

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 784**

51 Int. Cl.:

A61K 31/555 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 47/55 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.11.2017 PCT/ES2017/070745**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018 WO18087413**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2017 E 17869235 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2022 EP 3539971**

54 Título: **Complejos de rutenio para el tratamiento del cáncer que comprende células madre cancerosas**

30 Prioridad:

10.11.2016 ES 201631426

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.12.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (50.0%)**

**Reitorado da Universidade de Santiago de
Compostela, Colexio de San Xerome, Pza. do
Obradoiro, s/n**

**15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (50.0%)**

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

ES 2 929 784 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Complejos de rutenio para el tratamiento del cáncer que comprende células madre cancerosas

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 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 actualmente en el tratamiento clínico de numerosos cánceres.

15 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 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
 20 ADN. La mayoría de estos complejos se unen a la doble hebra del ADN. Sin embargo, debido a la relevancia funcional de los cuádruplex de guanina (GQs), sería de gran interés desarrollar complejos capaces de 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. El documento WO2012052821 divulga un complejo de rutenio de fórmula (I) para tratar el cáncer.

25 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 disponer de nuevas terapias antitumorales capaces de actuar sobre este tipo celular.

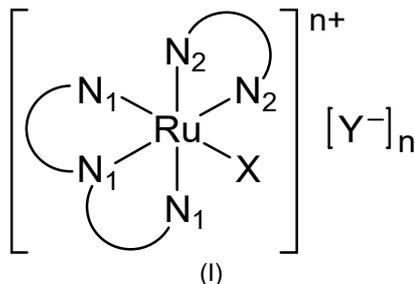
Otro de los retos en el tratamiento del cáncer consiste en lograr terapias dirigidas que permitan llevar el compuesto activo de forma selectiva al sitio de acción, reduciendo así la dosis necesaria, y que permitan actuar específicamente sobre las
 35 células cancerosas, evitando el daño sobre las células normales.

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.

Sumario de la invención

40 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 oncogén *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
 45 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
 50 (I)



en donde

- 55 N₁-N₁-N₁ representa un ligando aza-aromático N,N,N-tridentado;
- N₂-N₂ representa un ligando aza-aromático N,N-bidentado;
- X se selecciona de OH₂, Cl, Br, I y SR₁R₂;
- R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido;
- Y⁻ es un anión monovalente; y

n es 1 o 2;

para el tratamiento de un cáncer que comprende células madre cancerosas.

5 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 que comprende células madre cancerosas.

10 En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas, 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.

En otro aspecto la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- un complejo de rutenio de fórmula (I), y
- un sustrato de ABCG2.

15 En otro aspecto la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- un complejo de rutenio de fórmula (I), y
- un fármaco antitumoral.

20 Otros aspectos de la invención se refieren a los conjugados de la invención para su uso en medicina y para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas. Por último, otro aspecto de la invención se dirige a un método de tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado según se define en este documento e irradiar con luz.

25 Descripción de las figuras

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**.

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. $\lambda_{\text{obs}} = 222$.

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 los 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. $\lambda_{\text{obs}} = 222$.

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 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).

Figura 5. Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **4** (250 μ M) y GMP (750 μ M) 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.

Figura 6. HPLC de una mezcla de *c*-MYC (10 μ M) 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.

Figura 7. Cromatogramas de HPLC para la reacción del complejo **5** (250 μ M) y GMP (750 μ M) 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.

Figura 8. HPLC de una mezcla de *c*-MYC (10 μ M) 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.

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/ H_2O , en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$ nm.

5 **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/ H_2O , en presencia de TEAA. $\lambda_{\text{obs}} = 222$ nm.

10 **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 μM del complejo **1** (RuCl), TMPyP4 o 50 μM 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 μM , 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.

20 **Figura 12.** Análisis de niveles de expresión de *c-MYC* mediante qRT-PCR. Se incubaron células Vero durante 16 h con 100 μM del 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.

25 **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 μM RuCl o TMPyP4, o 50 μM 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.

30 **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 μM 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.

35 **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.

40 **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 μM del 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.

45 **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.

50 **Figura 18.** Efecto de RuH₂O (250 μM) en la expresión *c-MYC* y en la proliferación celular en cultivos PDAC adherentes establecidos a partir de xenoinjertos con un número bajo de pases derivados de pacientes. Análisis Western blot de la expresión *c-MYC* en cultivos 24 y 48 h después del tratamiento con RuH₂O.

55 **Figura 19.** Efecto de RuH₂O en la expresión génica en cultivos PDAC adherentes establecidos a partir de xenoinjertos con un número bajo de pases derivados de pacientes. Se extrajo el ARN de células Panc185 y PancA6L 24 horas después del tratamiento con 100 μM de RuH₂O. El análisis qRT-PCR de Oct3/4, Sox2 y PGC1alpha se realizó en ADNc generado a partir de muestras tratadas. Los datos se normalizan a los niveles de expresión de ARNm de HPRT. Las células Panc185, también se denominan 185 y 185 scd indistintamente en este documento y las células Panc6AL también se denominan A6L indistintamente en este documento.

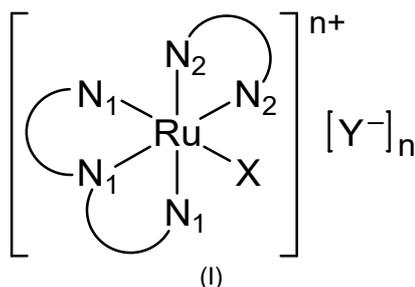
- 5 **Figura 20.** Efectos citotóxicos de RuH₂O en cultivos de PDAC. La muerte celular relativa se determinó en cultivos adherentes (bajos en CMC) y esferas (enriquecido en CMC) de Panc185 (A) y PancA6L (B) a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento con las dosis indicadas de RuH₂O.
- 10 **Figura 21.** Efectos citotóxicos de RuH₂O en cultivos de esferas de PDAC. Micrografías de luz y tinción con Anexina-V de células Panc185 y PancA6L después de 72 horas de tratamiento con 100 μM de RuH₂O.
- 15 **Figura 22.** Efectos de RuH₂O en la formación de esferas de PDAC. (A) Secuencia de trabajo del experimento para evaluar el efecto de RuH₂O en CMC de PDAC (B) Micrografías de luz de esferas derivadas de células Panc185 y PancA6L después de 10 días de tratamiento con 250 μM de RuH₂O.
- 20 **Figura 23.** Efectos de RuH₂O en la capacidad tumorigénica de PDAC in vivo. Las células Panc185 se pretrataron con RuH₂O antes de la inyección subcutánea en ratones NOD SCID (diabéticos no obesos, inmunodeficiencia combinada severa). Los tumores se extrajeron 12 semanas después de la inyección y se analizaron. (A) Fotos de los tumores extraídos de ratones NOD SCID 12 semanas después de ser inyectados con 10⁴ o 10³ células de Panc185 y pretratados con control (CTL) o 250μM de RuH₂O. (B) Resumen de los números de tumores que se detectaron por inyección con 10⁴ o 10³ células de Panc185 y pretratados con control (CTL) o 250μM de RuH₂O. (C) Pesos de los tumores extraídos de ratones NOD SCID 12 semanas después de ser inyectados con 10⁴ o 10³ células de Panc185 y pretratados con control (CTL) o 250μM de RuH₂O.
- 25 **Figura 24.** Inducción de apoptosis en células PDAC. Tinción con Anexina-V de células PDAC tratadas durante 48 horas con 100 o 250 μM de RuH₂O.
- 30 **Figura 25.** Capacidad clonigénica de células PDAC después del tratamiento con RuH₂O. (Arriba) Micrografías de luz de colonias formadas de Panc185 y PancA6L después de 10 días en cultivo. Las colonias se visualizaron con tinción con violeta cristal. (Abajo) Cuantificación de la eficiencia de colonias. Las colonias se lisaron en PBS-1% Triton-X y la intensidad del color se midió con un lector de placa.
- 35 **Figura 26.** Capacidad de formación de esferas de células PDAC después del tratamiento con RuH₂O.
- Figura 27.** Capacidad tumorigénica de células PDAC después del tratamiento con RuH₂O. Las células PDAC se trataron con las concentraciones indicadas de RuH₂O durante 48 horas y posteriormente se inyectaron por vía subcutánea en ratones NOD-SCID. Los tumores se extrajeron 7 u 11 semanas después de la inyección.
- 40 **Figura 28.** Secuencia de trabajo del experimento para evaluar el efecto del conjugado Ru-riboflavina en CMC de PDAC.
- Figura 29.** Efecto del conjugado Ru-riboflavina (RuRbf) (250 μM) en la expresión génica y la autofluorescencia de CMC de PDAC. (A) Se extrajo el ARN de células Panc185 24 horas después del tratamiento con control (Ctr), 250 μM de Ru-Rbf o 250 μM de Ru-Rbf más FTC. El análisis qRT-PCR de C-MYC, Klf4 y OCT3/4 se realizó en ADNc generado a partir de muestras tratadas. Los datos se normalizan a los niveles de expresión de ARNm de HPRT. (B) Medida de autofluorescencia por citometría de flujo.
- 45 **Figura 30.** Efecto del conjugado Ru-riboflavina (250 μM) en la tumorigénesis de CMC de PDAC.

