquo). El análisis de expresión proteica mediante *Western blot* confirmó que el aumento de expresión proteica de *c-MYC* tenía lugar en presencia de luz, y que los niveles de la proteína
 10 no cambiaban en oscuridad (Figuras 14 y 15). Por otro lado, el complejo **2** es activo tanto en oscuridad como al ser irradiado. Experimentos adicionales confirmaron la ausencia de efecto sobre la viabilidad celular debida a la radiación (Figura 16).

Ejemplo 5. Ensayos en células madre de cáncer de páncreas

15

El adenocarcinoma pancreático es un cáncer de páncreas en el que se tiene una población heterogénea de células tumorales, incluyendo una subpoblación de células madre cancerosas (CMC).

20 Los inventores aislaron CMC y no-CMC a partir de 6 tumores primarios derivados de pacientes mediante FACS (“fluorescence-activated cell sorting”). Se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento del ARN (RNAseq). Los análisis de RNAseq para la población CMC en comparación con la población no-CMC correspondiente generaron una lista de genes diana en base a elementos comunes y su expresión diferencial. De los genes
 25 regulados negativamente, se identificó *c-MYC* como considerablemente expresado a la baja en la subpoblación CMC en los 6 tumores. Cabe destacar que una regulación a la baja de *c-MYC* es contraria a lo comúnmente caracterizado para *c-MYC* en diversos tumores. Sin embargo, los inventores han descubierto que la expresión de *c-MYC* está regulada diferencialmente en CMC en comparación con sus equivalentes más diferenciados.

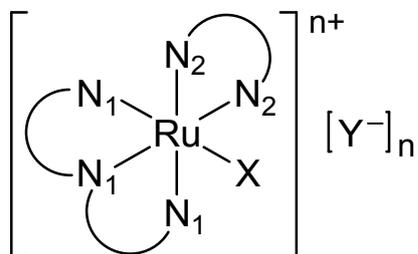
30

Los inventores analizaron si el complejo **1** podría, por un lado, aumentar la expresión *c-MYC* en CMC pancreáticas y, por otro lado, si el aumento de expresión *c-MYC* afectaría negativamente al fenotipo de CMC, por ejemplo a su capacidad de autorrenovación. Con este objetivo, se cultivaron células de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC)
 35 establecidas a partir de xenoinjertos derivados de pacientes con un número bajo de pasajes,

se trataron con el complejo de rutenio **2** (RuH_2O) en concentración 100 y 250 μM durante 6, 12 o 24 horas, y se evaluó la expresión de proteína c-MYC mediante Western blot. La Figura 17(A) muestra que la expresión de c-MYC aumentó después del tratamiento, y que el efecto fue más marcado a las 24 horas post-tratamiento. Después de haber logrado un aumento sustancial en la expresión de c-MYC, se analizó a continuación si la capacidad de auto-renovación de CMC se vio afectada. Para ello, brevemente, las células PDAC se pre-trataron dos veces con el complejo **2** (RuH_2O) en concentración 100 y 250 μM antes de establecer cultivos de esfera en placas de ultra adherencia tal como se describe en Cioffi M (Cioffi M et al. 2015 Gut 12: 1936-1948). Las esferas fueron tratadas de nuevo en el día 4 post-formación de esferas. Como se muestra en la Figura 17(B), se observó una reducción significativa y dependiente de la dosis en la capacidad de formación de esferas de células PDAC tratadas con el complejo **2** (RuH_2O) en comparación con los cultivos control. Estos datos confirman la hipótesis de los inventores en cuanto a que el aumento de expresión de c-MYC crea un estado intracelular que influye negativamente en las propiedades funcionales de las células madre cancerosas PDAC, tales como la auto-renovación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un complejo de rutenio de fórmula (I)



5

(I)

en donde

$\text{N}_1\text{-N}_1\text{-N}_1$ representa un ligando aza-aromático N,N,N-tridentado;

$\text{N}_2\text{-N}_2$ representa un ligando aza-aromático N,N-bidentado;

X se selecciona de OH_2 , Cl, Br, I y SR_1R_2 ;

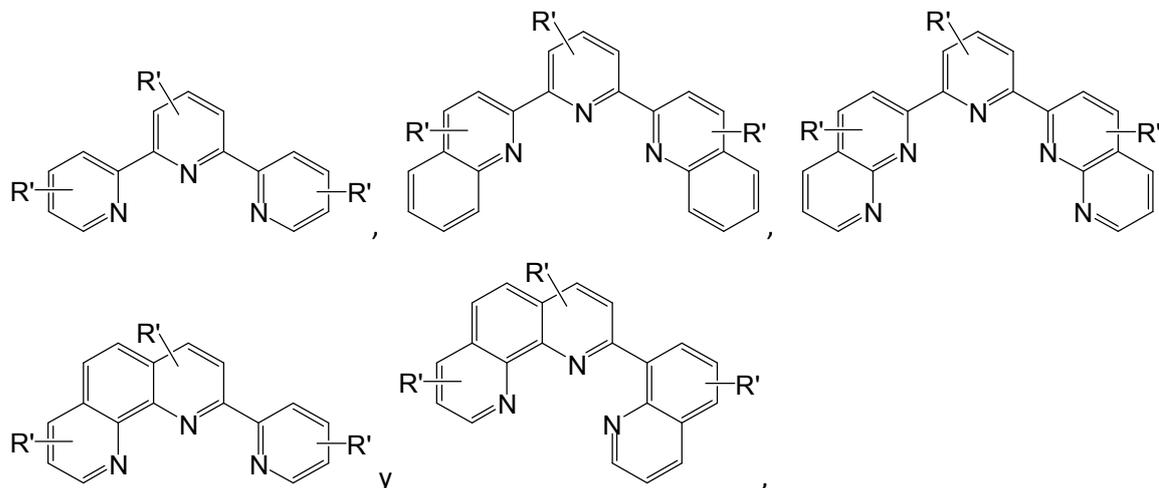
- 10 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{12}$ opcionalmente sustituido;

Y^- es un anión monovalente; y

n es 1 o 2;

para preparar un medicamento para el tratamiento de cáncer.

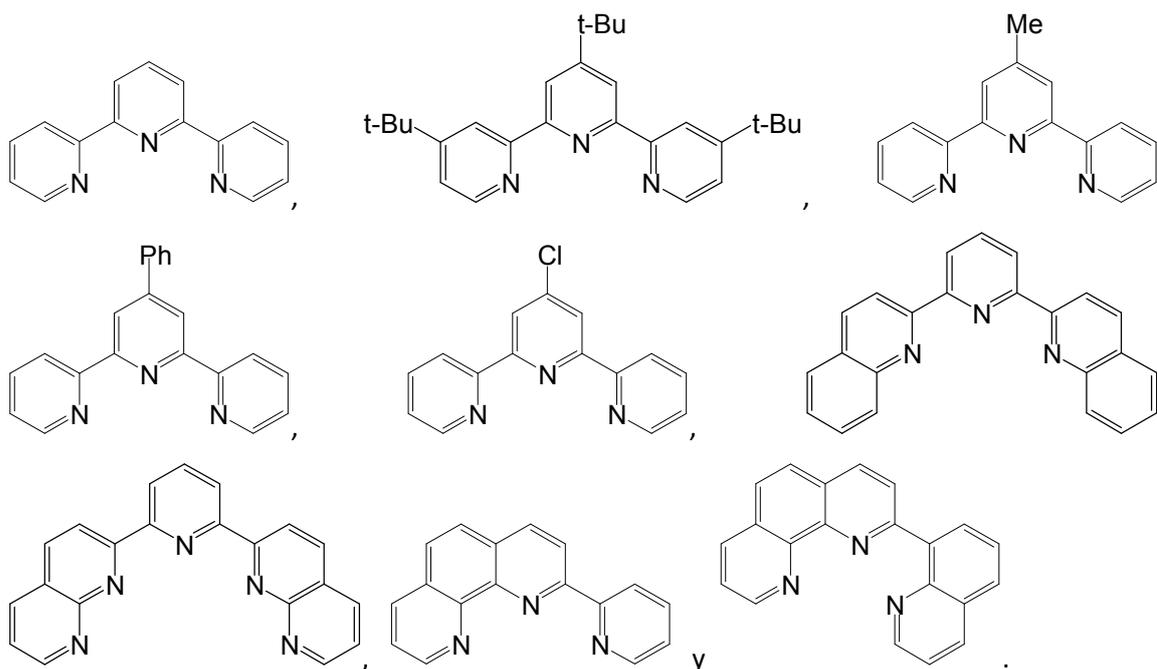
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, en donde $\text{N}_1\text{-N}_1\text{-N}_1$ se selecciona del grupo formado por:



