

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 653**

21 Número de solicitud: 201300949

51 Int. Cl.:

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

10.10.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.04.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (75.0%)

Plaza de San Diego, s/n

28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES y

UNIVERSITÉ ABDELMALEK ESSAADI (25.0%)

72 Inventor/es:

ELAMRANI, Mohammed Amin;

MUÑOZ MORENO, Laura;

ROYO CANTABRANA, Eva;

BAJO CHUECA, Ana M.;

CUENCA AGREDA, Tomás y

BENABDELAOUAHAB, Yosra

54 Título: **Complejos areno de Ru(II) con ligando oxima con actividad anticancerígena**

57 Resumen:

Complejos areno de Ru(II) con ligandos oxima con actividad anticancerígena.

La presente invención está relacionada con complejos areno de Ru(II) con ligandos oxima con actividad anticancerígena, de fórmula (1) ó (2), y que pueden ser utilizados en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

Para (1) y (2), R1 a R6 pueden ser haluro, H, alquilo o arilo, funcionalizados o no. R1 y R2 pueden también formar parte de un anillo saturado o insaturado, carbonado o heterocíclico de 3 a 8 miembros. P es un contra-anión. n puede ser 0, 1 ó 2. Z puede ser OH o O-. R1C y R2C pueden ser H, alquilos, alquénilos o alquínilos ramificados o lineales, cíclicos, heterocíclicos o acíclicos, cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido. Pueden también formar parte de hidrocarburos cíclicos o heterocíclicos, saturados, insaturados o aromáticos, de 3 a 8 miembros. Y puede ser un grupo amino o amido, L es el grupo de unión entre X e Y.

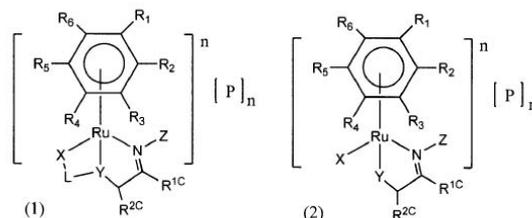


Figura 1

DESCRIPCIÓN

**COMPLEJOS ARENO DE Ru(II) CON LIGANDOS OXIMA CON ACTIVIDAD
ANTICANCERÍGENA****SECTOR DE LA TÉCNICA**

- 5 Las moléculas a las que se refiere la invención se encuadran dentro del sector químico y su aplicación, dentro de los campos de la medicina y la farmacia.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 En los últimos años se ha propuesto la utilización de ciertos complejos de Ru en el tratamiento y/o prevención del cáncer. Por ejemplo, U.S. Pat No. 10/520,239; WO 2007/101997 o WO 2004/096819 describen la preparación de derivados de Ru que poseen un ligando areno unido al rutenio así como otros ligandos, de diferente constitución, no areno, y su utilización como agentes anticancerígenos. Varios autores han revisado y publicado la acción, antimetastásica y citotóxica, de algunos complejos de rutenio
15 estudiados: Bergamo et al, J. Inorg. Biochem., 106, 2012, 90-99; W. Hang Ang et al: J. Organomet. Chem., 696, 2011, 968-998; M. Melchart and P. J. Sadler: in "Ruthenium Arene Anticancer Complexes", Bioorganometallics, Eds. By G. Jaouen, Wiley VCH, Verlag GmbH &Co. KGaA Winheim, 2006.

20 Chen et al (J. Am. Chem. Soc., 1124., 12, 2002, 3064) y Morris (J. Med. Chem., 44, 2001, 3621) describieron los mecanismos mediante los que Ru se enlaza a bases guanina y demostraron la importancia de la presencia de interacciones de hidrógeno en la selectividad que presentan los complejos de Ru cuando se enlazan a determinadas bases presentes en el ADN.

25 D. J. Brecknell y colaboradores publican la síntesis de nuevos sistemas orgánicos oxima (Aust. J. Chem., 1977, vol 30, pp.195-203). Otros sistemas similares han sido también publicados por Irako y colaboradores (Tetrahedron, vol 51, No46, pp. 12731-12744) y por M.S.I.ElAlami y colaboradores (Chirality, 24, 2012, 675-682), sin describir su actuación
30 como agentes antitumorales.

Mortreux y colaboradores publican la síntesis de tres nuevos derivados areno de rutenio con ligandos que poseen grupos oxima (M. S. I. El Alami, M.A. El Amrani, A. Dahdouh, P.

Roussel, I. Suisse and A. Mortreux. En "Chirality", 24, 2012, 675-682), aunque no se describe su actuación ni su estudio como agentes antitumorales.

5 Existe una necesidad de encontrar y estudiar complejos que puedan ser utilizados como alternativas a los conocidos hasta ahora, sobre todo en aquellos tumores que han mostrado resistencia a los fármacos más frecuentemente utilizados en quimioterapia, como el cisplatino.

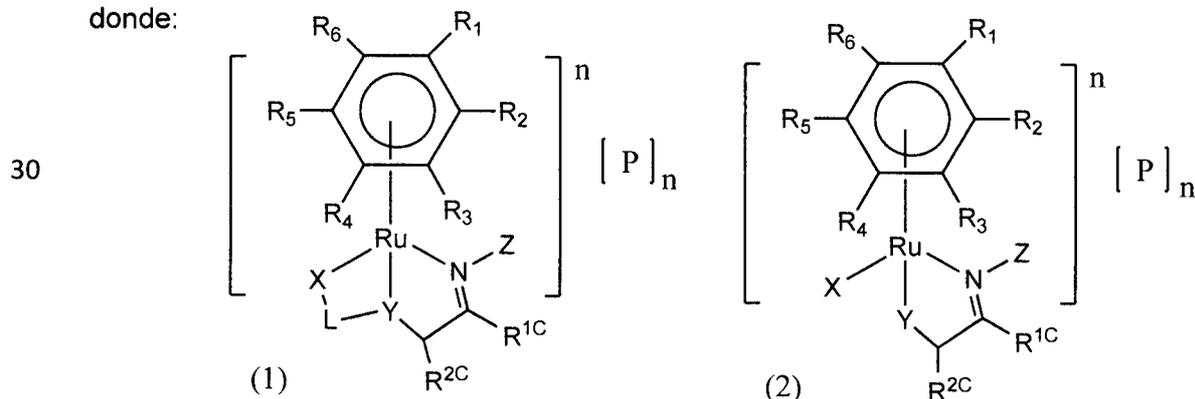
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10 En la presente invención describimos la utilización de una clase de complejos areno de rutenio que presentan excelente actividad antitumoral de acción rápida. También se describe la preparación y caracterización de una parte de estos complejos útiles como agentes antitumorales.

15 Mientras que los compuestos conocidos hasta la fecha muestran toxicidades in vitro, con IC_{50} variables (entre 2-100 μ M), después de 12-72 horas de incubación celular con la droga, los complejos que aquí se describen presentan altas citotoxicidades después de solamente 3 horas y con IC_{50} que no exceden los habituales.

20 La presente invención describe la excelente actividad antitumoral de algunos complejos de Ru, alguno de ellos no descritos hasta la fecha, así como la acción sinérgica de los compuestos preparados, en comparación con los sistemas orgánico y organometálico de los que proceden.