Descripción detallada de la invención

50 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 guanosín monofosfato (GMP) mediante transformación previa en el complejo aquo (X = H₂O) activo. Esta reacción se puede acelerar mediante irradiación con luz.

55 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 SR₁R₂, 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 SR₁R₂, 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 H₂O (complejo aquo), es posible aumentar los niveles del oncogén *c-MYC* tanto en la oscuridad como mediante irradiación con luz.

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



en donde

- 5 $N_1-N_1-N_1$ 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 ;
 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;
 10 para el tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas.

Complejos de rutenio

- 15 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.
- 20 El término "alquenilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado que contiene desde 2 hasta 6 ("alquenilo C_2-C_6 "), más preferiblemente desde 2 hasta 3 ("alquenilo C_2-C_3 "), 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.
- 25 El término "alquínilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificado que contiene desde 2 hasta 6 ("alquínilo C_2-C_6 "), más preferiblemente desde 2 hasta 3 ("alquínilo C_2-C_3 "), 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.
- 30 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.

- 40 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.

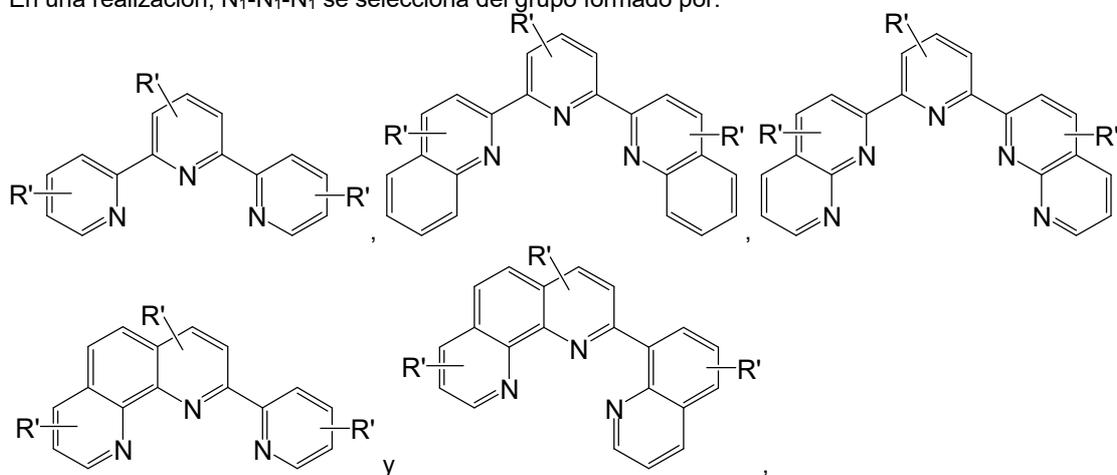
Los grupos mencionados anteriormente pueden estar opcionalmente sustituidos en una o más posiciones disponibles con uno o más grupos adecuados tales como OR, SR, SOR, SO_2R , OSO_2R , SO_3R , $SO_3 \cdot Z^+$, NO_2 , $N(R)_2$, $N(R)COR$, $N(R)SO_2R$,

5 CN, halógeno, COR, CO₂R, CO₂Z⁺, OCOR, OCO₂R, OCONHR, OCON(R)₂, CONHR, CON(R)₂, alquilo C₁-C₆, alqueno 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, alqueno C₂-C₆, alquinilo C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄, y heterociclilo de 3 a 10 miembros, y donde Z es un catión monovalente, preferiblemente inorgánico, como por ejemplo catión sódico o potásico. En una realización particular, de entre 1 a 5 ligandos aza-aromáticos en un compuesto de fórmula (I), preferiblemente 2 o 3, están sustituidos en posición *para* por un grupo sulfonato (SO₃⁻Z⁺) o carboxilato (CO₂⁻Z⁺).

10 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⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, SCN⁻, BrO₃⁻, IO₃⁻, HCO₃⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻, CF₃CO₂⁻, HSO₄⁻, HSO₃⁻ y H₂PO₃⁻.

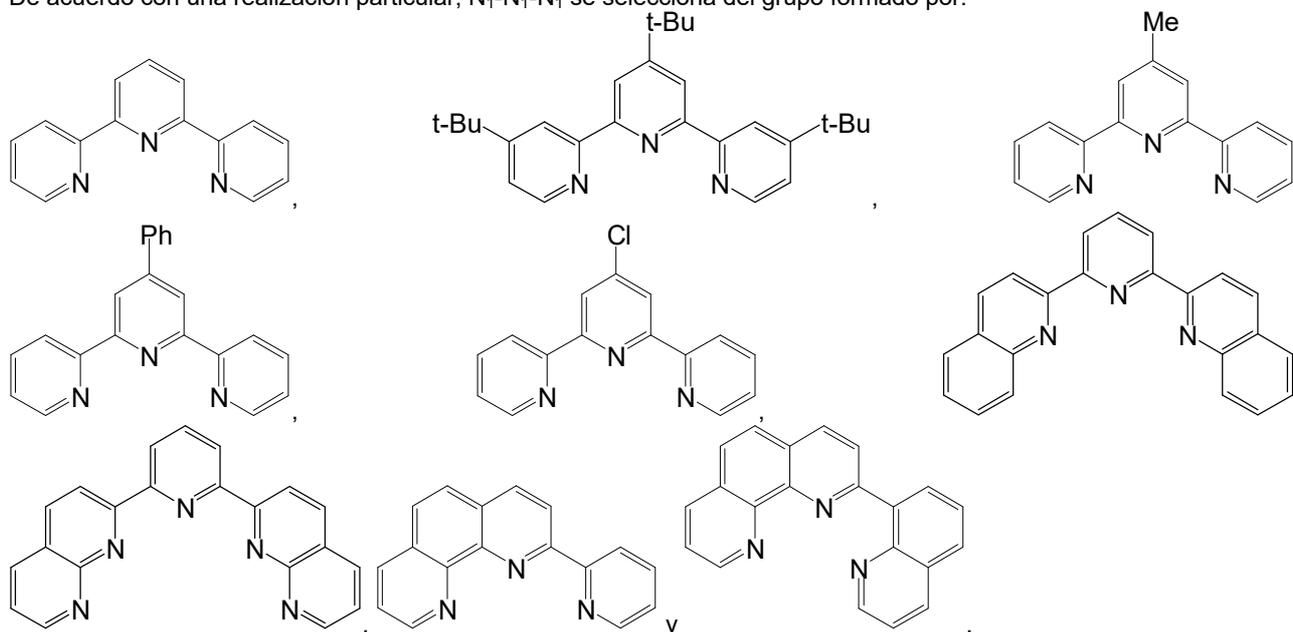
15 En una realización particular, N₁-N₁-N₁ es un ligando aza-aromático N,N,N-tridentados seleccionado del grupo formado por 2,2':6',2''-terpiridina, 2,6-bis(2'-benzimidazolil)piridina, 2,6-bis(8'-quinolinil)piridina, 2,6-bis(2'-[1,8]-naftiridinil)piridina, 2-piridinil-2-[1,10]-fenantrolina y 2-quinolinil-8-[1,10]-fenantrolina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

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, sulfonato, carboxilato, 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.

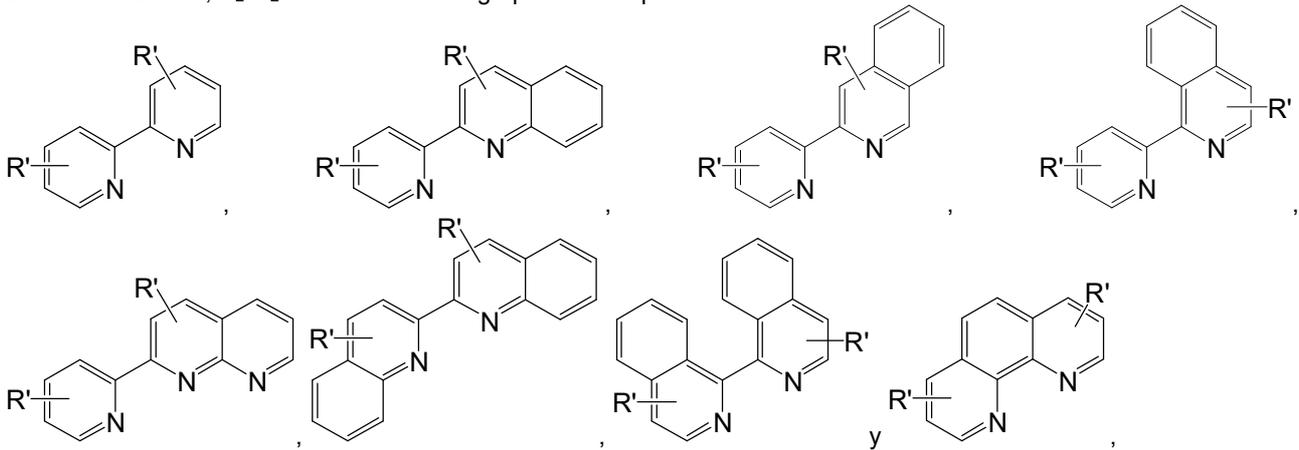
De acuerdo con una realización particular, N₁-N₁-N₁ se selecciona del grupo formado por:



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, sulfonato, carboxilato, o halógeno; más preferiblemente 2,2':6',2''-terpiridina opcionalmente sustituida con Cl, Br, sulfonato, carboxilato, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6',2''-terpiridina.