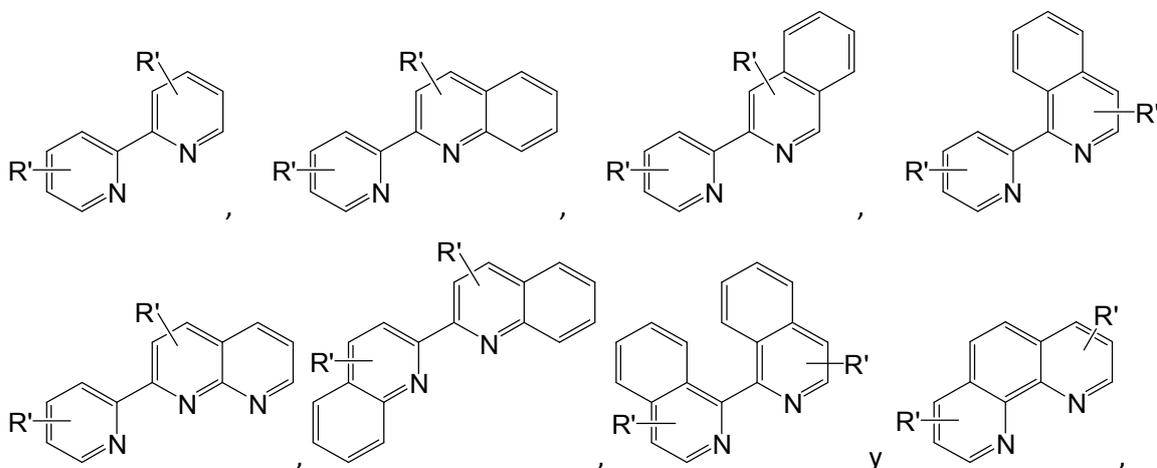
20

en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ opcionalmente sustituido, arilo $\text{C}_6\text{-C}_{14}$ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

3. Uso según la reivindicación 2, en donde $\text{N}_1\text{-N}_1\text{-N}_1$ se selecciona del grupo formado por:

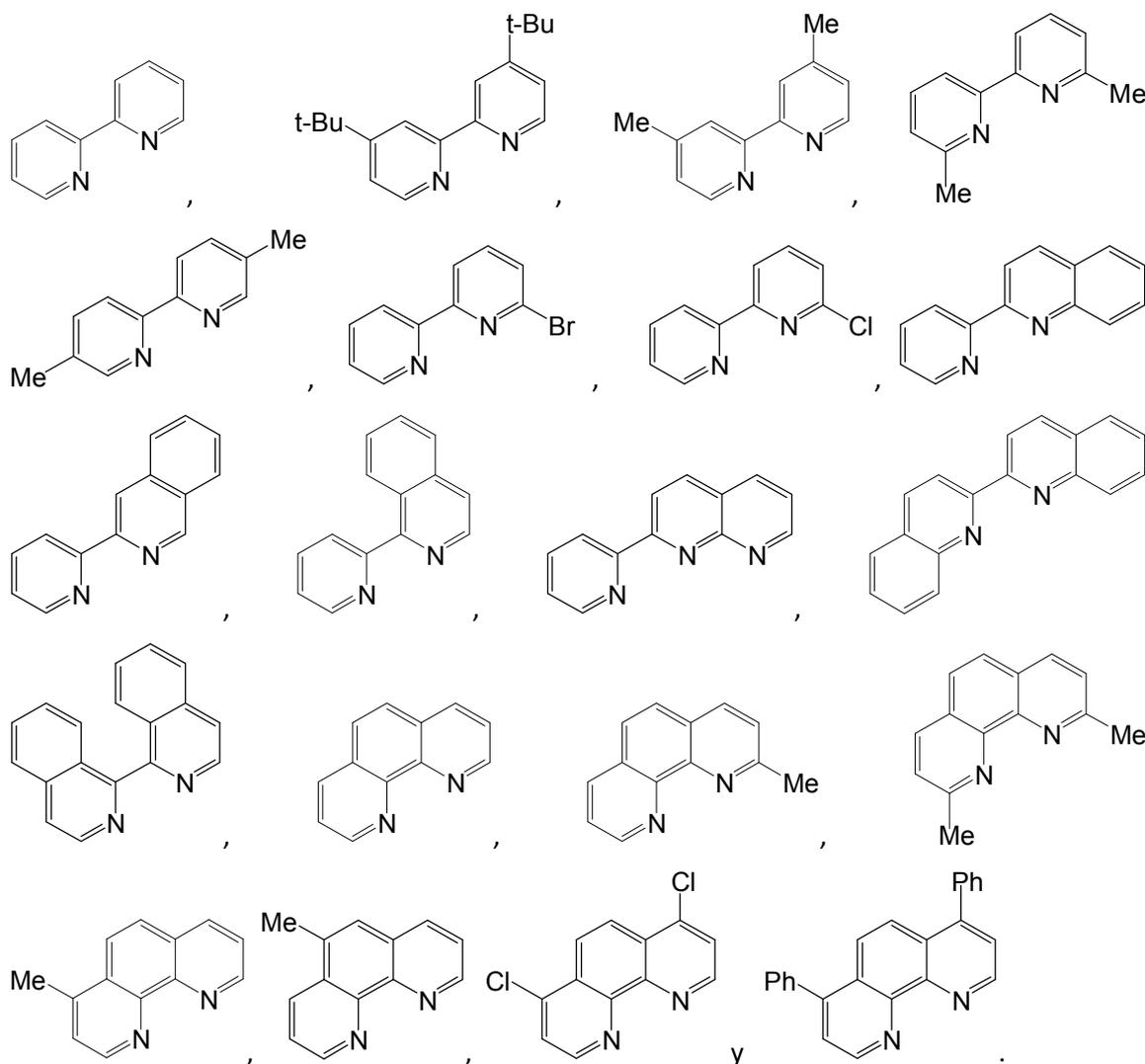


- 5 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde N_2-N_2 se selecciona del grupo formado por:

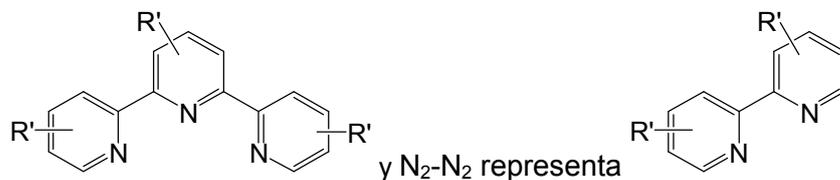


- 10 en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, arilo C_6-C_{14} opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

5. Uso según la reivindicación 4, en donde N_2-N_2 se selecciona del grupo formado por:

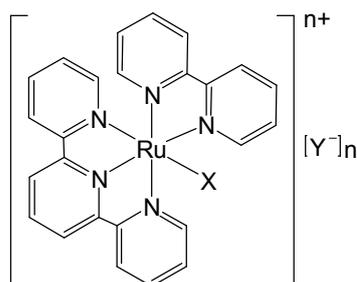


6. Uso según la reivindicación 1, en donde $N_1-N_1-N_1$ representa



selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, arilo C_6-C_{14} opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el complejo de rutenio presenta la siguiente fórmula:



en donde

X se selecciona de OH₂, Cl, Br, I y SR₁R₂;

R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido;

5 Y⁻ es un anión monovalente; y

n es 1 o 2.

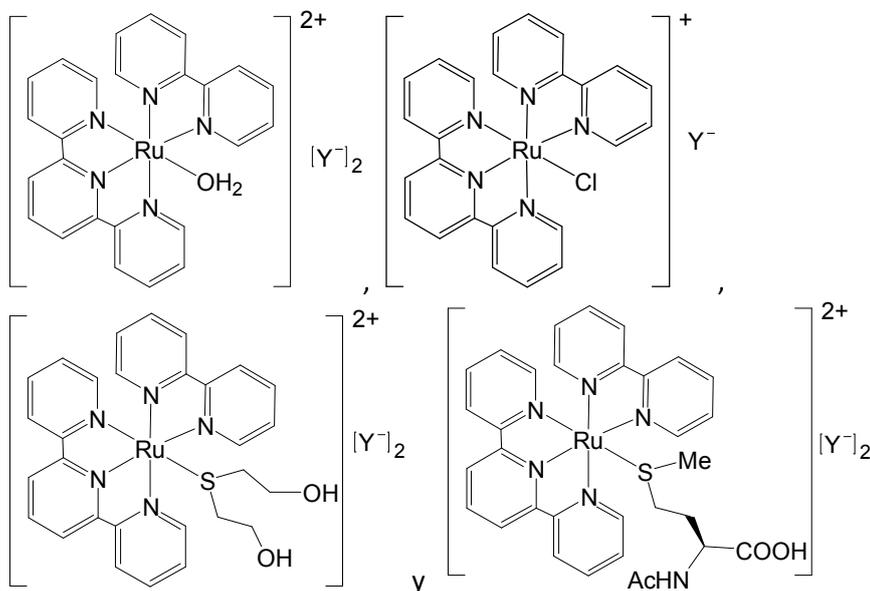
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde X representa OH₂ y n es 2.