25 De acuerdo con el primer aspecto de esta invención, los complejos objeto de este estudio corresponden a los derivados de fórmula (1) y (2), o solvatos o precursores de los mismos, donde:



Para (1) y (2):

R1, R2, R3, R4, R5, R6 pueden ser H, alquilos (C1-7), alquenilo, (C2-7), alquinilo (C2-7), arilo (C6-20), heterociclo, haluro, o grupos ester, amino, acilo, éter, tioeter, sulfuro, azo o imino. R₁ y R₂ pueden también formar parte de un anillo saturado o insaturado, carbonado
5 o heterocíclico de 3 a 8 miembros.

P es un contra-anión (Cl, PF₆, BF₄, BPh₄), que existe en el caso de que n sea 1 o 2
n puede ser 0, 1 o 2

10 Z puede ser OH o O⁻ (formando el grupo oxima, u oximato)

R^{1C} y R^{2C} pueden ser:

- i) hidrógeno, alquilos (C1-8), alquenos (C2-8) o alquinos (C2-8) ramificados o lineales, cíclicos carbonados o heterocíclicos o acíclicos,
15 cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.
- ii) junto con los carbonos a los que se enlazan, pueden formar hidrocarburos cíclicos o heterocíclicos, saturados, insaturados o aromáticos, de 3 a 8 átomos de carbono.

20 **Además, en (1):**

X puede ser un ligando neutro centrado en O-, N- o S-. El átomo dador puede formar parte de un heterociclo.

Y puede ser un grupo amino -NR^{1N} donde R^{1N} puede ser hidrógeno, alquilo (C1-7), arilo, alquenilo (C2-7) o alquinilo (C2-7) ramificado o lineal, cíclico (o heterocíclico) o acíclicos,
25 cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.

L es el grupo de unión entre X e Y, puede ser alquilenilo (C1-7), alquilenilo (C2-C7) o alquilenos (C3-C7) lineales, cíclicos (arenilenos o heterocíclicos) o acíclicos,
30 diferentemente sustituidos.

Además, en (2):

X puede ser un haluro, o ligando monoaniónico centrado en O-, N- o S-.

Y puede ser i) un grupo amino $-NR^{1N}R^{2N}$ o ii) amido, $-NR^{1N}$. En este último caso, no existe X coordinado al Ru.

5 R^{1N} ; R^{2N} pueden ser hidrógeno, alquilo (C1-C7), arilo, alquenilo (C2-C7) o alquinilo (C2-C7) ramificados o lineales, cíclicos (o heterocíclicos) o acíclicos, cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.

Los complejos a los que se refiere esta invención pueden estar en forma de solvatos, precursores o sales adecuadas en farmacia. Los precursores son variantes de los
10 compuestos de la invención que forman los compuestos (1) o (2) in vivo.

Los complejos de fórmula (1) y (2) pueden tener uno o varios centros quirales. Cuando los tengan, pueden estar en forma de un enantiómero, pueden estar enriquecidos en un enantiómero o ser un mezcla racémica.

15

El término "alquilo (C1-C7)" se refiere a grupos alquilo de 1 a 7 átomos de carbono que pueden estar o no ramificados y pueden ser lineales o cíclicos (a partir de 3 átomos de carbono). Ejemplos de alquilos no ramificados y lineales son metilo, etilo, propilo, pentilo, hexilo, heptilo. Ejemplos de alquilos lineales ramificados son 2-propilo, 2-butilo. Los grupos
20 cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo o ciclohexilo, entre otros. Los alquilos a los que nos referimos pueden también estar diferentemente sustituidos con otros grupos alquilo de constitución similar a los definidos o con otros grupos como por ejemplo $-\text{CON}-(\text{C1-7})$ -alquilo, amino ($-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-(\text{C1-7})$ -alquilo), -hidroxi ($-\text{OH}$), éter ($-\text{O}-(\text{C1-7})$ -alquilo), carboxilato ($-\text{COOH}$), éster ($-\text{COO}-(\text{C1-7})$ -alquilo), ciano, halo, tiol ($-\text{SH}$), tioleter ($-\text{S}-(\text{C1-7})$ -alquilo).
25

El término "alquenilo (C2-C7)" o "alquinilo (C2-C7)" se refiere a grupos con definición similar a la utilizada para los grupos alquilo, de 2 a 7 átomos de carbono, pero que tienen uno o más dobles o triples enlaces $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{C}$, respectivamente. Pueden estar o no ramificados
30 y pueden ser lineales o cíclicos (a partir de 3 átomos de carbono). Pueden estar o no sustituidos análogamente a los grupos alquilo.

El término "arilo (C6-C20)" se refiere a grupos aromáticos de 6 a 20 átomos de carbono como fenilo, naftilo, antraceno.

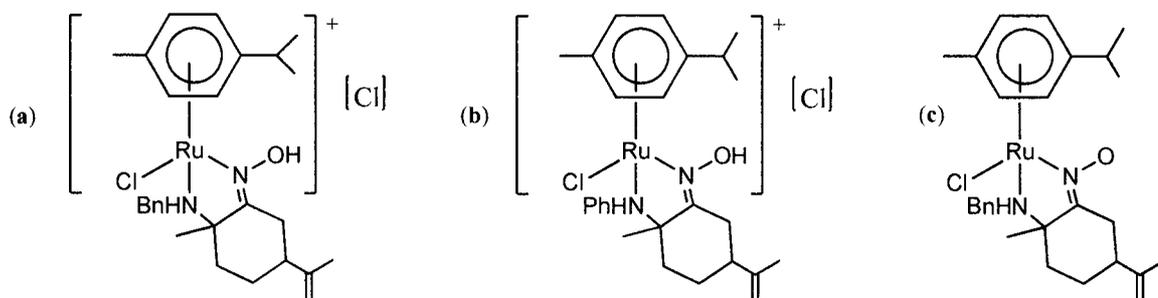
El término "heterocíclico" se refiere a anillos de 4 a 9 miembros, aromáticos o no, saturados o insaturados que pueden contener de 1 a 3 heteroátomos como N, O o S, como por ejemplo, indol o imidazol.

- 5 El término "alquileo" se refiere a grupos con definición análoga a la del término alquilo, pero incluyendo especies divalentes con radicales separados por dos o más átomos de carbono. Los grupos alquileños pueden estar también diferentemente sustituidos en la cadena alquilenica, de manera análoga a como se han definido las posibles sustituciones de los grupos alquilo. Los términos "alquilenilo" o "alquinileno" se definen de manera
10 similar a la de alquileo, refiriéndose a radicales divalentes que contienen en la cadena uno o más dobles o triples enlaces C=C, C≡C, respectivamente. El término "arileno" se define como un radical divalente de un grupo arilo, por ejemplo, 1,4-fenileno.

- El término "ligando centrado en O-, N- o S-" se refiere a ligandos que se enlazan al metal
15 a través del átomo de O, N o S, respectivamente: Los primeros incluyen agua, carbonato, carboxilatos, éteres, alcoholes, alcoholatos, éteres, cetonas, aldehídos. Los segundos incluyen nitrilos, ligandos azo, grupos aromáticos con N, ligandos amino, imino o amido. Los terceros incluyen tiocianatos, sulfóxidos, tioéteres, tiolatos. Todos ellos pueden constituirse también por sistemas heterocíclicos (piridina, pirazolina, imidazolina, tiazolina)
20 aromáticos o no de 4-6 miembros.