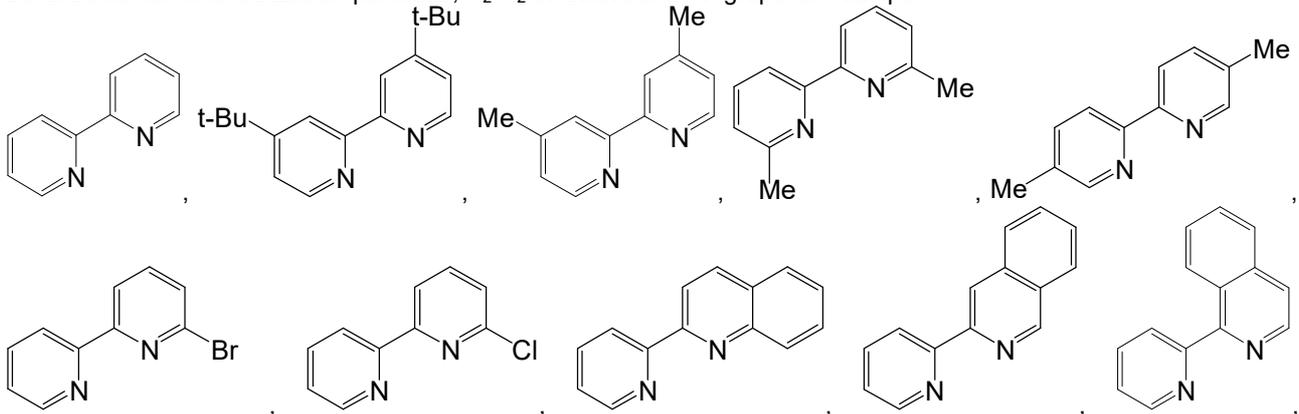
De acuerdo con una realización particular de la invención, N₂-N₂ es un ligando aza-aromático N,N-bidentados seleccionado del grupo formado por 2,2'-bipiridina, 2,2'-bipirazina, 2,2'-bipirimidina, 1,10-fenantrolina, batofenantrolina, 2,2'-bisquinolina, 1,1'-bisoquinolina, 2-piridinil-2-quinolina, 3-piridinil-2-quinolina,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

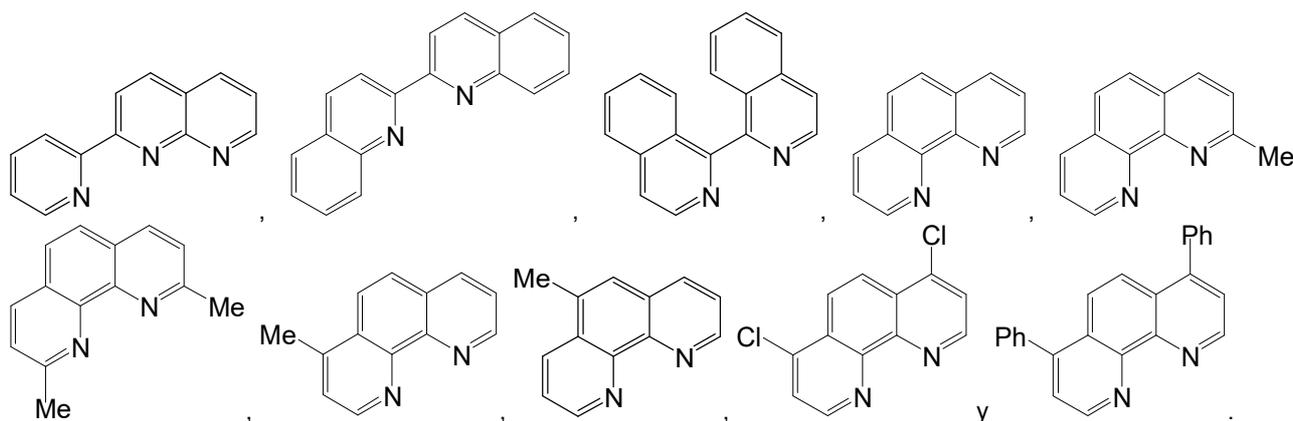
En una realización, N₂-N₂ se selecciona del grupo formado por:



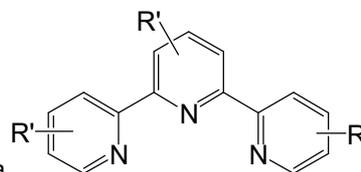
en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, sulfonato, carboxilato, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno. Preferiblemente, cada grupo R' se selecciona independientemente 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, sulfonato, carboxilato, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular cada grupo R' es hidrógeno.

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



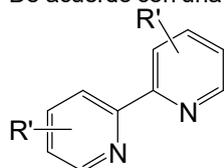


5 En otra realización, N₂-N₂ representa 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida. Preferiblemente, N₂-N₂ se selecciona de 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida con alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₄, heteroarilo de 5 a 10 miembros, sulfonato, carboxilato, o halógeno; más preferiblemente 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida con Cl, Br, sulfonato, carboxilato, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo y t-butilo. En una realización particular N₂-N₂ representa 2,2'-bipiridina.



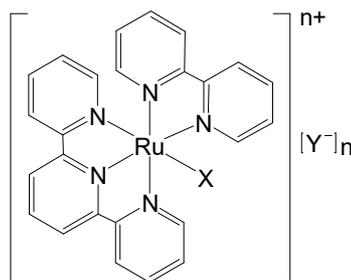
De acuerdo con una realización de la invención, N₁-N₁-N₁ representa

y N₂-N₂ representa



10 , donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, sulfonato, carboxilato, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

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



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

20 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.

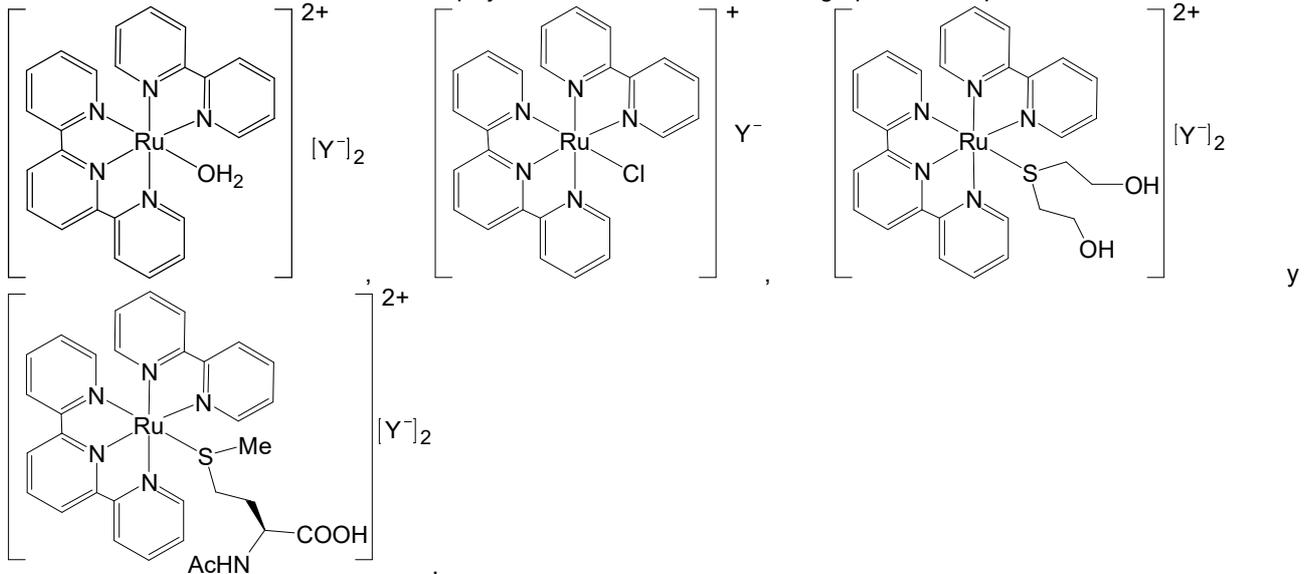
25 En una realización particular, X representa OH₂. Preferiblemente, N₁-N₁-N₁ representa 2,2':6',2''-terpiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente, N₂-N₂ representa 2,2'-bipiridina opcionalmente sustituida tal y como se ha definido previamente y X representa OH₂.