10

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde X representa SR₁R₂, donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de halógeno, OR'', N(R'')₂, N(R'')COR'', CN, NO₂, COR'', CO₂R'', OCOR'', OCO₂R'', OCONHR'', OCON(R'')₂, CONHR'', CON(R'')₂, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄, y heterociclilo de 3 a 10 miembros.

15

10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el complejo de rutenio se selecciona del grupo formado por:



20

en donde Y^- es un anión monovalente.

- 5 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde Y^- se selecciona del grupo formado por PF_6^- , Cl^- , Br^- , BF_4^- , $CF_3SO_3^-$, $CH_3SO_3^-$ y $CH_3C_6H_4SO_3^-$.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el cáncer es un cáncer que comprende células madre cancerosas.
- 10 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el cáncer se selecciona de carcinoma de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer cervical y cáncer renal.
- 15 14. Uso según la reivindicación 13, en donde el cáncer es cáncer de páncreas preferiblemente adenocarcinoma de páncreas.

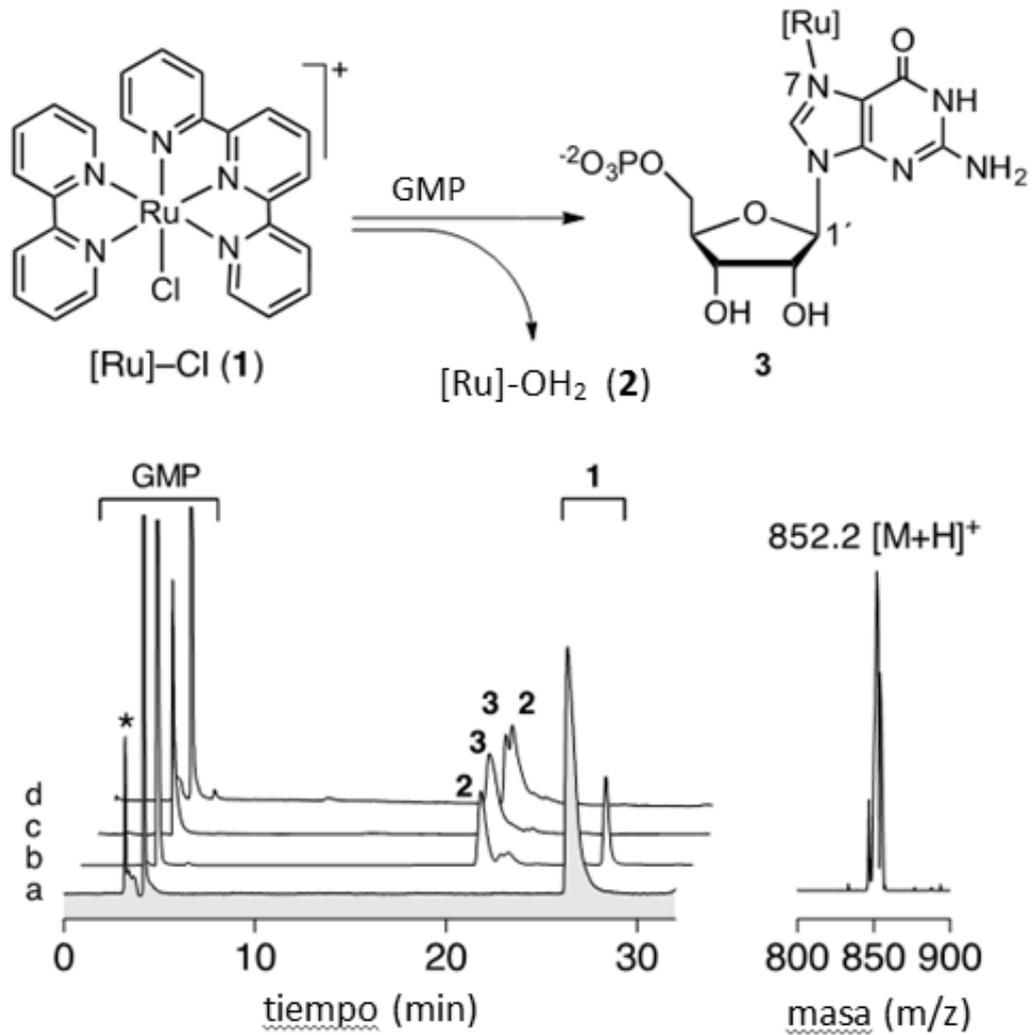


Fig. 1

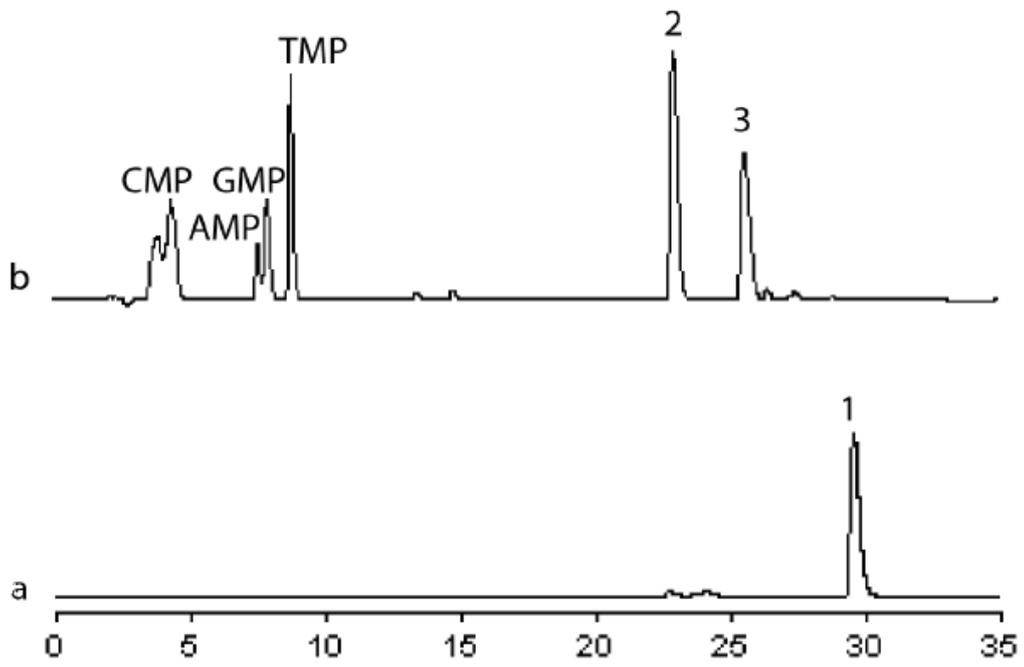


Fig. 2

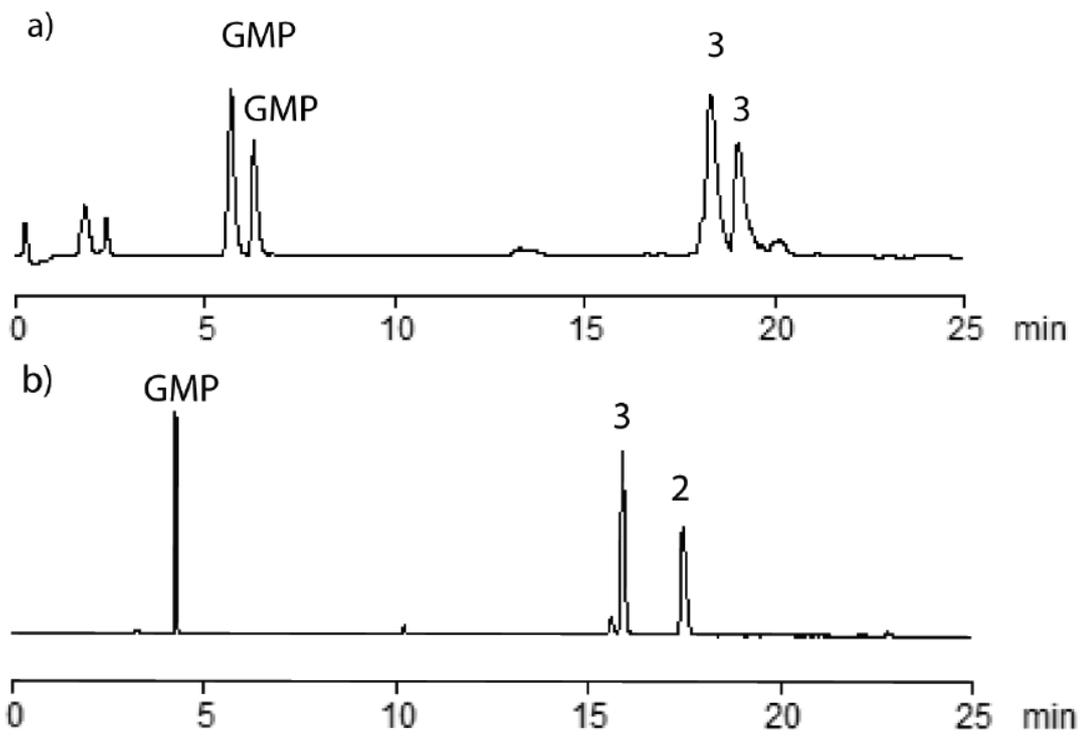


Fig. 3

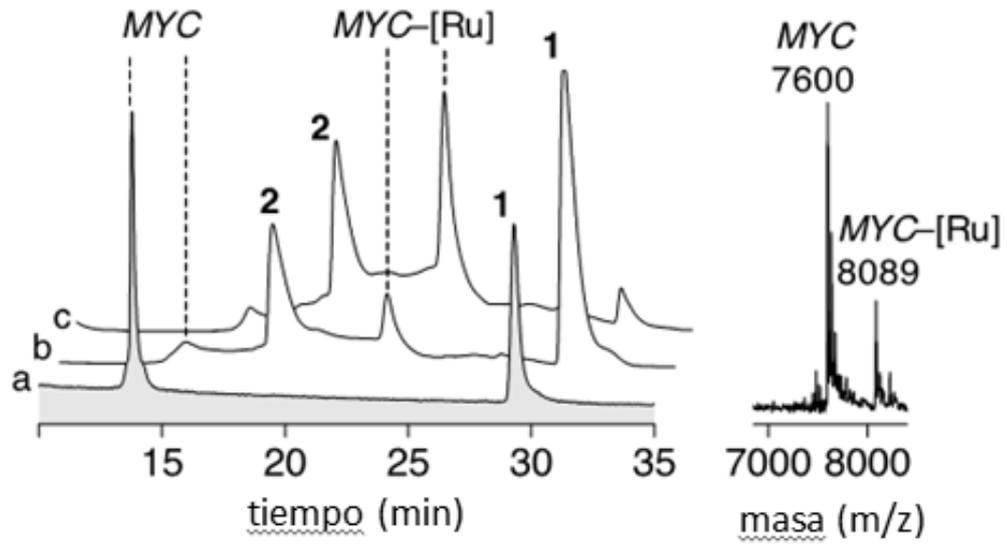


Fig. 4

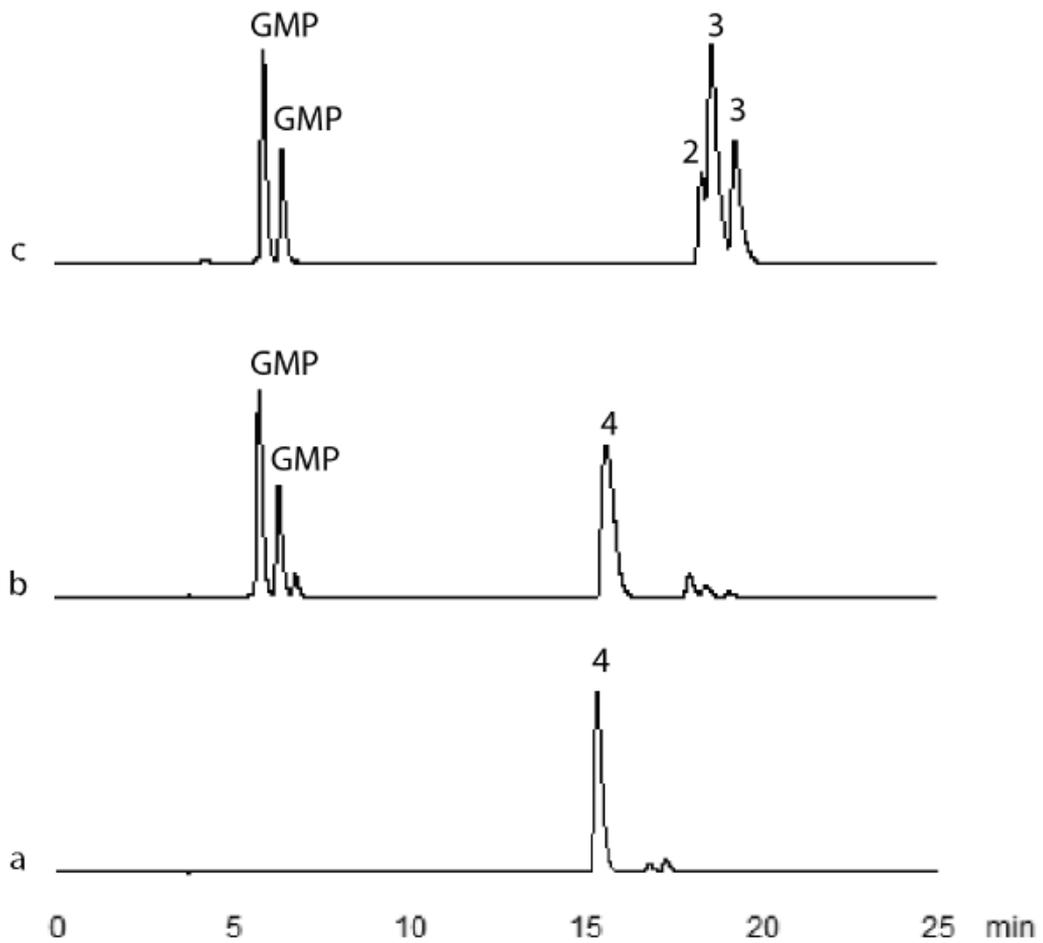


Fig. 5

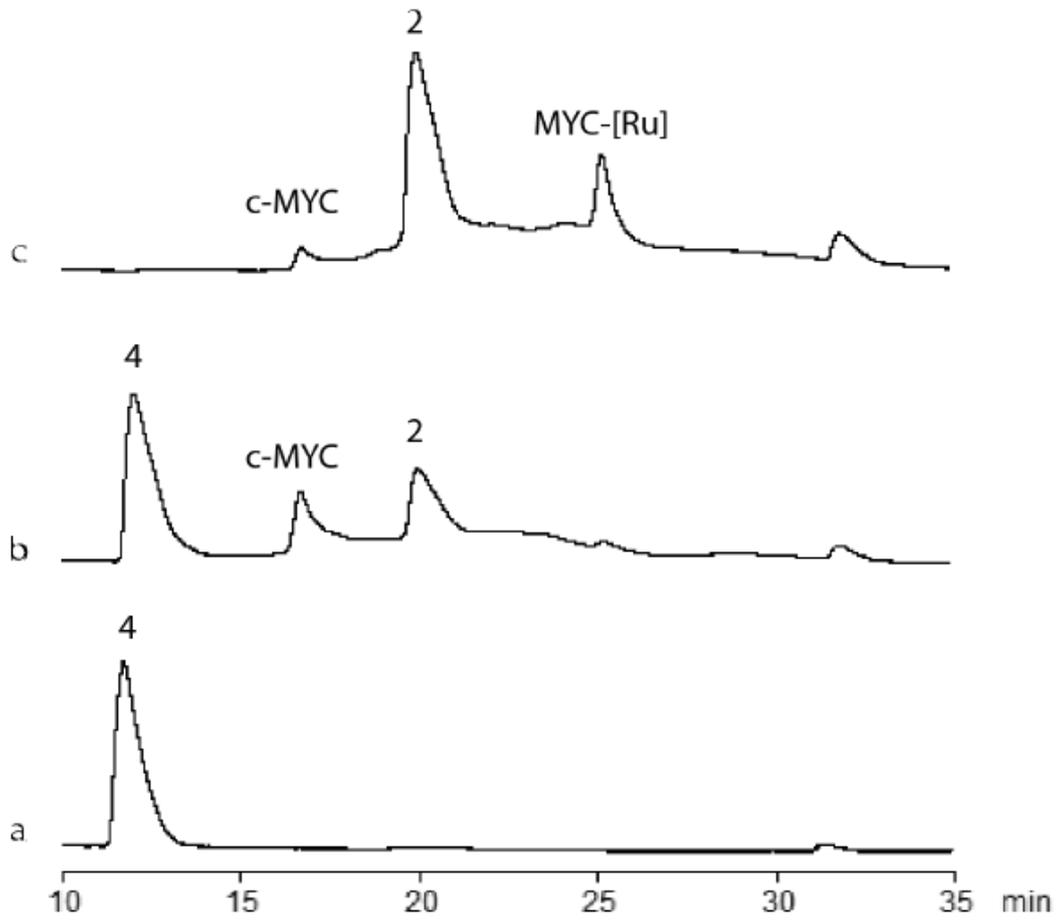


Fig. 6

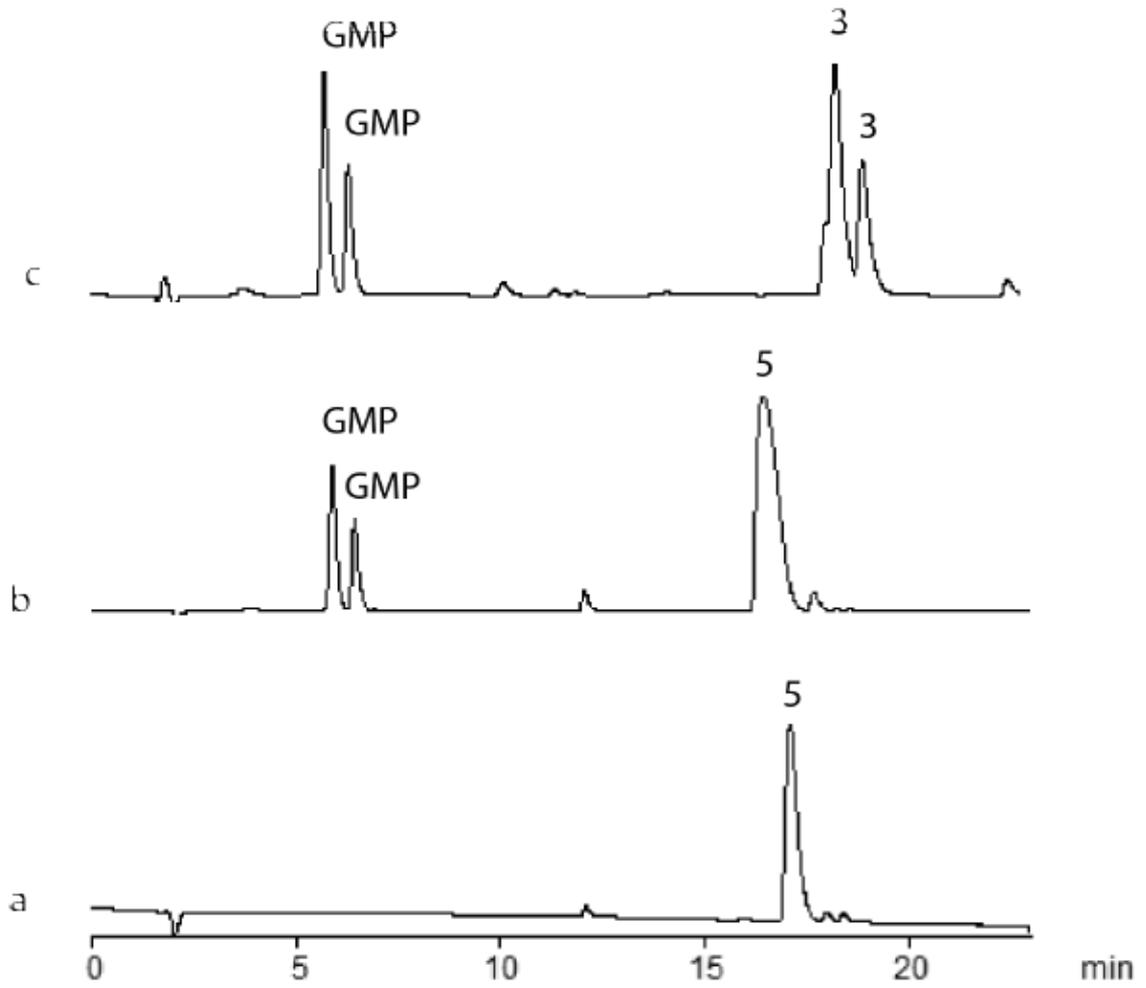


Fig. 7

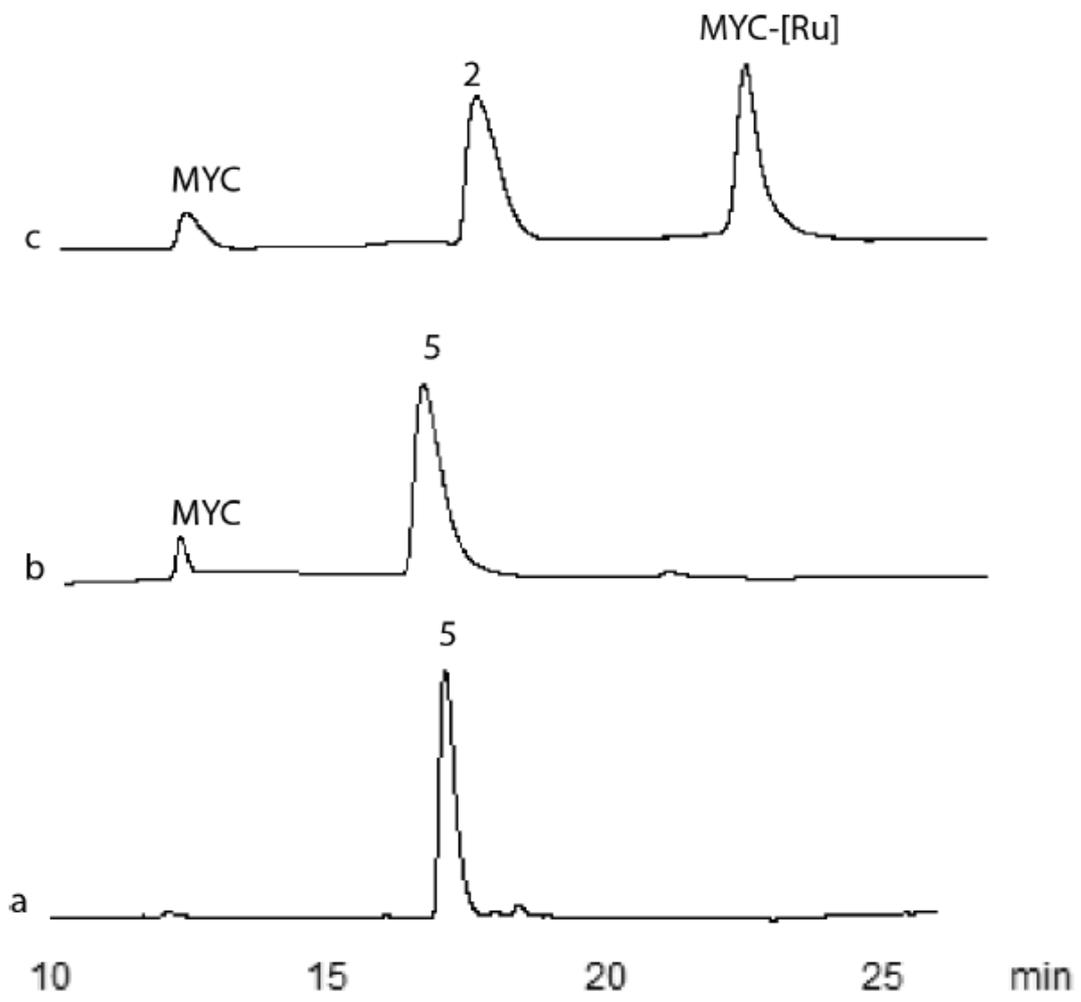


Fig. 8

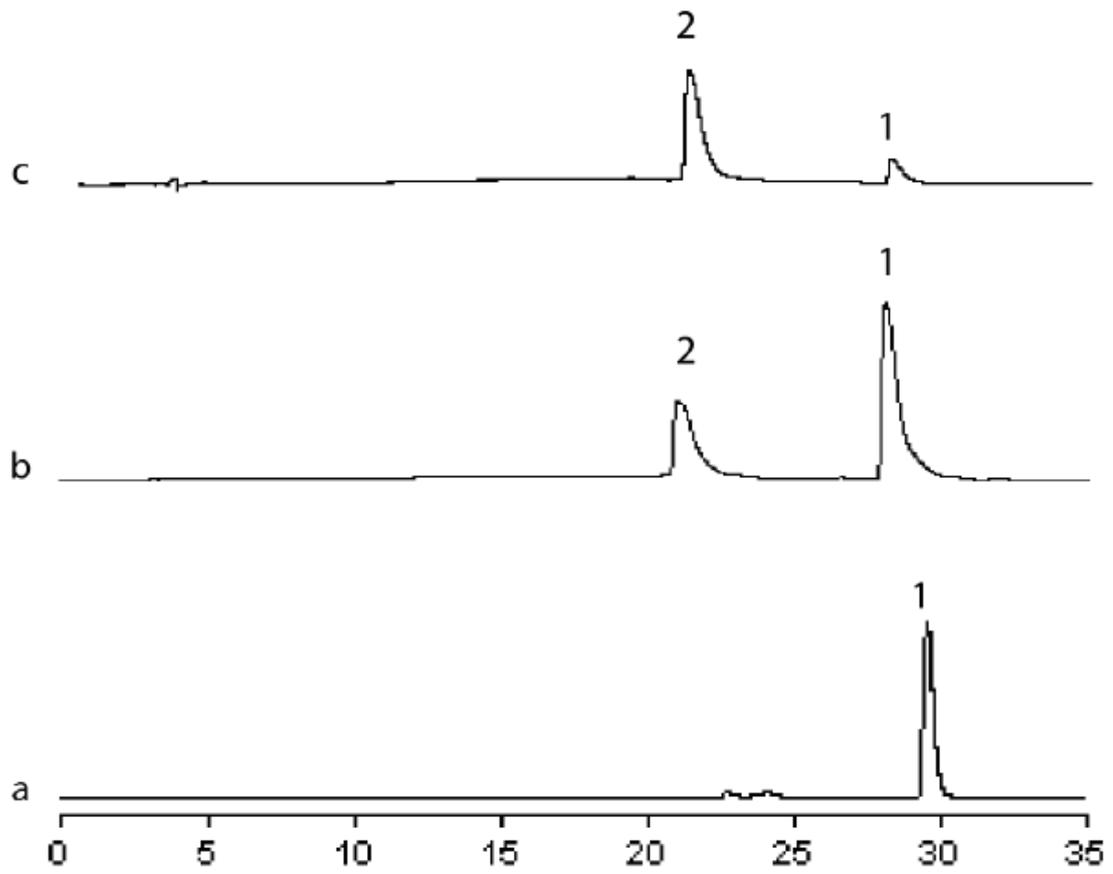


Fig. 9

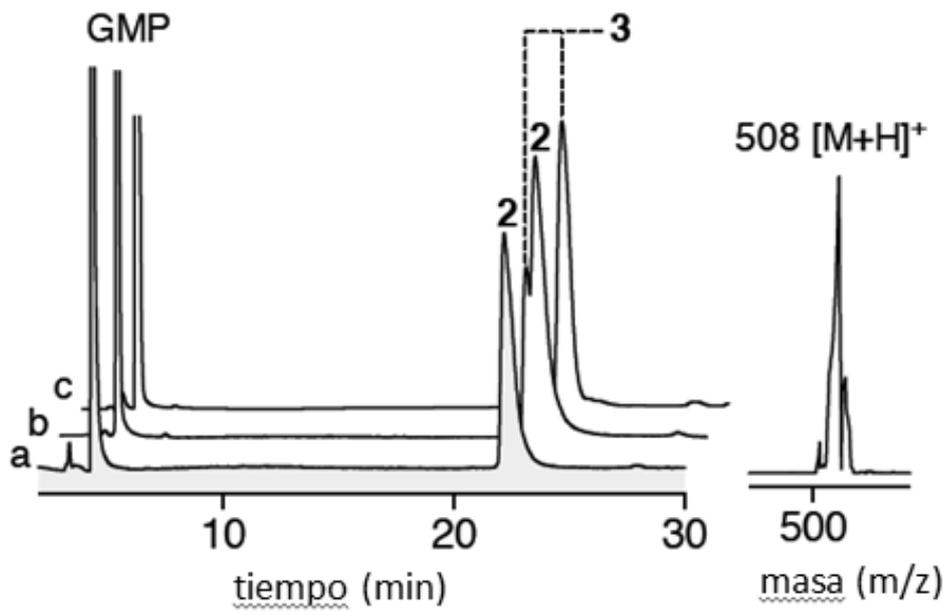


Fig. 10

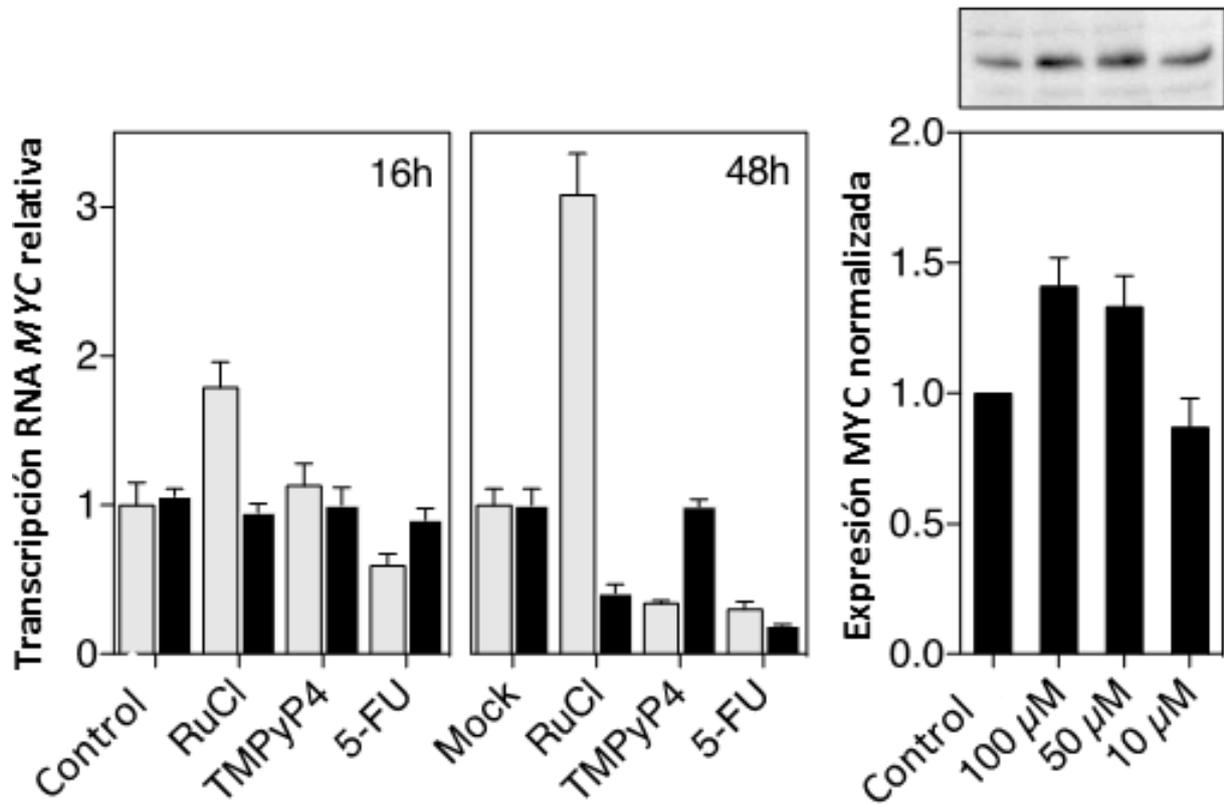


Fig. 11

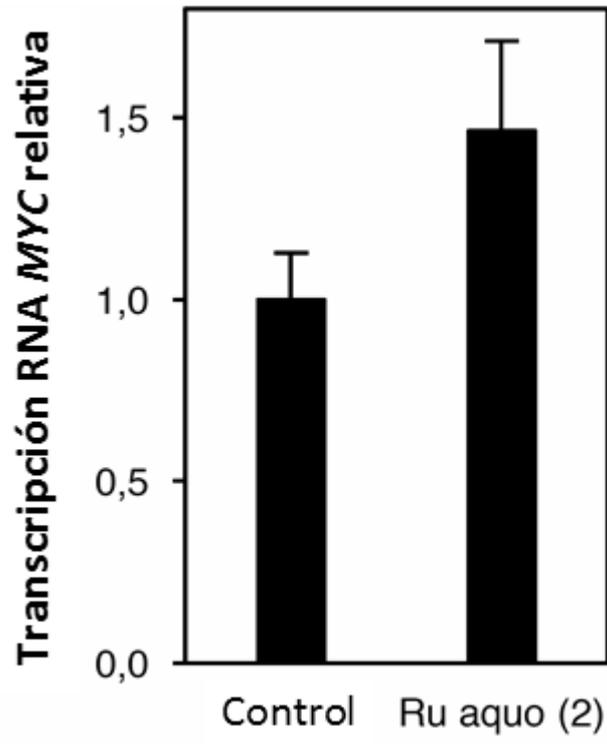


Fig. 12



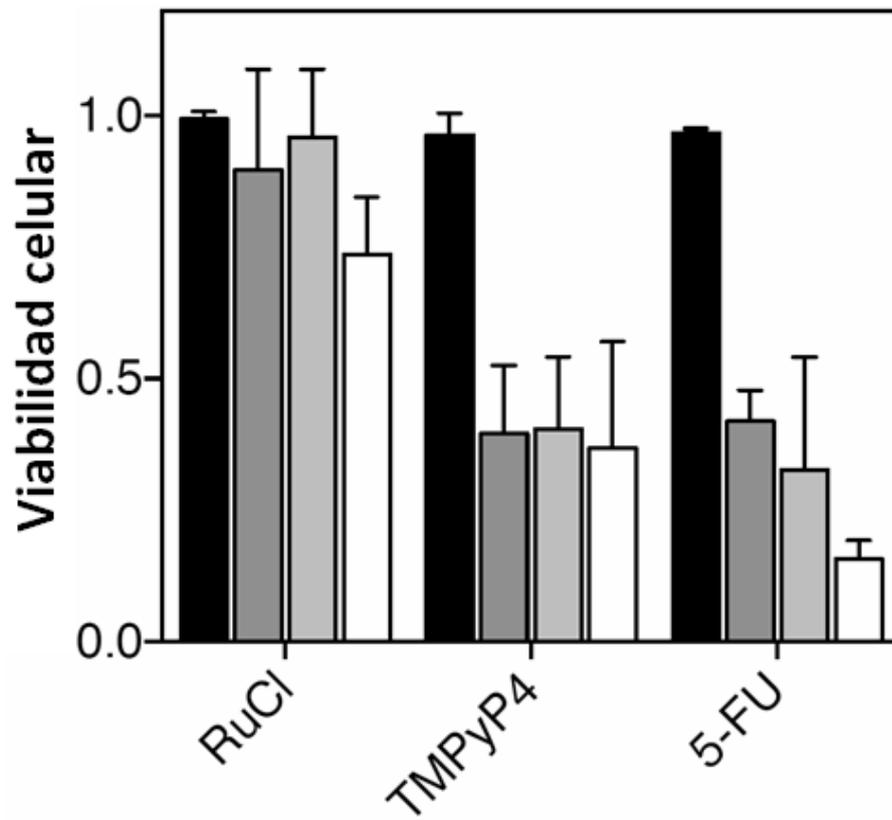


Fig. 13

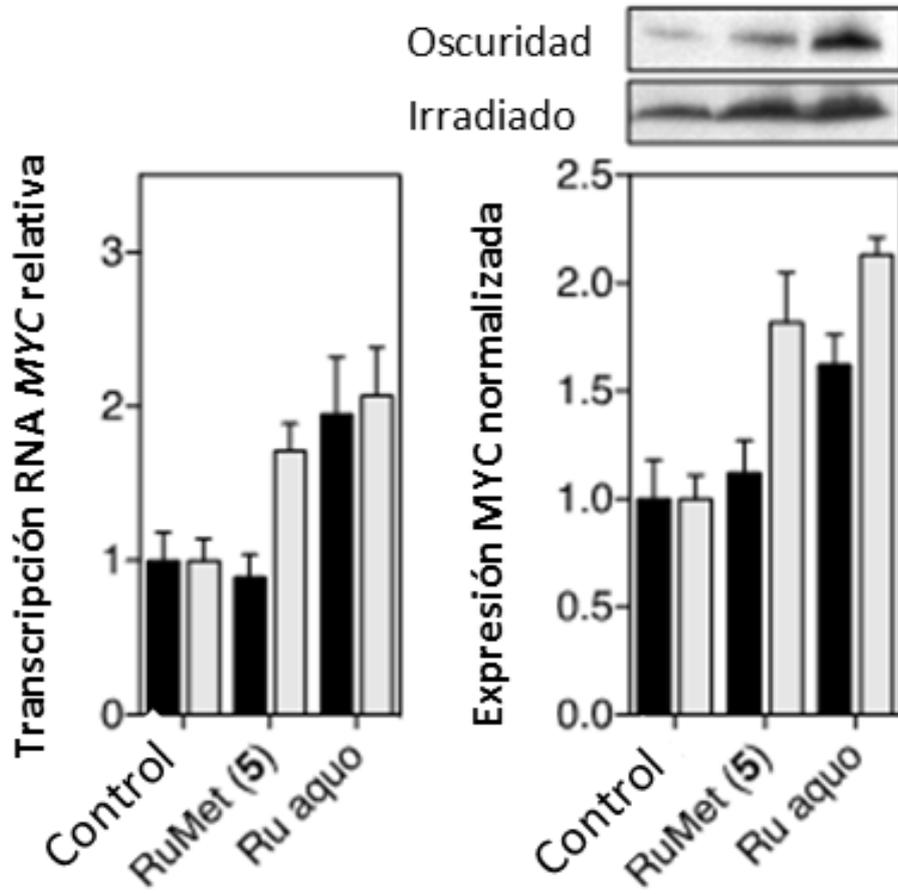


Fig. 14



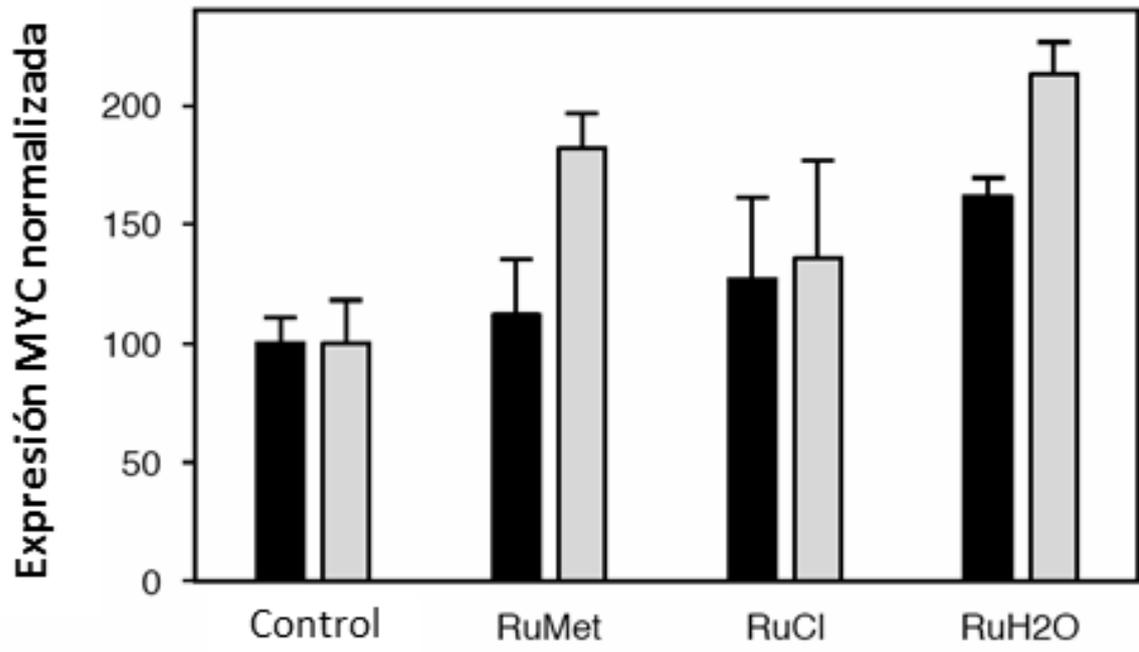


Fig. 15

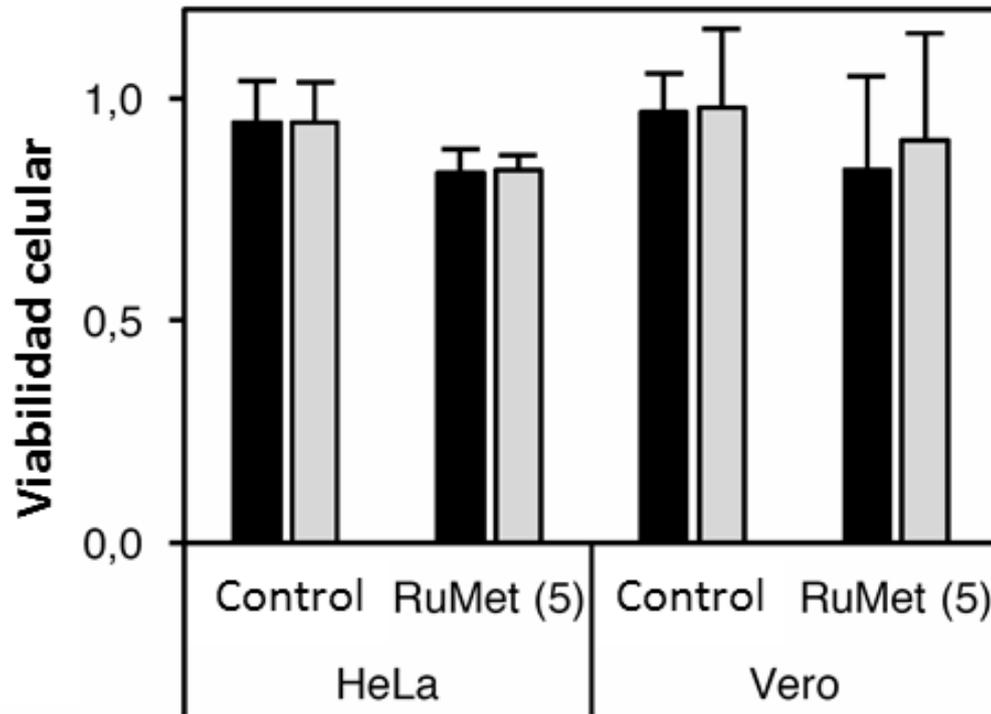


Fig. 16

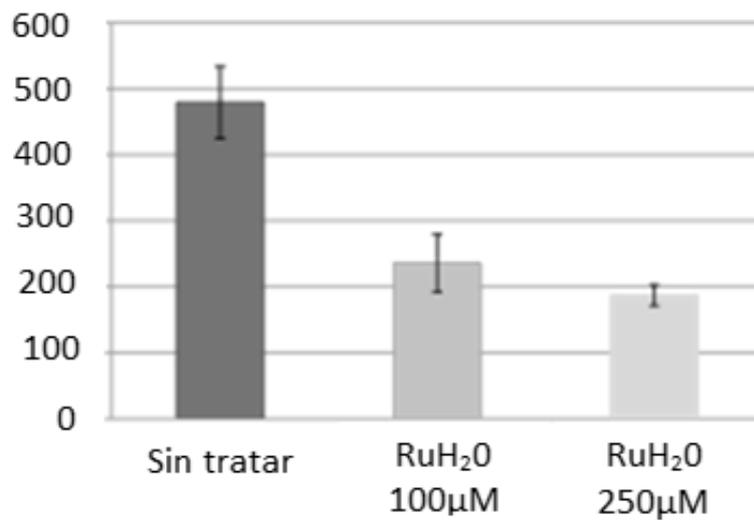
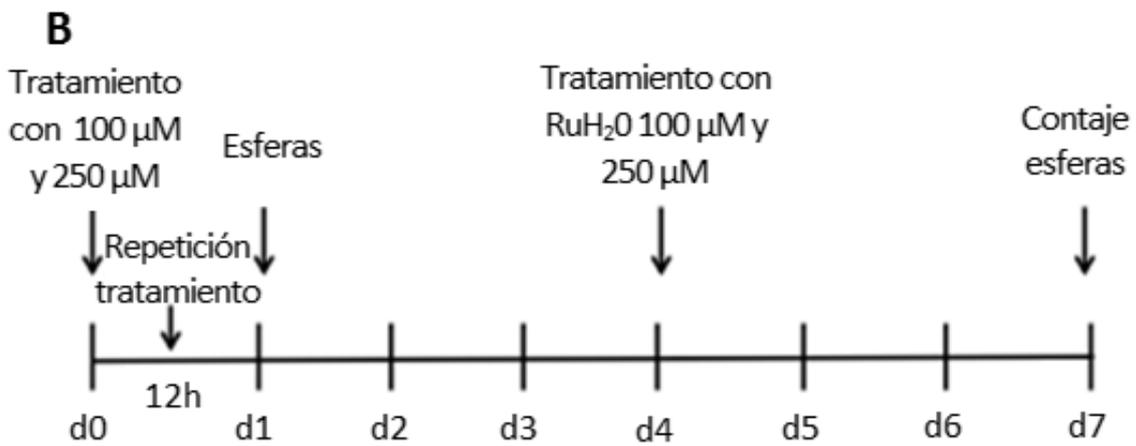
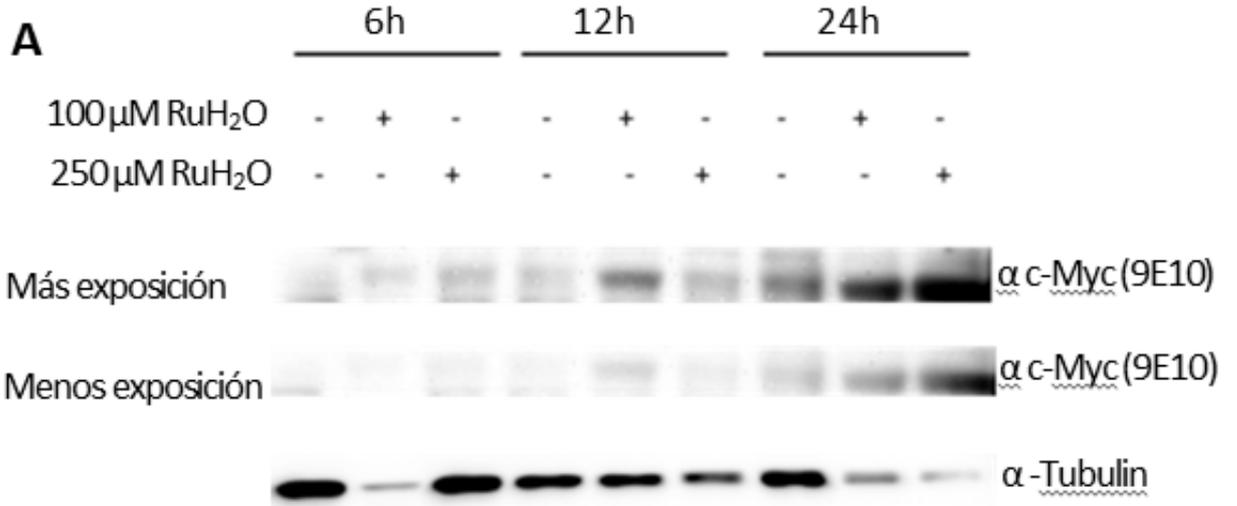


Fig. 17

ES 2 594 499 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Universidade de Santiago de Compostela