- A no ser que se especifique lo contrario, en lo expuesto anteriormente se incluyen las formas ya conocidas iónicas, solvatadas o protegidas de estos sustituyentes. Por ejemplo,
25 un carboxilato incluye la forma aniónica o solvatada o las formas protegidas convencionales. Un grupo amino incluye la forma amonio (-NR₁R₂H⁺) o solvato, así como las formas convencionales de protección de grupos amino (por ejemplo, "Protective groups in Organic Syntheses", T. Green and P. Wuts, 3rd Edition, John Wiley and Sons, 1999).

- La preparación y caracterización de los derivados de tipo (2), (a), (b) y (c), ya ha sido
30 descrita por M.S.I.ElAlami y colaboradores en Chirality, 24, **2012**, 675-682:



Sin embargo, la actividad antitumoral de los tres derivados allí descritos no ha sido estudiada ni publicada con anterioridad.

5

En la presente invención se han estudiado espectroscópicamente estos derivados y se han preparado y caracterizado nuevos derivados análogos a éstos, cuya preparación se había intentado pero no se había logrado anteriormente. Además, se han utilizado todos estos derivados para estudios in vitro de su citotoxicidad en plásmidos PC3, obteniendo resultados excelentes.

10

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1.- Vista de los complejos de fórmula general (1) y (2).

15 Figura 2. (Prior Art).- Vista de los complejos de Ru(II) (a), (b), (c) que cumplen las fórmulas generales (1) y (2) y que forman parte del estado de la técnica.

Figura 3.- Vista de los complejos de fórmula (d), (e) y (f) presentados como ejemplos.

20 Figura 4. (Prior Art).- Vista de los sistemas orgánicos amino-oxima (3g), (3h) e (3i) y amonio-oxima (3g·HCl), (3h·HCl) e (3i·HCl) que forman parte del estado de la técnica.

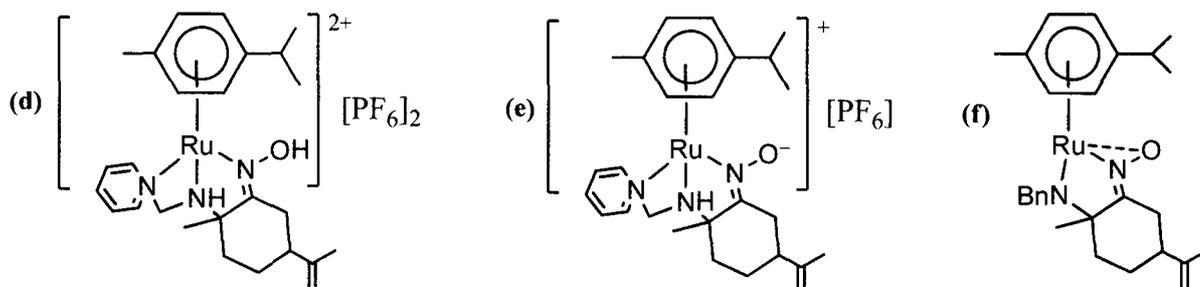
Figura 5.- Gráfica dosis-efecto de los complejos de rutenio en la viabilidad celular de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata humano.

25

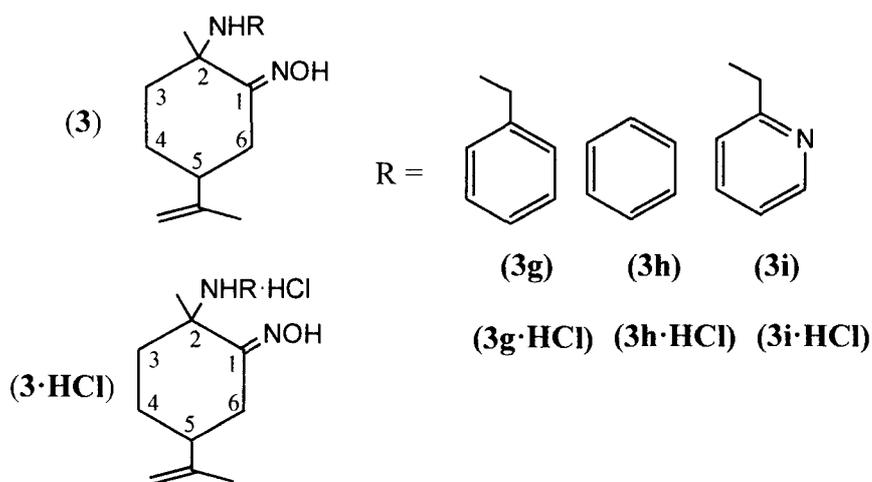
MODO DE REALIZACIÓN

1. Síntesis de complejos de Rutenio

A continuación se detalla la síntesis y caracterización de los siguientes complejos descritos en la Figura 3:



Los derivados orgánicos quirales amino-oxima y amonio-oxima de fórmula general (3) y (3·HCl) de la Figura 4, donde R = Ph, Bn, pic; son ejemplos no limitantes de algunos de los ligandos oxima que pueden ser utilizados. Su preparación, así como la de las correspondientes sales de amonio, es bien conocida y ha sido descrita, por ejemplo: D. J. Brecknell y colaboradores en Aust. J. Chem., 1977, vol 30, pp.195-203; Irako y colaboradores en Tetrahedron, vol 51, No46, pp. 12731-12744; M.S.I.ElAlami y colaboradores en Chirality, 24, 2012, 675-682.



Metodología general de trabajo:

15 Los reactivos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\mu\text{-Cl})_2]$ y NaOMe fueron comprados en Aldrich Chemical y utilizados sin ninguna purificación previa. Los disolventes utilizados para las síntesis que se describen a continuación fueron previamente secados mediante los métodos convencionales (D. D. Perrin, W.L. Amarego, Purification of Laboratory Chemicals, 1980, 2nd Ed., Pergamon Press, Ltd Oxford) y destilados antes de ser utilizados.

20

Algunos de los complejos de Rutenio han sido preparados utilizando una caja seca modelo MBraun 150 BG, con atmósfera de Ar. En estos casos, se especifica la utilización de la caja seca en su procedimiento experimental. En caso contrario, la síntesis se ha realizado en presencia de aire.

5

La caracterización espectroscópica se realizó en un espectrómetro de RMN Marca Bruker Modelo AV400. Los desplazamientos químicos están calibrados respecto a la señal residual de disolvente: CDCl_3 (7.24 ppm), acetona- d_6 (2.10 ppm). Los espectros monodimensionales de ^1H , ^{13}C , ^{15}N , y en su caso, ^{19}F y ^{31}P se completaron con la
 10 realización de algunas técnicas bidimensionales como COSY ^1H - ^1H , HSQC ^1H - ^{13}C , HMBC ^1H - ^{13}C y ^1H - ^{15}N , que permiten la asignación inequívoca de cada una de las señales observadas. En la asignación que aparece en la caracterización se han numerado los sistemas cíclicos amino-oxima **3g**, **3h**, **3i**, tal y como aparecen en la Figura 4.