30 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, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de OR^{''}, N(R^{''})COR^{''} y CO₂R^{''}, donde cada grupo R^{''} se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆, alquino C₂-C₆, arilo C₆-C₁₄ y heterociclilo de 3 a 10 miembros. Más preferiblemente, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de OH, N(H)COCH₃ y CO₂H. En una realización, R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de CH₃, CH₂CH₂OH y CH₂CH₂CH(COOH)N(H)COCH₃.

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.

En una realización particular, Y⁻ se selecciona del grupo formado por PF₆⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻, BF₄⁻, CF₃SO₃⁻, CH₃SO₃⁻, CH₃C₆H₄SO₃⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, SCN⁻, BrO₃⁻, IO₃⁻, HCO₃⁻, HCOO⁻, CH₃COO⁻, HSO₄⁻, HSO₃⁻ y H₂PO₃⁻. Preferiblemente, Y⁻ se selecciona del grupo formado por PF₆⁻, Cl⁻, Br⁻, BF₄⁻, CF₃SO₃⁻, CH₃SO₃⁻ y CH₃C₆H₄SO₃⁻. En una realización, Y⁻ es Cl⁻ o PF₆⁻, preferiblemente PF₆⁻.

Los complejos de rutenio de la presente invención se pueden obtener mediante métodos conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, mediante los procedimientos mencionados en los ejemplos de este documento o modificaciones de los mismos conocidas por el experto en la materia.

Conjugados de complejo de Ru y un sustrato de ABCG2

Los inventores han observado que la unión del complejo de rutenio a un sustrato de ABCG2, como por ejemplo riboflavina, permite dirigir los complejos de rutenio a las células madre cancerosas.

Por tanto, en otro aspecto la invención se dirige a un conjugado que comprende:

- un complejo de rutenio de fórmula (I), y
- un sustrato de ABCG2.

“ABCG2”, tal y como se usa en la presente invención, se refiere a un miembro de la superfamilia de transportadores de ATP, que se sabe que contribuye a la resistencia a múltiples fármacos (MDR) en la quimioterapia contra el cáncer. La secuencia de la proteína codificada por el gen ABCG2 en humanos corresponde con la secuencia con número de acceso Q9UNQ0 de la base de datos de Uniprot a fecha 5 de noviembre de 2016.

“Sustrato de ABCG2”, tal y como se usa en la presente invención se refiere a un compuesto que puede ser transportado por el transportador ABCG2, que son particularmente aniones conjugados hidrofílicos, más particularmente sulfatados o moléculas hidrofóbicas. Un experto en la materia puede identificar si un compuesto es un sustrato de ABCG2, por ejemplo mediante el empleo de ensayo de ATPasa usando membranas Sf9 o en ensayo mostrado en Glavinas H. et al., Drug Metab Dispos. 2007 Sep;35(9):1533-42

En una realización particular, el sustrato de ABCG2 es un inhibidor de tirosina quinasas tales como imatinib y gefitinib, flavopirodol y las campoptequinas topotecan, irinotecan y su metabolito activo SN-38 [7-etil-10-hidroxi-camptotecina] o mitoxantrona. Otros sustratos incluyen drogas tales como cimetidina, prazosin, estatinas y zidovudina. Adicionalmente, otros sustratos de ABCG2 son estrona, 17β estradiol, porfirinas tales como heme, protoporfirina IX y 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina. En otra realización el sustrato de ABCG2 es un agente quimioteráutico tal como amsacrina, asparaginasa, azatioprina, bisantreno, bleomicina, busulfan, capecitabina, carboplatino, carmustino, clorambucil, cisplatino, cladribino, clofarabino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etoposido, flavopiridol, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, hidroxiurea, leucovorina, daunorubicina liposomal, liposomal doxorubicina, lomustina, mecloretamina, melfalan, mercaptopurina, mesna, methotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, pentostatina, procarbazona, satraplatino, streptozocina, tegafur-uracilo, temozolomida, teniposida, tioguanina, tiotepa, treosulfan, topotecan, vinblastina, vincristina, vindesina, SN-38 and vinorelbina.

En una realización particular, el sustrato de ABCG2 es un compuesto fluorescente. A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo el compuesto fluorescente puede ser riboflavina, D-luciferina, rodamina 123, feoforbido a, BODIPY-prazosin, Hoechst 33342.

En una realización aún más preferida, el sustrato de ABCG2 fluorescente es riboflavina. Por "riboflavina" tal y como se usa en la presente invención se refiere a la vitamina B2 con número CAS 83-88-5.

Preferiblemente, el complejo de rutenio y el sustrato de ABCG2 se unen covalentemente. El complejo de rutenio y el sustrato de ABCG2 pueden estar unidos directamente o, alternativamente, pueden estar unidos a través de un linker o espaciador. Por tanto, en una realización particular, el conjugado comprende un complejo de rutenio de fórmula (I), un sustrato de ABCG2 y un linker.

El término "linker", también denominado "espaciador" o "ligador", tal como se usa en este documento, se refiere a un grupo o resto químico que se une covalentemente al complejo de rutenio y al sustrato de ABCG2. Incluye compuestos que comprenden o derivan de radicales divalentes, tal como alqueno, arileno o heteroarileno.

En una realización particular, el complejo de rutenio y el sustrato de ABCG2 se encuentran unidos a través de un linker. En una realización particular, el linker es una cadena hidrocarbonada de entre 1 y 20, preferiblemente entre 1 y 10, más preferiblemente entre 1 y 6 átomos de longitud, donde uno o más de los átomos de carbono de la cadena puede estar reemplazado por un heteroátomo seleccionado de NR', O y S, donde R' se selecciona de H, alquilo C₁-C₆ y acetilo; y donde uno o más de los átomos de carbono de la cadena puede estar sustituido por un sustituyente seleccionado de =O, OH, SH, NH₂, COOH, CH₃ y Ph.

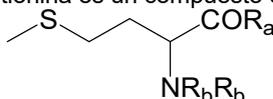
En una realización particular, el linker es un aminoácido o una secuencia de aminoácidos, preferiblemente entre 1 y 5 aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos. El término "aminoácido" se refiere a compuestos que tienen un grupo amino y un grupo ácido carboxílico e incluye tanto aminoácidos naturales como aminoácidos no naturales. La configuración del aminoácido puede ser L, D o una mezcla racémica.

El experto en la materia puede determinar los grupos funcionales presentes en el linker y el modo de unión al complejo de rutenio y al sustrato de ABCG2, en función del complejo de rutenio y del sustrato de ABCG2 utilizados. Preferiblemente, el linker se une al complejo de rutenio y al sustrato de ABCG2 mediante enlaces de tipo amida, amina, éter o éster.

Preferiblemente, el complejo de rutenio en el conjugado es un complejo de fórmula (I) en el que X es SR₁R₂, donde R₁ y R₂ son como se han definido anteriormente. Una vez que el conjugado se encuentra en el sitio de acción o cerca del mismo, es posible liberar el complejo activo (X=OH₂) mediante irradiación con luz tal y como se describe en este documento. De esta forma, es posible disponer de un derivado no activo que se puede manejar cómodamente y activar de forma controlada en el momento y lugar en el que se desea que actúe. En una realización particular, SR₁R₂ es metionina o un derivado del mismo.

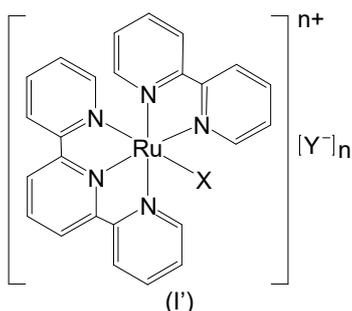
El término "derivado de metionina" se refiere fundamentalmente a derivados sustituidos, preferiblemente en el grupo amino y/o ácido carboxílico de la metionina. Derivados de metionina incluyen ésteres de alquilo C₁-C₆, acetatos, amidas, C₁-C₆alquil aminas y C₁-C₆dialquil aminas de metionina.

En una realización preferida, el derivado de metionina es un compuesto de fórmula:



donde
Ra se selecciona de OH, O-alquilo C₁-C₆, OAc, NH₂, NH- alquilo C₁-C₆, N(alquilo C₁-C₆)₂, y NHAc; y
cada Rb se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆ y Ac.

En una realización, el complejo de rutenio es un complejo de fórmula (I')



donde X es SR_1R_2 tal y como se ha definido anteriormente, preferiblemente X es metionina o un derivado del mismo.