Universidad Autónoma de Madrid
- 5 <120> Complejos de Rutenio para el tratamiento del cáncer
- <130> P13928ES00
- 10 <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- 20 <223> Cuádruplex c-Myc
- <400> 1
ttgagggtgg gtagggtggg taaa 24
- 25 <210> 2
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- 30 <220>
- <223> Cebador c-MYC sentido
- <400> 2
- 35 ctgaggagga acaagaagat gag 23
- <210> 3
- <211> 19
- 40 <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Cebador c-MYC antisentido
- 45 <400> 3
- tgtgaggagg tttgctgtg 19
- 50 <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- 55 <220>
- <223> Cebador ALAS sentido

ES 2 594 499 A1

<400> 4
gtttgagca atcaccttcg 20

5 <210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Cebador ALAS antisentido

<400> 5
accctccaac acaacaacag 20

15

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cebador GAPDH sentido

25 <400> 6
ggtgtgaacc atgagaagta tga 23

<210> 7
30 <211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Cebador GAPDH antisentido

<400> 7
gagtccttcg atcaccacaa ag 22



- ②① N.º solicitud: 201631426
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.11.2016
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07F15/00** (2006.01)
A61K31/555 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	R E Goldbach et al, Chemistry European Journal 2011, vol 17, pp 9924-9929. "N-Acetylmethionine and biotin as photocleavable protective groups for ruthenium polypyridyl complexes", esquema 1 página 9924	1-14
A	Ying Liu et al, MedChemCommun. 2014, vol 5, pp 1724-1728. "Stabilization for loop isomers of c-myc G-quadruplex DNA and anticancer activity by ruthenium complexes"	1-14
A	Lei He et al, Chemical Communications 2016, DOI: 10.1039/c6cc03117j. "Octahedral ruthenium complexes selectively stabilize G-cuadruplexes"	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
12.12.2016

Examinador
M. Fernández Fernández

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07F, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, REGISTRY, CAS, ESPACENET, PUBMED