15 **Preparación de $\{\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})(\text{HON}^{\wedge}\text{NHpic})\}\{\text{PF}_6\}_2$ (**d**).**

Se mezclan en un matraz los sólidos $[\text{Ru}(\eta^6\text{-p-cimeno})\text{Cl}(\mu\text{-Cl})_2]$ (0.250 g, 0.41 mmol) y **3i** (enantiómero 2S,5R) (0.22 g, 0.82 mmol) y se añade sobre ellos tetrahidrofurano (10.0 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 1 hora y entonces se añade
 20 TIPF_6 (0.57, 1.64 mmol), agitando la mezcla marrón formada durante una noche. A continuación, se filtra la disolución sobre celite y se evapora el disolvente a sequedad de la disolución resultante, obteniéndose un sólido marrón que se lava con hexano (2 x 5.0 mL) y se seca a vacío, identificándose como el complejo (**d**) (0.79 mmol, Rendimiento = 96%).

25 (**d**) se obtiene como una mezcla de dos isómeros **d1** y **d2**, que resultan de la generación de un nuevo centro quiral en el átomo de Ru, con configuraciones absolutas: (R-Ru)(2S,5R-3a) y (S-Ru)(2S,5R-3a). Debido a la complejidad del espectro de Resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , a continuación se proporcionan los datos de RMN ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P en acetona- d_6 : **isómero d1**: 179.4 (C=NOH); 162.0 (Cipso piridina); 146.0 (=C-Me); 156.8, 142.8, 128.1, 124.4 (C_5NH_4); 113 (=CH₂); 110.4, 105.5 (Cipsos p-cimeno); 89.0, 88.2, 87.6, 86.6 (C_6H_4 p cimeno); 73.8 (-C-NHpic), 61.2 ($\text{CH}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{N}$); 43.2, 32.2 (CH-isoPr + CH⁵); 38.8, 29.5, 25.3 (CH₂^{3,4,6}); 23.4, 23.2, 22.9, 21.8, 19.4 (CH₃). ^{15}N : 30.0 (NH); 232.7 (N-piridina); 258.8 (=NOH). ^{19}F : -72.20, d, JP-F = 707 Hz. ^{31}P : -144, septuplete, JP-F = 707
 30 Hz. **isómero d2**: 175.3 (C=NOH); 161.5 (Cipso piridina); 147.1 (=C-Me); 156.4, 142.9,

127.8, 125.3 (C₅NH₄); 111.2 (=CH₂); 110.6, 104.6 (Cipsos p-cimeno); 89.1, 88.7, 87.9, 86.7 (C₆H₄ p cimeno); 71.5 (-C-NHpic), 59.5 (CH₂-C₆H₄N); 40.3, 33.1 (CH-isoPr + CH⁵); 32.0, 26.9, 25.0 (CH₂^{3,4,6}); 27.7, 24.5, 22.5, 21.7, 19.2 (CH₃). ¹⁵N: 28.7 (NH); 236.6 (N-piridina); 265.2 (=NOH). ¹⁹F : -72.20, d, JP-F = 707 Hz. ³¹P : -144, septuplete, JP-F = 707 Hz.

5

Preparación de {Ru(η⁶-p-cimeno)(ON[^]NHpic)}{PF₆} (e·PF₆).

Se mezcla en un vial y dentro de la caja seca el complejo d (0.200 g, 0.30 mmol) con NaOMe (0.02 g, 0.30 mmol) y se añade sobre ellos tetrahidrofurano (10.0 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se evapora a sequedad el disolvente y se añade diclorometano. Se filtra la suspensión amarilla sobre celite y se evapora el diclorometano a sequedad de la disolución resultante, obteniéndose un sólido naranja que se lava con éter (2 x 5.0 mL) y se seca a vacío, identificándose como el complejo (e·PF₆) (0.26 mmol, Rendimiento = 87%).

15

(e·PF₆) se obtiene como un solo isómero, en un proceso estereoselectivo. Datos de RMN de ¹³C, ¹⁵N, ¹⁹F y ³¹P en CDCl₃: 160.8 (Cipso piridina); 151.6 (C=NOH); 144.9 (=C-Me); 154.0, 138.4, 124.4, 121.4 (C₅H₄N); 110.4 (=CH₂); 108.5, 99.2 (Cipsos p-cimeno); 92.8, 86.2, 84.3, 84.0 (C₆H₄ p-cimeno); 68.6 (-C-NHpic), 57.8 (CH₂-C₆H₄N); 39.0, 31.3 (CH-isoPr + CH⁵); 30.2, 27.2, 25.2 (CH₂^{3,4,6}); 25.9, 23.3, 21.8, 21.7, 18.6 (CH₃). ¹⁵N: 35.0 (NH); 243.5 (N-piridina); 281.6 (=NOH). ¹⁹F : -71.6, d, JP-F = 709 Hz. ³¹P : -144, septuplete, JP-F = 709 Hz.

20

Preparación de {Ru(η⁶-p-cimeno)(ON[^]NBn)} (f)

Se mezcla en un vial y dentro de la caja seca el complejo a (0.25 g, 0.44 mmol) con NaOMe (0.05 g, 0.88 mmol) y se añade sobre ellos tetrahidrofurano (10.0 mL). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, se evapora a sequedad el disolvente y se añade tolueno. Se filtra la suspensión roja sobre celite y se evapora el tolueno a sequedad de la disolución resultante, obteniéndose un sólido rojo que se lava con hexano (2 x 5.0 mL) y se seca a vacío, identificándose como el complejo (f) (0.40 mmol, Rendimiento = 91%).

30

Datos de RMN de ¹H, ¹³C y ¹⁵N en CDCl₃: 7.28 (2H, dd, J = 8Hz, -C₆H₅), 7.17 (1H, dd, J = 8Hz, C₆H₅), 7.11 (2H, d, J = 8 Hz, C₆H₅), 5.27, 5.10, 5.02, 4.82 (cada una a 1H, todos d, J

= 6Hz, C₆H₄-p-cimeno), 5.13, 4.74 (cada una a 1H, ambos s, =CH₂), 3.89 (1H, m, -CH₂), 2.63 (1H, spt, -CH(Me)₂), 2.39 (1H, ancha, -CH-), 2.12 (3H, s, CH₃-p-cimeno), 1.86 (1H, m, -CH₂), 1.61 (3H, s, CH₃-CNPh), 1.61, 1.48, 1.49, 1.19 (cada uno a 1H, todos m, -CH₂), 1.26, 1.24 (cada uno a 3H, ambos d, J = 6Hz, (CH₃)₂CH-pcimeno), 1.05 (3H, s, CH₃C=). RMN de ¹³C: 163.4 (C=NOH), 158.3 (CipsoPh), 144.9 (=C-Me), 128.0, 126.6, 125.2 (C₆H₅); 112.3 (=CH₂); 100.3, 90.0 (Cipsos p-cimeno); 83.1, 82.8, 82.6, 80.8 (C₆H₄ p-cimeno); 79.4 (-C-NH), 42.1 (CH-), 33.9 (-CH₂); 31.4 (CH-isoPr), 26.4, 25.3 (-CH₂); 24.1, 24.0 (CH₃-isoPr), 23.8 (CH₃-C-N), 22.8 (CH₃-C=), 20.1 (CH₃-p-cimeno). ¹⁵N: 263.5 (Ru-NPh); 328.9 (=NO).