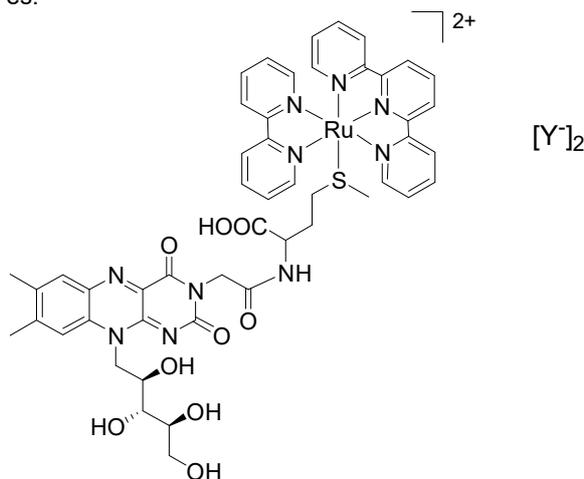
5 En una realización particular, el complejo de rutenio es un complejo de fórmula (I') donde SR_1R_2 es metionina o un derivado del mismo, preferiblemente metionina, y se une directamente al sustrato de ABCG2, preferiblemente a través del grupo amino o del grupo ácido carboxílico.

10 En otra realización, el complejo de rutenio es un complejo de fórmula (I') donde SR_1R_2 es metionina o un derivado del mismo, preferiblemente metionina, y se une al sustrato de ABCG2 mediante un linker, preferiblemente a través del grupo amino o del grupo ácido carboxílico.

En una realización particular, el conjugado comprende:

- 15
- un complejo de rutenio de fórmula (I) en el que X es metionina,
 - riboflavina, y
 - opcionalmente, un linker unido covalentemente a la metionina del complejo de rutenio y a la riboflavina.

En una realización, el conjugado es:



20 donde Y es como se ha definido anteriormente, preferiblemente Y es $CF_3CO_2^-$.

El conjugado de la invención presenta diversas ventajas. Permite un transporte preciso del complejo activo al sitio de acción, reduciéndose la dosis necesaria, y permite actuar selectivamente sobre las células cancerosas, evitando el ataque a las células normales.

25 Estos conjugados se pueden obtener mediante técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia. Si el complejo de rutenio y el sustrato de ABCG2 no contienen grupos funcionales adecuados para unirse químicamente, se pueden derivatizar para lograr la unión deseada. Alternativamente, el complejo de rutenio y el sustrato de ABCG2 se pueden unir (directamente o tras derivatización) a través de un linker bifuncional mediante reacciones conocidas por el experto en la materia.

30

Composiciones farmacéuticas

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

Tal y como se usa en este documento, la expresión “composición farmacéutica” se refiere a 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.

5 Los complejos de rutenio o los conjugados se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una “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 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 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 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.

20 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).

45 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 o los conjugados 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 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, 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 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.

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

- 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 sustancias, dando lugar a la posibilidad de una administración simultánea, secuencial o separada.

En una realización particular, el complejo de rutenio de fórmula (I) o el conjugado y el fármaco antitumoral se administran de manera independiente (es decir, en dos formas de dosificación) pero al mismo tiempo. En otra realización particular, el complejo de rutenio de fórmula (I) o el conjugado se administra primero, y a continuación se administra el otro fármaco antitumoral separada o secuencialmente. En una realización particular adicional, el otro fármaco antitumoral se administra primero y a continuación se administra el compuesto de fórmula (I) o el conjugado, separada o secuencialmente, según se defina.

El término “fármaco anticancerígeno” o “fármaco antitumoral”, 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.

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.;
- 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 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), 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:

- 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, 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 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.

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.

Otros agentes anticancerígenos o antitumorales 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
 - otros agentes antitumorales, tales como 17-(alilamino)-17-desmetoxigel danamicina, apigenina, cimetidina, hormona liberadora de la hormona leutinizante, y pifitrina α .
- 5 Alternativamente, el complejo de rutenio y el fármaco antitumoral pueden estar unidos formando un conjugado. Por tanto, en otro aspecto la invención se dirige a un conjugado que comprende:
- un complejo de rutenio de fórmula (I), y
 - un fármaco antitumoral.
- 10 Preferiblemente, el complejo de rutenio y el fármaco antitumoral se unen covalentemente de forma directa o a través de un linker o espaciador. Por tanto, en una realización particular, el conjugado comprende un complejo de rutenio de fórmula (I), un fármaco antitumoral y un linker.
- Realizaciones particulares y preferidas para el linker, el complejo de rutenio y el modo de unión, son tal y como se han definido anteriormente en relación al conjugado del complejo de rutenio con el sustrato de ABCG2.

Usos

- 20 Un aspecto de la invención es el uso de un complejo de rutenio o un conjugado tal como se define en este documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un complejo de rutenio o un conjugado tal como se define en este documento para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas.
- 25 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas, que comprende administrar a un paciente que necesita de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de rutenio o un conjugado tal como se define en este documento.
- 30 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 “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
- 35 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., 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 vasculares, etc.
- 40 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.
- 45 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),
- 50 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 (Szotecz 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).
- En una realización particular, el cáncer que comprende células madre cancerosas 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.
- 55 El término “neoplasia hematológica”, tal como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un grupo heterogéneo 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 linfóide asociado a mucosas). Las neoplasias hematológicas, atendiendo a su origen, pueden ser mieloides o linfoides.
- 60 Las neoplasias hematológicas mieloides incluyen:

- Neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMP): incluyen Leucemia mieloide crónica, BCR-ABL positiva, Leucemia neutrofilica 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 mieloide 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 mieloide, Proliferaciones mieloides relacionadas con el Síndrome de Down y Neoplasia de celulas blasticas dendríticas plasmocitoide.
- 15 - Leucemias agudas de linaje ambiguo.

Las neoplasias hematológicas linfoides incluyen:

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

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 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-/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-).

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 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.

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 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 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.

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.

En una realización particular, las células madre cancerosas presentan bajos niveles de expresión de c-MYC.

5 El término "c-MYC", tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica una fosfoproteína nuclear multifuncional que participa en la progresión del ciclo celular, apoptosis y transformación celular. La proteína c-MYC en humanos tiene la secuencia mostrada en la base de datos Uniprot con número de acceso P01106 a fecha 2 de noviembre de 2016.

10 El término "nivel de expresión" de un gen como se usa aquí se refiere a la cantidad medible de producto del gen en unas células, en el que el producto del gen puede ser un producto de la transcripción o un producto de la traducción. En consecuencia, el nivel de expresión puede corresponder a un producto de ácido nucleico del gen tal como ARNm o ADNc o un producto polipéptido del gen.

15 Como entiende el experto en la materia, la cuantificación del nivel de expresión del gen c-MYC puede realizarse mediante la cuantificación de los niveles de expresión de la proteína codificada por dicho gen, es decir, c-MYC o bien mediante la determinación de la actividad de dicha proteína. La actividad de c-MYC puede determinarse empleando diversos ensayos conocidos por el experto en la materia, a modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, determinando la actividad transcripcional.

20 El nivel de expresión de la proteína puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en unas células, tal y como Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks.

25 Por otro lado, la cuantificación de los niveles de expresión de un gen se puede determinar midiendo los niveles del ARN resultante de la transcripción de dicho gen (ARN mensajero o ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm del gen de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, RT-PCR, etc.

30 Por "niveles bajos de expresión", tal y como se usa en la presente invención, se refiere al nivel de expresión de un gen inferior al valor de referencia. En particular, se puede considerar que unas células presentan niveles bajos de expresión de c-MYC cuando los niveles de expresión en las células son al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces o 100 veces inferior o incluso menores con respecto al valor de referencia

35 "Valor de referencia", como se usa aquí, se refiere a un valor obtenido en el laboratorio y utilizado como referencia para los valores de expresión de c-MYC. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor de la mediana, un valor medio, o un valor en comparación a un control determinado o valor de referencia. El valor de referencia puede estar basado en un valor de la muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra de células madre cancerosas de un sujeto. El valor de referencia puede estar basado en un gran número de muestras, como los valores de expresión de c-MYC en muestras de células madre cancerosas de una población de sujetos. En una realización particular, el valor de referencia corresponde al nivel de expresión en un cáncer que no posee células madre cancerosas.

40 Los inventores han observado que la reacción de metalación aumenta al irradiar con luz. Por tanto, en una realización preferida, los complejos de rutenio o los conjugados 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.

45 Por tanto, en una realización la invención se dirige a un complejo de rutenio o un conjugado según se define en este documento para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas 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.

50 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento de cáncer que comprende células madre cancerosas, que comprende administrar a un paciente que necesita de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de rutenio o un conjugado según se define en este documento, y donde dicho método comprende irradiar ese

complejo o conjugado 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.

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

Adicionalmente, se ha observado que los complejos de rutenio de fórmula (I), y los correspondientes conjugados, en los que X se selecciona de SR₁R₂ 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 SR₁R₂.

15 Los siguientes ejemplos no limitativos pretenden ilustrar la presente invención y no deben interpretarse como limitaciones de su alcance.

Ejemplos

20 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 µm), 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.

25 Fases móviles:

a) **A:** H₂O que contiene 0,1% de TFA, **B:** ACN que contiene 0,1% de TFA.