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 12.12.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-14	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	R E Goldbach et al, Chemistry European Journal 2011, vol 17, pp 9924-9929. "N-Acetylmethionine and biotin as photocleavable protective groups for ruthenium polypyridyl complexes", esquema 1 página 9924	2011
D02	Ying Liu et al, MedChemCommun. 2014, vol 5, pp 1724-1728. "Stabilization for loop isomers of c-myc G-quadruplex DNA and anticancer activity by ruthenium complexes"	2014
D03	Lei He et al, Chemical Communications 2016, DOI: 10.1039/c6cc03117j. "Octahedral ruthenium complexes selectively stabilize G-cuadruplexes"	01/2016

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere al uso de los complejos de rutenio de fórmula general (I) de la reivindicación 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer, en las reivindicaciones 2-11 se concretan varios de estos compuestos y en las reivindicaciones 12-14 se especifica que el cáncer citado comprende células madre cancerosas y es preferentemente adenocarcinoma de páncreas.

El documento D1 divulga, ver esquema 1, complejos de rutenio comprendidos en la fórmula general (I) de la solicitud, en concreto los compuestos que se especifican en la reivindicación 10 se encuentran divulgados en dicho esquema 1 de D1, por lo que las reivindicaciones 1-11 carecen de novedad ya que la utilización de un compuesto implica disponer de dicho compuesto. También se divulga en D1, página 9924, la aplicación de este tipo de complejos para tratar células cancerosas, por lo que las reivindicaciones 12-14 carecen de novedad.

Los documentos D2 y D3 divulgan la selectividad de dos complejos de rutenio en la expresión del oncogen c-MYC (D2) y su actividad en la estabilización de los cuádruplex de guaninas (GQs) en D3. Se concluye que complejos de rutenio similares a los de la solicitud serían útiles en el tratamiento del cáncer aunque los complejos que se divulgan en D2 y D3 son distintos de los de la solicitud.

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-14 de la solicitud carecen de novedad y actividad inventiva según lo dispuesto en los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.