10 Datos Biológicos

Con el fin de evaluar la viabilidad celular de los complejos de rutenio objeto de estudio, se midió la actividad mitocondrial utilizando el reactivo MTT tras la administración de los complejos areno de Ru(II) **a**, **b** y **d**. Con el fin de comparar las propiedades de estos complejos organometálicos con los sistemas orgánico (derivados **3g**, **3h**, **3i** de la Figura 2) y organometálico ([Ru(η⁶-p-cimeno)Cl(μ-Cl)₂) de partida; se realizaron también ensayos análogos tras la administración de los derivados orgánicos amonio-oxima, **3g·HCl**, **3h·HCl**, **3i·HCl**, y organometálico [Ru(η⁶-p-cimeno)Cl(μ-Cl)₂].

Los derivados **3g·HCl**, **3h·HCl**, **3i·HCl** corresponden a la cuaternización de la amina presente en los sistemas **3g**, **3h**, **3i**, representados en la figura 4, con HCl. Esta cuaternización aporta solubilidad acuosa a los derivados y su preparación se describe también en Aust. J. Chem., 1977, vol30, pp.195-203.

Cultivos celulares

25 La línea celular empleada en este estudio fue PC-3. Se trata de células de cáncer de próstata humano derivadas de una localización metastásica (hueso). Dicha línea se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) (Cat CRL-1435™). Se cultivaron en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina/estreptomocina/anfotericina B (Life Technologies, Carlsbad, CA). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Una vez que las células alcanzaron un 70-80% de confluencia, se lavaban con tampón fosfato salino (PBS) y se separaban con 0,25% de tripsina/0,2% de EDTA. El medio de cultivo se cambiaba cada 3 días.

Ensayo MTT

Esta técnica se utilizó para evidenciar efectos deletéreos sobre el metabolismo celular. Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad selectiva de las células viables para reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma®) en cristales insolubles de formazán.

Método general: Las células fueron diluidas a una concentración de 150.000 células/ml con RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, se sembraron 100 µl por pocillo en placas de 96 pocillos (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e incubaron 24 horas.

10

Las soluciones stock de todos los derivados estudiados se realizaron en el momento de su utilización con H₂O desionizada y sonicadas para asegurar su completa disolución. Dichas soluciones stock se diluyeron con medio de cultivo para obtener las concentraciones finales en un rango entre 2,5 y 300 µM. Todos los compuestos se evaluaron para cada concentración en 12 pocillos y los ensayos se repitieron un mínimo de cuatro veces.

15

Después de 3 horas de incubación con los derivados estudiados se añadieron 10 µl de reactivo MTT en PBS a una concentración de 5 mg/ml (concentración final en el pocillo de 0,5 mg MTT/ml). Tras 90 minutos de incubación en condiciones de cultivo se retiró el medio de cultivo añadiendo 50 µl de 2-Propanol (Panreac, Barcelona, España) frío para disolver los cristales de formazán. La concentración de formazán se determinó por espectrofotometría utilizando un lector de placas a una longitud de onda de 570 nm con una referencia de 620 nm. La viabilidad celular relativa (%) respecto al control (células sin tratar) se determinó en base a la fórmula: $[A]_{\text{test}} / [A]_{\text{control}} \times 100$.

20

La actividad inhibidora (%) de los derivados estudiados en la línea celular PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano se recoge en las tablas 1 y 2 y en la Figura 5.

Tabla 1. Actividad inhibitoria de los derivados de rutenio **a**, **b** y **d** y de sus fragmentos constituyentes, **[Ru₂Cl₄]**, **g-i-HCl**, en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata humano.

25

Compuesto	Dosis	Actividad inhibitoria
	(μM)	(%)
a	50	82
b	50	75
d	50	57
[Ru ₂ Cl ₄]	50	13
	300	29
3g ·HCl	50	15
	300	22
3h ·HCl	50	18
	300	44
3i ·HCl	50	12
	300	24

Compuesto **a**: C₂₇H₃₈Cl₂N₂ORu

Compuesto **b**: C₂₆H₃₆Cl₂N₂ORu

Compuesto **d**: C₂₆H₃₆N₃P₂F₁₂ORu

Compuesto [Ru₂Cl₄]: C₂₀H₂₈Cl₄Ru₂

Compuesto **3g**·HCl: C₁₇H₂₄N₂OCl

Compuesto **3h**·HCl: C₁₆H₂₃N₂OCl

Compuesto **3i**·HCl: C₁₆H₂₄N₃OCl

Tabla 2. IC₅₀ de los complejos de rutenio en la línea celular PC-3 de cáncer de próstata humano.