GRADIENTE 1: 0% → 50% de B durante 40 min.

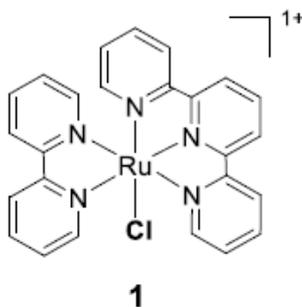
b) **A:** 95:5 H₂O:ACN que contiene 100 mM de TEAA, **B:** 70:30 ACN:H₂O que contiene 100 mM de TEAA.

GRADIENTE 2: 0% B durante 5 min seguido de 0% → 100% de B durante 55 min.

30 GRADIENTE 3: 10% → 50% de B durante 40 min.

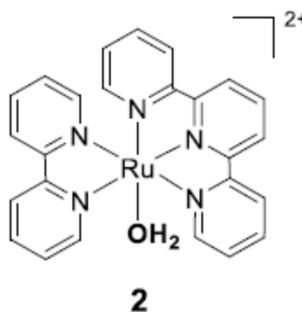
Ejemplo 1. Síntesis de los complejos de rutenio(II)

Ejemplo 1A. Síntesis del complejo 1



35 El complejo de rutenio **1** se preparó siguiendo el procedimiento descrito en Kaveevivitchai et al., *Inorg. Chem.* 2012, 51, 2930. Se disolvió RuCl₃·3H₂O (500 mg, 2 mmol) y 2,2':6',2'' terpiridina (460 mg, 1 equiv) en una mezcla H₂O:EtOH 1:1 desoxigenada (20 mL), y se calentó a reflujo durante 4h en la oscuridad. El precipitado resultante se lavó con EtOH (x3) y Et₂O y se utilizó directamente en una segunda etapa que implicó el tratamiento con 2,2'-bipiridina (312 mg, 1 equiv) en una mezcla H₂O:EtOH 1:1 desoxigenada (20 mL) y se calentó a reflujo durante la noche. Precipitación con un exceso de KPF₆ dio lugar a la sal [Ru(terpy)(bpy)Cl]PF₆ **1** como un polvo marrón en un 60% de rendimiento global (800 mg). EM-ESI⁺ (m/z): Calculado para C₂₅H₁₉ClN₅Ru: 525,0. Encontrado: 526,0 [M+1H]⁺.

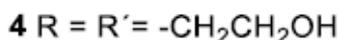
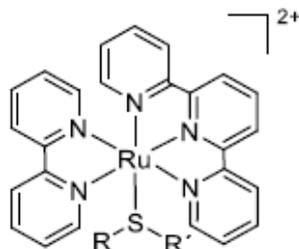
Ejemplo 1B. Síntesis del complejo 2



45

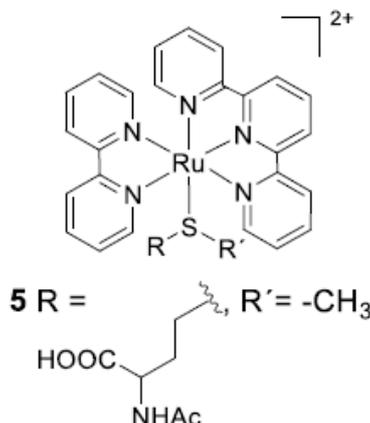
El complejo de rutenio **2** se preparó siguiendo un procedimiento modificado de la literatura (Takeuchi et al., Inorg. Chem. 1984, 23, 1845). El complejo **1** (150 mg, 0,22 mmol) se disolvió en una mezcla H₂O:EtOH 1:1 desoxigenada (20 mL) y se calentó a reflujo durante 1h. El crudo se concentró, y el producto se purificó mediante HPLC en fase reversa (HPLC-FR), 4 mL/min, gradiente 5 a 95% de B durante 35 min (A: H₂O 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 C₂₅H₂₁N₅ORu: 509,1. Encontrado: 508,0 [M-1H]⁺.

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 µL, 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]⁺.

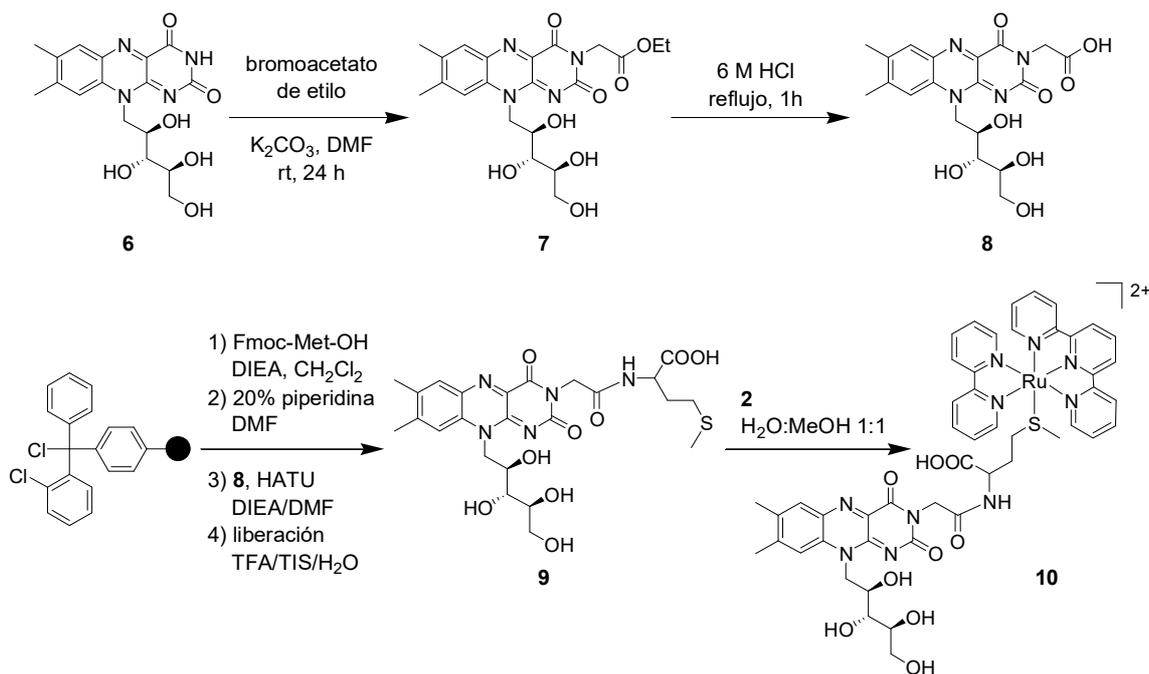
Ejemplo 1D. Síntesis del complejo **5**



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]⁺.

Ejemplo 1E. Síntesis del conjugado del complejo de rutenio con riboflavina **10**

Esta síntesis requiere mezclar en agua a 80°C y en la oscuridad el complejo **2** y un equivalente del ligando tioéter. Se puede monitorizar el curso de la reacción utilizando RP-HPLC. Tras purificación por RP-HPLC, se obtuvo el compuesto [**10**]⁺TFA₂ como un polvo marrón.



5 **Compuesto 7.** Se agitó una suspensión de riboflavina **6** (2 g, 5.3 mmol, 1.0 equiv), carbonato potásico (1.5 equiv, 8 mmol, 1.1 g), en 12 mL de DMF seco a temperatura ambiente durante 45 min bajo atmósfera inerte. Después, se añadió gota a gota una disolución de bromoacetato de etilo (2 equiv, 10.6 mmol, 1.1 mL) en 4 mL de DMF seco y se mantuvo la agitación hasta que se completó la reacción (24 h). Se evaporó el disolvente y el residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna (10% MeOH/ CH_2Cl_2) para obtener **7** como un sólido amarillo (1.2 g, 50%). 1H RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 8.08 (s, 1H), 8.00 (s, 1H), 4.82 (s, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.26 (q, J = 6.8 Hz, 2H), 3.85 (m, 4H), 3.69 (dd, J = 11.4, 6.0 Hz, 2H), 2.60 (s, 3H), 2.49 (s, 3H), 1.31 (t, J = 6.8 Hz, 3H). EMAR (ESI): Calculada para $C_{21}H_{26}N_4O_8$: 462,18. Encontrada: 463,2 $[M+1H]^+$.

10 **Compuesto 8.** Se suspendió el compuesto **7** (400 mg, 0.86 mmol) en HCl 6 M (15 mL) y se calentó a reflujo durante 1 h. La reacción se neutralizó con NaOH hasta aproximadamente pH 7, se diluyó con agua y se purificó mediante RP-Büchi Sepacore preparativo (gradiente: 5% B, 5 min; 15% \rightarrow 95% B, 40 min). se eliminó el disolvente a presión reducida dando lugar a un sólido amarillo (260 mg, 69%). 1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 7.71 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 4.87 (m, 1H), 4.59 (s, 2H), 4.23 (m, 1H), 3.78 (m, 4H), 3.60 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.28 (s, 3H). EMAR (ESI): Calculada para $C_{19}H_{22}N_4O_8$: 434,14. Encontrada: 435,2 $[M+1H]^+$, 457.1 $[M+1Na]^+$.