5

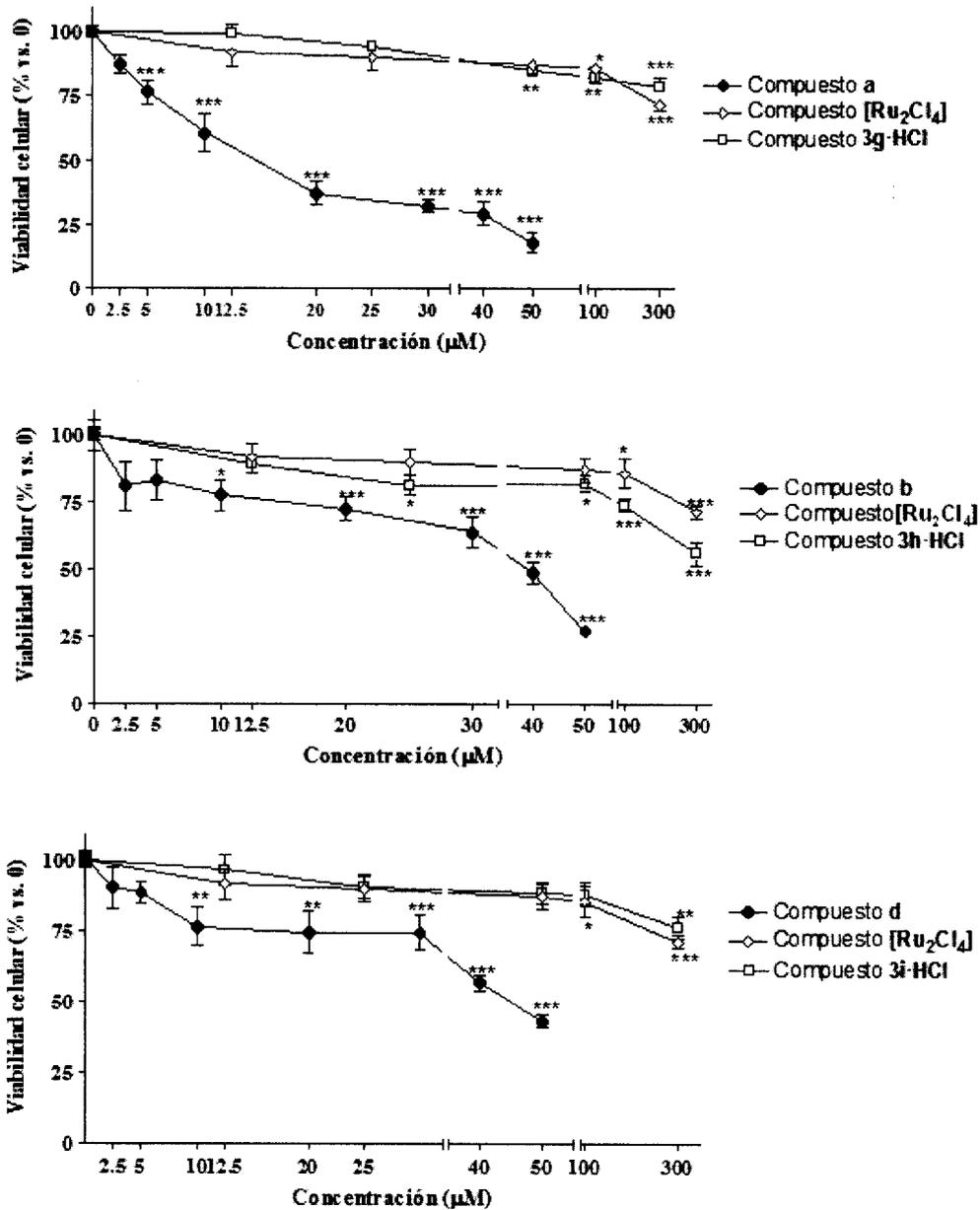
Compuesto	IC ₅₀ (μM)
a	12,5
b	28
d	31

Compuesto **a**: C₂₇H₃₈Cl₂N₂ORu

Compuesto **b**: C₂₆H₃₆Cl₂N₂ORu

Compuesto **d**: C₂₆H₃₆ClN₃ORu

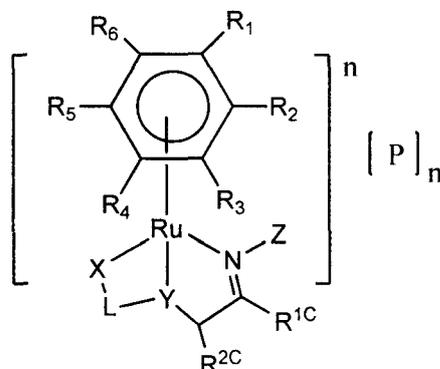
En la siguiente figura (figura 5) se muestra la dosis y el efecto de los complejos de rutenio en la viabilidad celular de la línea celular PC-3 de cáncer de próstata humano.



Bajo nuestras condiciones experimentales los complejos de rutenio **a**, **b** y **d** exhiben una excelente actividad antitumoral frente al adenocarcinoma de próstata humano a una dosis de 50 µM como se muestra en las tablas 1 y 2 y en la Figura 5. Además, se observan efectos sinérgicos en los complejos de rutenio descritos respecto a la actividad antitumoral que presentan los productos de partida [Ru₂Cl₄], y **3g**·HCl, **3h**·HCl, **3i**·HCl, tal y como se deduce de los valores representados en las gráficas de la Figura 5

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de rutenio caracterizado por la siguiente formula (1):



5

(1)

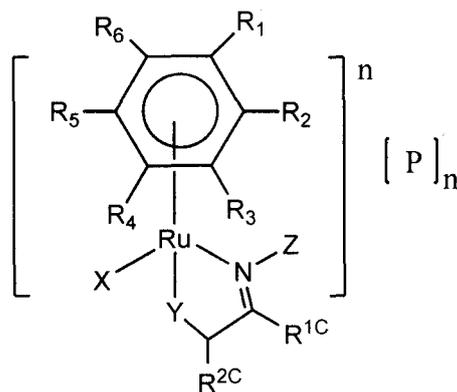
Donde:

- i. $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6$ pueden ser H, alquilo (C1-7), alquenilo, (C1-7), alquinilo (C1-7), arilo (C6-20), heterociclo, haluro, o grupos ester, amino, acilo, éter, tioeter, sulfuro, azo o imino.
- ii. R_1 y R_2 pueden también formar parte de un anillo saturado o insaturado, carbonado o heterocíclico de 3 a 8 miembros.
- iii. P es un contra-anión (Cl, PF_6 , BF_4 , BPh_4), donde n puede ser 1 o 2
- iv. Z puede ser OH o O^- (formando el grupo oxima, u oximato)
- v. R^{1C} y R^{2C} pueden ser:
 - a. hidrógeno, alquilos (C1-8), alquenilos (C2-8) o alquinilos (C3-8) ramificados o lineales, cíclicos (o heterocíclicos) o acíclicos, cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.
 - b. junto con los carbonos a los que se enlazan, pueden formar hidrocarburos cíclicos o heterocíclicos, saturados, insaturados o aromáticos, de 3 a 8 átomos de carbono.
- vi. X puede ser un ligando centrado en O-, N- o S-.
- vii. Y puede ser un grupo amino $-NR^{1N}$. R^{1N} puede ser hidrógeno, alquilo (C1-7), arilo, alquenilo (C2-7) o alquinilo (C2-7) ramificado o lineal, cíclico (o heterocíclico), o acíclicos, cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.

25

viii. L es el grupo de unión entre X e Y, puede ser alquileo (C1-7), alquenileno (C2-C7) o alquinileno (C3-C7) lineales, acíclicos, cíclicos, heterocíclicos, aromáticos o no, diferentemente sustituidos.

5 2. Un complejo de rutenio caracterizado por la siguiente formula (2):

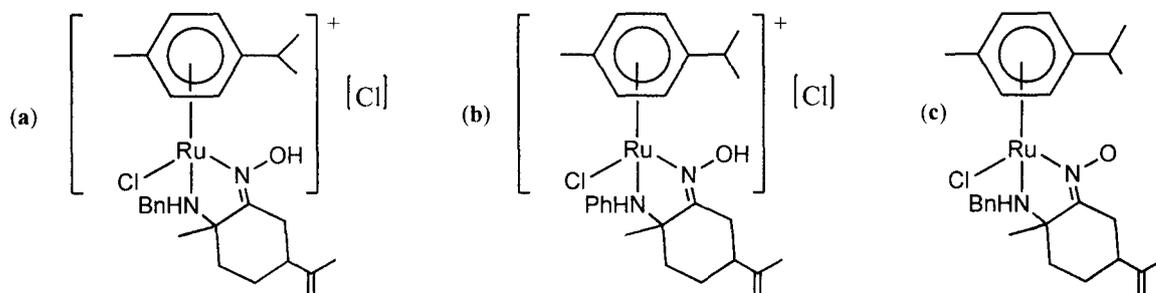


(2)

Donde:

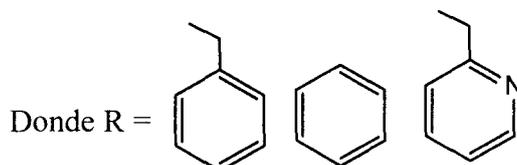
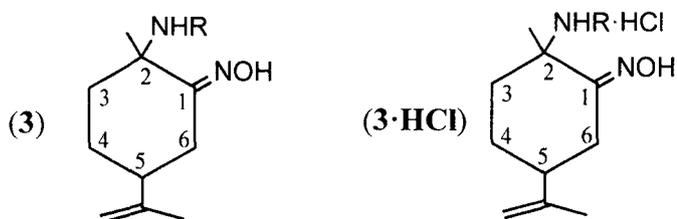
- i. $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, Z$ y R^{1C} y R^{2C} cumplen las reivindicaciones 1i-v.
 - 10 ii. P es un contra-anión (Cl, PF_6 , BF_4 , BPh_4), donde n puede ser 0 o 1
 - iii. X puede ser un haluro, o ligando monoaniónico centrado en O-, N- o S-.
 - iv. Y puede ser i) un grupo amino $-NR^{1N}R^{2N}$ o ii) amido, $-NR^{1N}$. En este último caso, no existe X coordinado al Ru.
 - 15 v. R^{1N} y R^{2N} pueden ser hidrógeno, alquilo (C1-8), arilo, alquenilo (C2-8) o alquinilo (C2-8) ramificado o lineal, acíclicos, cíclico (o heterocíclico) aromáticos o no, cada uno de estos puede o no estar diferentemente sustituido.
- 20 3. Un solvato o precursor de un complejo de rutenio según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
 4. Un complejo de rutenio según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y un eluyente farmacéutico adecuado.
 - 25 5. Un complejo de rutenio según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 y una emulsión farmacéutica adecuada.

6. Utilización de complejos de rutenio según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, donde el compuesto se selecciona entre aquellos caracterizados por las fórmulas (a), (b) o (c):



5

7. Utilización de compuestos caracterizados por la fórmula (3) o (3·HCl):



8. Utilización de un solvato o precursor de compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7.
9. Utilización de compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7 y un eluyente farmacéutico adecuado.
10. Utilización de compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7 y una emulsión farmacéutica adecuada.
11. Composiciones farmacéuticas que comprendan al menos uno de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7.

20

12. Utilización de composiciones farmacéuticas que comprendan al menos uno de los compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7.
13. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7 como
5 método de terapia contra el cáncer.
14. Utilización de un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 6 y 7 como medicamento para el tratamiento del cáncer.

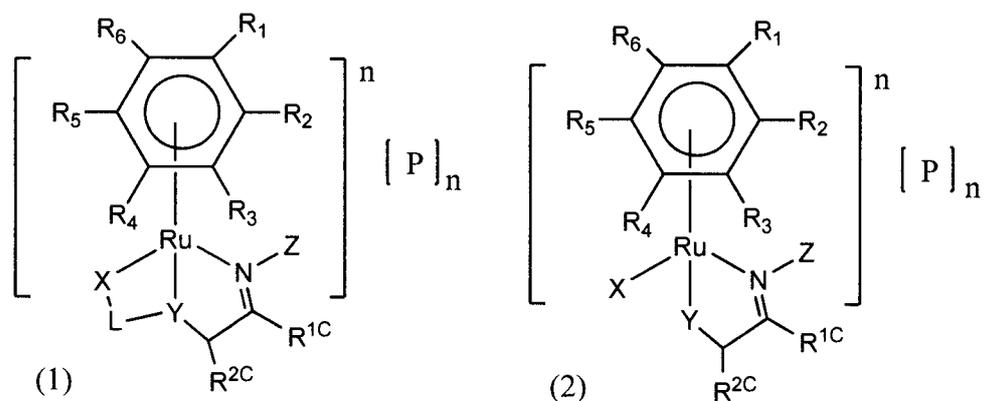


Figura 1

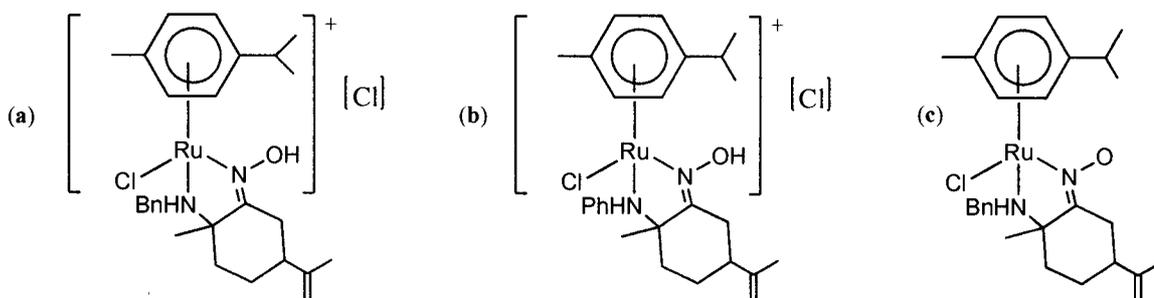


Figura 2 (prior art)

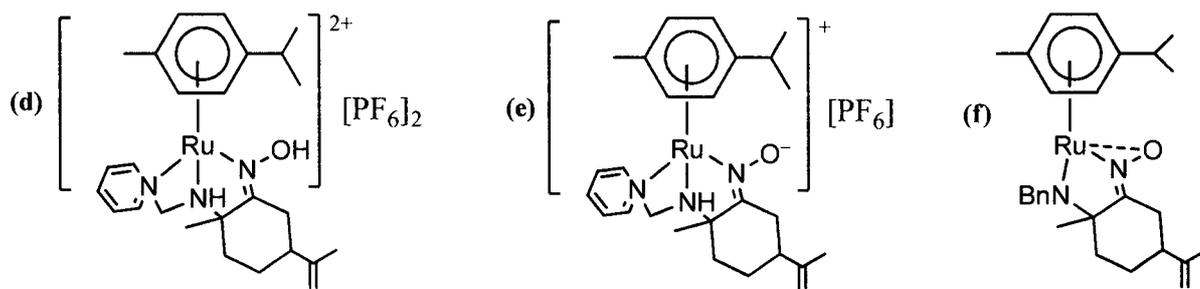


Figura 3

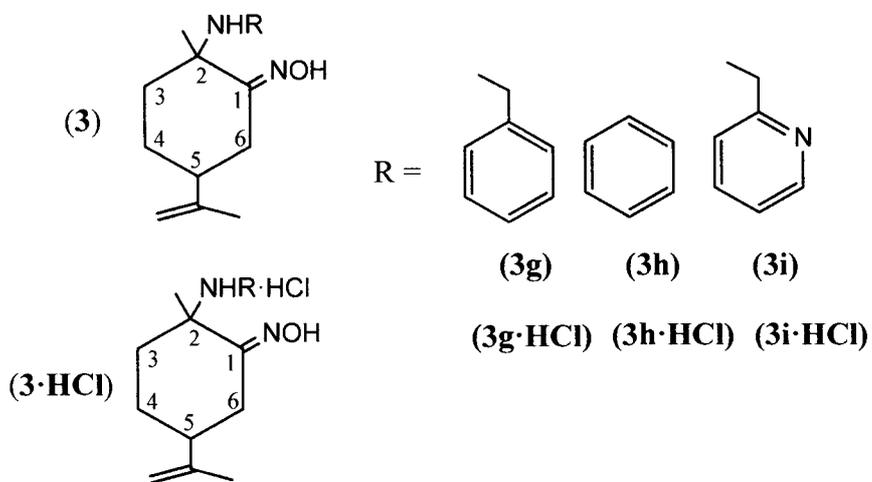


Figura 4 (Prior Art)