20 **Compuesto 9.** Se añadió una mezcla de Fmoc-Met-OH (371 mg, 1 mmol) y DIEA (695 μ L, 4 mmol, 4 equiv) sobre una suspensión de resina de 2-clorotritilo (0.25 mmol) en 2.5 mL de CH_2Cl_2 , y la mezcla se agitó durante 50 min. Se lavó la resina con $CH_2Cl_2/MeOH/DIEA$ (17:2:1) (3 x 5 mL, 2 min), CH_2Cl_2 (3 x 5 mL, 2 min), y se trató con 20% piperidina en DMF (1 x 5 mL, 10 min).

25 Se añadió una disolución del compuesto **8** (170 mg, 0.4 mmol), DIEA/DMF 0.2 M (8.2 mL, 1.6 mmol, 4 equiv) y HATU (152 mg, 0.4 mmol, 1 equiv) sobre la resina anterior (0.4 mmol) y se agitó la suspensión durante 50 min. Se lavó la resina con DMF (3 x 10 mL, 2 min) y CH_2Cl_2 (2 x 10 mL, 2 min) y después se trató con el cocktail desprotector (900 μ L TFA, 50 μ L CH_2Cl_2 , 25 μ L H_2O and 25 μ L TIS; 1 mL of cocktail / 40 mg resin) durante 1.5–2h. Tras filtración, el crudo se concentró a presión reducida.

30 El residuo obtenido tras la concentración se purificó mediante RP-Büchi Sepacore preparativo, gradiente: 5% B, 5 min; 15% \rightarrow 95% B, 40 min (A: H_2O que contiene 0.1% TFA, B: MeOH que contiene 0.1% TFA). Se recolectaron las fracciones apropiadas, se concentraron y se liofilizaron para obtener el producto **9** deseado como un polvo amarillo pálido (50 mg, 23%). 1H RMN (500 MHz, D_2O) δ 8.00 (s, 1H), 7.97 (s, 1H), 5.13 (m, 1H), 4.97 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 4.86 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 3.97 (m, 2H), 3.89 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.01 (m, 2H), 2.76 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 2.61 (s, 3H), 2.50 (s, 3H), 2.26 (m, 2H), 2.09 (s, 3H). EMAR (ESI): Calculada para $C_{24}H_{31}N_5O_9S$: 565,18. Encontrada: 566,19.

35 **Compuesto 10.** Se disolvieron el complejo **2** (35 mg, 0.07 mmol) y el compuesto **9** (40 mg, 1 equiv) en $H_2O:EtOH$ 1:1 desoxigenado (2 mL) y se calentó a reflujo durante la noche en la oscuridad. El producto se purificó por RP-HPLC, 4 mL/min, gradiente 5 a 95% B durante 35 min (A: H_2O que contiene 0.1% TFA, B: ACN que contiene 0.1% TFA). Se recolectaron las fracciones apropiadas, se concentraron y se liofilizaron para obtener el producto deseado **10** como un polvo marrón (10 mg, 13%). 1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 8.64 (dd, J = 19.0, 8.2 Hz, 2H), 8.48 (dd, J = 24.0, 8.1 Hz, 2H), 8.32 (m, 2H), 8.09 (m, 3H), 7.98 (m, 2H), 7.81 (m, 3H), 7.62 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 7.54 (m, 3H), 7.26 (m, 2H), 7.09 (t, J = 6 Hz, 1H), 5.15 (m, 1H), 4.91 (m, 2H), 4.60 (m, 1H), 4.50 (m, 2H), 3.97 (m, 2H), 3.86 (m, 1H), 3.73 (dd, J = 11.8, 5.8 Hz, 1H), 2.60 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 1.92 (m, 1H), 1.79 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.24 (s, 3H). EMAR (ESI): Calculada para $C_{49}H_{50}N_{10}O_9RuS$: 1056,25. Encontrada: 1055,25 $[M-1H]^+$.

Ejemplo 2. Ensayos de unión a GMP y c-MYC**Procedimiento general para los ensayos de metalación de ADNs utilizando irradiación**

5 Los oligonucleótidos (10 μ M) 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 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

15 En primer lugar se estudió la capacidad del complejo **1** para metalar el guanosín monofosfato (GMP). Para ello, se mezcló el complejo **1** (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 se observó la formación parcial (más del 50%) del complejo aquo [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 desaparición del GMP, Figura 1, línea c).

25 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 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. Tras irradiar a 455 nm durante 30 min se observó la formación del complejo aquo [Ru(terpy)(bpy)H₂O]²⁺ (**2**) y la modificación exclusiva del GMP dando lugar al monoadducto **3** (Figura 2).

30 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 μ M) con GMP (3 equiv, 750 μ M) en presencia de H-Lys(Boc)-OH (3 equiv, 750 μ M) o de Ac-Cys-OH (3 equiv, 750 μ M) 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).

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

35 Se trató una disolución 10 μ M 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).

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

45 Se mezcló el complejo **4** (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 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).

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

50 Se trató una disolución 10 μ M 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).

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

55 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).

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

65 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)

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 **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 **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

15 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.

20 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

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).

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

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 μ M 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).

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

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 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 mM, EDTA 0,1 mM, ditiotreitól 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 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.

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.

5 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*.

10 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.

15 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).

20 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.

25 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 |

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

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 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

40 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).

45 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 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.

Los inventores analizaron si el complejo **2** 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) establecidas a partir de xenoinjertos derivados de pacientes con un número bajo de pases, se trataron con el complejo de rutenio **2** (RuH₂O) 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** (RuH₂O) 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** (RuH₂O) 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.

Usando los complejos de la invención, se probó si el complejo RuH₂O **2** aumenta la expresión de c-MYC en cultivos de PDAC adherentes establecidos a partir de xenoinjertos con un bajo número de pases derivados de pacientes, para confirmar lo observado en células Hela. En línea con lo observado previamente, el tratamiento de las células Panc185 y PancA6L con 100 µM de RuH₂O aumentó la expresión de la proteína c-MYC 24 horas después del tratamiento (Figura 18). El efecto fue transitorio ya que se observó una notable disminución en los niveles de proteína c-MYC a las 48 horas después del tratamiento.

Además, se observó una reducción en la expresión de PGC1alfa, una diana conocida de c-MYC, y una reducción en los genes asociados a pluripotencia Oct3/4 y Sox2 después del tratamiento con 100 µM de RuH₂O durante 24 horas (Figura 19).

A continuación, se estudió si la expresión aumentada de c-MYC y los cambios fenotípicos y transcripcionales observados eran citotóxicos. Para este análisis, se utilizó el kit ToxiLight™ BioAssay, un kit de ensayo de citolisis bioluminiscente y no destructivo diseñado para medir la liberación de la enzima adenilato quinasa (AK) de las células dañadas (Figura 20). Cultivos adherentes (bajos en CMC) y esferas cultivadas (enriquecido en CMC) se trataron con dosis crecientes de RuH₂O y se midió la citotoxicidad a las 24, 48 y 72 horas después del tratamiento. En cultivos adherentes y en ambas líneas celulares ensayadas, sólo se observó toxicidad a las 72 horas (aumento de 3 veces en células muertas) cuando las células se trataron con RuH₂O 250 µM. Por el contrario, a concentraciones de 100 µM, RuH₂O indujo la muerte de las células en cultivos esféricos, lo que indica una selección selectiva de la población de CMC en las células Panc185 y PancA6L.

El efecto sobre los cultivos enriquecidos en CMC con RuH₂O 100 µM se confirmó a nivel microscópico y midiendo la tinción de Anexina V. Como se muestra en la Figura 21, las esferas tratadas durante 72 horas con 100 µM de RuH₂O fueron visualmente más pequeñas y apoptóticas. La viabilidad celular determinada por el porcentaje de células DAPI negativas se redujo en un 50%

Posteriormente, se evaluó si el complejo de rutenio **2** podría afectar negativamente a los fenotipos de CMC, como la autorrenovación y la tumorigenicidad. Para ello, los cultivos de PDAC adherentes establecidos a partir de xenoinjertos con un número bajo de pases derivados de pacientes, se trataron con el complejo de rutenio **2** (RuH₂O) a 250 µM durante 24 horas. Las células tratadas y no tratadas se tripsinizaron y los cultivos de esferas se establecieron siguiendo los protocolos estándar (Cioffi M et al. 2015 Gut 12: 1936-1948). Las células se cultivaron en placas de adherencia ultrabaja durante 7 días en DMEM/F12 sin suero y se suplementaron con B27. Durante estos 7 días, las muestras se volvieron a tratar con RuH₂O a 250 µM los días 1, 3 y 5 tras iniciación de las esferas. La Figura 22A muestra la secuencia de trabajo del experimento mencionado anteriormente. Como se muestra en la Figura 22B, se observó una reducción significativa en la capacidad de formación de esferas de células PDAC tratadas con RuH₂O en comparación con los cultivos tratados con control. Las esferas CMC fueron más pequeñas y menos abundantes en el grupo RuH₂O.