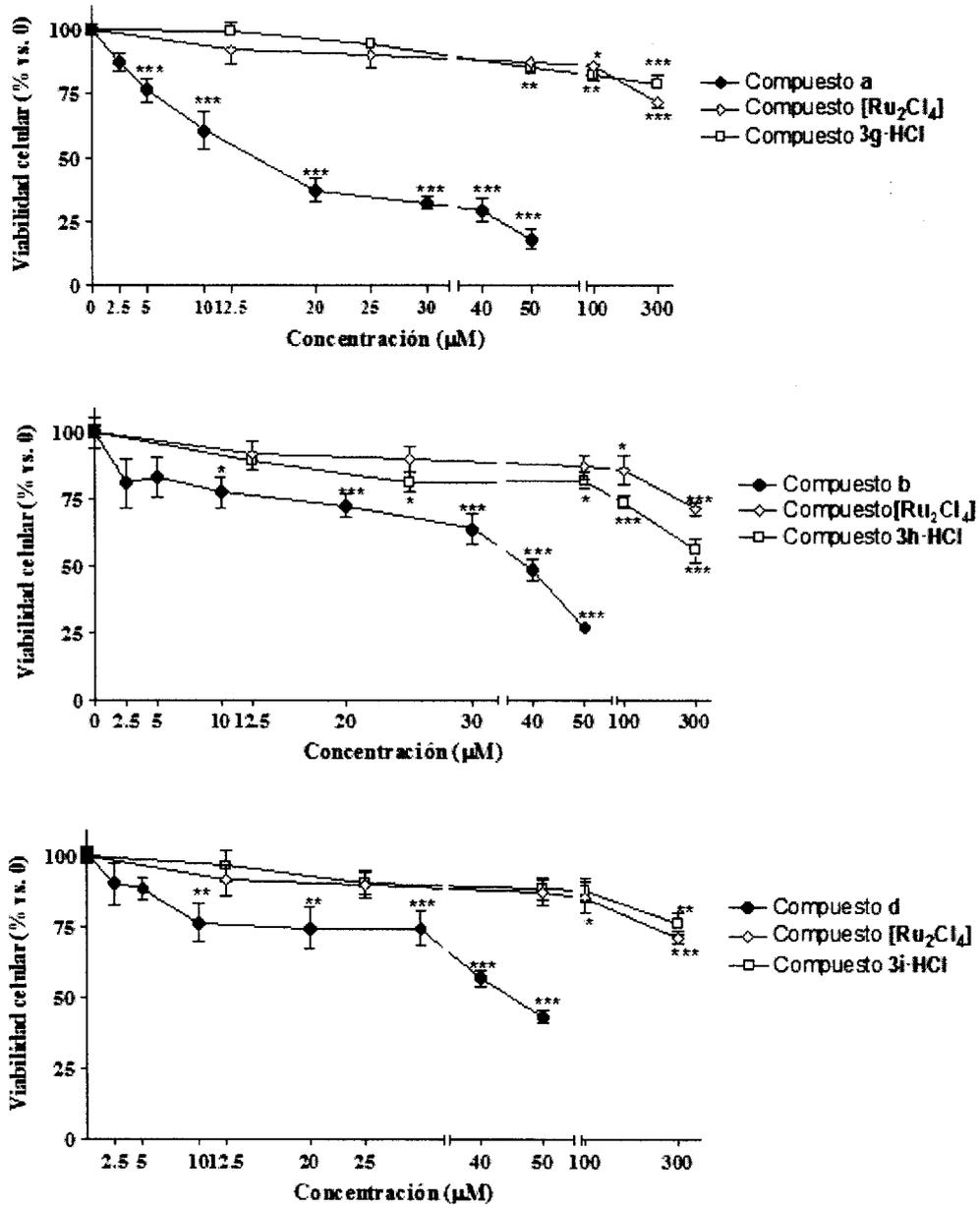


Figura 5



- ②① N.º solicitud: 201300949
②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2013
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

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

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	M ELALAMI et al., Chirality 2012, vol 24, nº 8, págs 675-682. "alfa-Amino-oximes based on optically pure limonene: A new ligands family for ruthenium-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation", esquemas 1 y 2; figura 2.	2,3,6-10
A	A BERGAMO et al., Journal Inorganic Biochemistry 2012, vol 106, págs 90-99. "Approaching tumour therapy beyond platinum drugs. Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates", figura 4.	1-14
A	WO 2007101997 A1 (THE UNIVERSITY OF EDINBURGH) 13.09.2007, reivindicaciones.	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
22.08.2014

Examinador
M.P. 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, CAS, REGISTRY

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.08.2014

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1,4,5,11-14	SI
	Reivindicaciones 2,3,6-10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1,4,5,11-14	SI
	Reivindicaciones 2,3,6-10	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	M ELALAMI et al, Chirality 2012, vol 24, nº 8, págs. 675-682. "alfa-Amino-oximes based on optically pure limonene: A new ligands family for ruthenium-catalyzed asymmetric transfer hydrogenation", esquemas 1 y 2; figura 2.	08.2012
D02	A BERGAMO et al., Journal Inorganic Biochemistry 2012, vol 106, págs 90-99.	2012

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

El objeto de la solicitud son los complejos de rutenio de fórmula (1) de la reivindicación 1 y de fórmula (2) de la reivindicación 2 y sus solvatos (reivindicación 3) y composiciones farmacéuticas que los comprenden (reivindicaciones 4,5 y 11). Las reivindicaciones 6-8 se refieren a la utilización de los complejos de rutenio de fórmulas (a), (b) y (c) (ver reivindicación 6) y de fórmula (3) (ver reivindicación 7) y las reivindicaciones 9,10 y 12-14 a la utilización de estos compuestos en composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer.

El documento D1 divulga alfa-amino-oximas del limoneno (ver esquema 1) análogas a las de la fórmula 3 de la reivindicación 7 de la solicitud y complejos de rutenio que contienen estos ligandos (ver esquema 2 y figura 2 de D1), el complejo de fórmula 5a del esquema 2 de D1 se corresponde con los de fórmulas (a),(b) y (c) de la reivindicación 6 de la solicitud, luego D1 anula la novedad de las reivindicaciones 2,3 y 6-10 de la solicitud pues la utilización en general de estos compuestos está estrechamente ligada a los compuestos per se, que han sido divulgados con anterioridad.

El documento D2 divulga, ver figura 11, la utilidad farmacéutica frente al cáncer de mama de varios complejos de rutenio, ver por ejemplo el complejo de la figura 4 de D2, aunque ninguno de ellos se corresponde con los de fórmulas (1) y (2) de la solicitud.

No se han encontrado divulgados con anterioridad los compuestos de fórmula (1) de la reivindicación 1 de la solicitud, por lo que se consideran nuevos, así como su utilización en composiciones farmacéuticas. Además se consideran inventivas pues un técnico en la materia no podría deducir a priori las posibles propiedades farmacológicas de los compuestos de fórmula (1).

En consecuencia se concluye que las reivindicaciones 1,4,5 y 11-14 de la solicitud son nuevas e inventivas y las reivindicaciones 2,3 y 6-10 carecen de novedad, según lo dispuesto en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.