A continuación, se disociaron las esferas e inyectaron números iguales de células tratadas con control y células tratadas con RuH₂O por vía subcutánea en ratones NOD-SCID inmunocomprometidos para evaluar su capacidad tumorigénica. 12 semanas después de la inyección, los tumores se extrajeron y pesaron. En la Figura 23A se muestran los tumores extraídos. El tratamiento con RuH₂O redujo significativamente la capacidad de formación de tumores de las CMC enriquecidas con esferas. Mientras que 4 de 4 inyecciones y 5 de 6 inyecciones con 10.000 y 1.000 células tratadas con control, respectivamente, dieron lugar a tumores, sólo 1 de cada 6 inyecciones con 10.000 células tratadas con RuH₂O dio lugar a tumor. No se formaron tumores cuando se inyectaron 10 veces menos de células tratadas con RuH₂O (Figura 23B). Además, el único tumor que se desarrolló en el ratón inyectado con 10.000 células tratadas con RuH₂O pesó 53 veces menos que los tumores formados en los ratones tratados con control (0,0058 g frente a 0,3118 g).

Para descartar la posibilidad de que los efectos antes mencionados se debieran a efectos citotóxicos inespecíficos, se trataron cultivos adherentes (bajos en CMC) durante 48 horas con una dosis única de RuH₂O (100 o 250 µM) y se comprobó su posterior capacidad clonigénica, de auto-renovación y tumorigénica. Bajo estas condiciones experimentales,

- no se observó toxicidad usando nuestro ensayo ToxiLight (Figura 20). Los cultivos adherentes de PDAC establecidos a partir de xenoinjertos de bajo número de pases derivados de pacientes se trataron con RuH₂O a 100 o 250 μM durante 48 horas. Después, las células tratadas y no tratadas se tripsinizaron y se analizó el porcentaje de células apoptóticas. En línea con los ensayos de citotoxicidad, no se observó aumento en el porcentaje de células apoptóticas después del tratamiento con 100 o 250 μM de RuH₂O (Figura 24).
- Luego, las células tripsinizadas fueron: 1) colocadas en una placa a baja confluencia para evaluar su capacidad clonigénica (Figura 25); 2) cultivadas repetidamente en placas de adherencia ultrabaja en DMEM/F12 sin suero y suplementadas con B27 durante intervalos de 7 días para evaluar la capacidad de formación de esferas a través de múltiples generaciones (Figura 26); y 3) inyectadas subcutáneamente en ratones NOD-SCID para comprobar su capacidad tumorigénica como se describió anteriormente (Figura 27). La suma de estos datos muestra claramente que el tratamiento con RuH₂O impide la capacidad clonigénica, autorregenerativa y tumorigénica de las células PDAC.
- Por último, para investigar la capacidad de los complejos de la invención para dirigirse específicamente a CMC, se unió RuH₂O a riboflavina a través de un sulfuro de metionina (conjugado **10**) y se trataron las células con este compuesto modificado como se detalla. De nuevo, los cultivos adherentes de PDAC establecidos a partir de xenoinjertos con un número bajo de pases derivados de pacientes se trataron con Ru-riboflavina a 250 μM. Para activar el complejo de rutenio, las células se trataron con luz visible para liberar y activar RuH₂O. 24 horas después del tratamiento, las células tratadas y no tratadas se tripsinizaron y los cultivos de esferas se establecieron siguiendo los protocolos estándar (Cioffi M et al. 2015 Gut 12: 1936-1948). Las células se cultivaron en placas de adherencia ultrabaja durante 7 días en DMEM/F12 sin suero y se suplementaron con B27. El día 3 tras iniciación de las esferas, las células se trataron de nuevo con Ru-riboflavina a 250 μM. La Figura 28 muestra la secuencia de trabajo del experimento.
- Además, las células también fueron tratadas con fumitremorgina C (FTC), un inhibidor específico de ABCG2. Tras el primer tratamiento y activación con Ru-riboflavina, se realizó un análisis de qRT-PCR para evaluar los niveles de ARNm de cMYC, así como la expresión de genes relacionados con CMC conocidos, tales como los genes Klf4 y Oct3/4 asociados a pluripotencia. Las células tratadas con Ru-riboflavina en presencia o ausencia de FTC mostraron un aumento en los niveles de ARN de cMYC y una disminución de los transcritos relacionados con CMC Klf4 y Oct3/4 (Figura 29A). Para confirmar que Ru-riboflavina era capaz de acumularse en CMC, se midió la autofluorescencia por citometría de flujo en células tratadas con Ru-riboflavina durante 24 horas y se observó un aumento en la población de CMC autofluorescente, que pudo revertirse con FTC (Figura 29B).
- Por último, se estudió la capacidad tumorigénica de las CMC enriquecidas con esferas como se ha descrito anteriormente. El análisis de los tumores extraídos mostró una tendencia hacia la reducción y proliferación de tumores para las células tratadas con Ru-riboflavina en comparación con las células tratadas con control y con Ru-riboflavina/FTC (Figura 30).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Universidade de Santiago de Compostela
 Universidad Autónoma de Madrid
- 5 <120> Complejos de rutenio para el tratamiento del cáncer que comprende células madre cancerosas
- <130> P13928PC00
- 10 <150> ES2594499A1
 <151> 2016-11-10
- <160> 7
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 24
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cuádruplex c-Myc
- 25 <400> 1
 ttgagggtgg gtaggggtggg taaa 24
- <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador c-MYC sentido
- 35 <400> 2
 ctgaggagga acaagaagat gag 23
- 40 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador c-MYC antisentido
- 50 <400> 3
 tgtgaggagg ttgctgtg 19
- <210> 4
 <211> 20
 <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Cebador ALAS sentido
- 60 <400> 4
 gtttgagca atcacctcg 20
- 65 <210> 5
 <211> 20

ES 2 929 784 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Cebador ALAS antisentido

<400> 5
accctccaac acaacaacag 20

10
<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Cebador GAPDH sentido

<400> 6
20 ggtgtgaacc atgagaagta tga 23

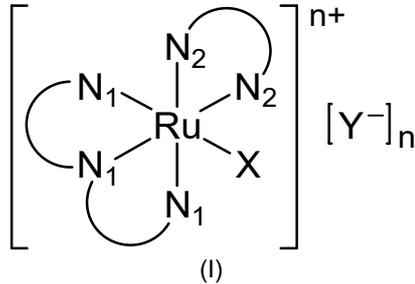
<210> 7
<211> 22
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador GAPDH antisentido

30
<400> 7
gagtcctcg atcaccacaa ag 22

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de rutenio de fórmula (I)



5

en donde

N₁-N₁-N₁ representa un ligando aza-aromático N,N,N-tridentado;

N₂-N₂ representa un ligando aza-aromático N,N-bidentado;

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

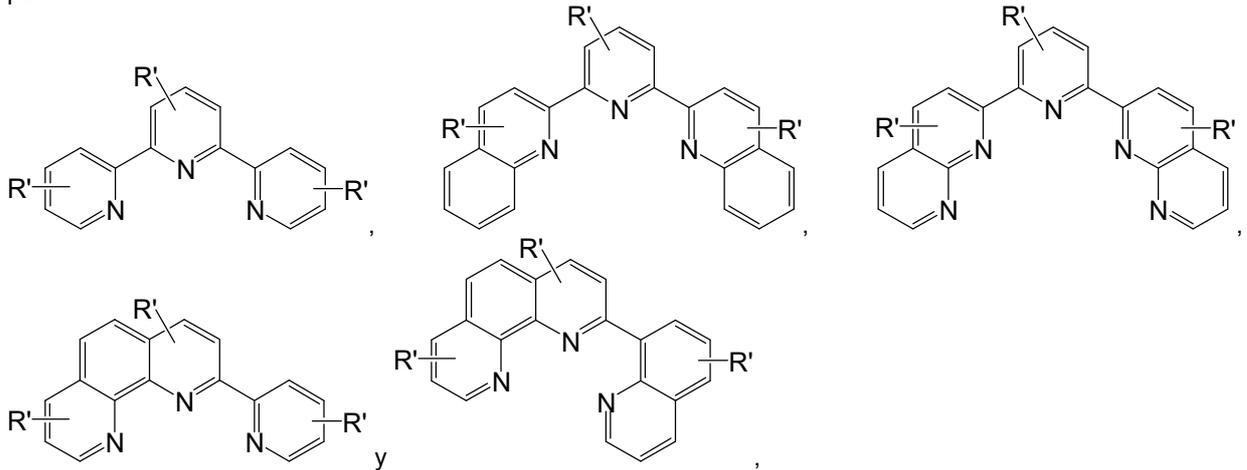
10 R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido;

Y⁻ es un anión monovalente; y

n es 1 o 2;

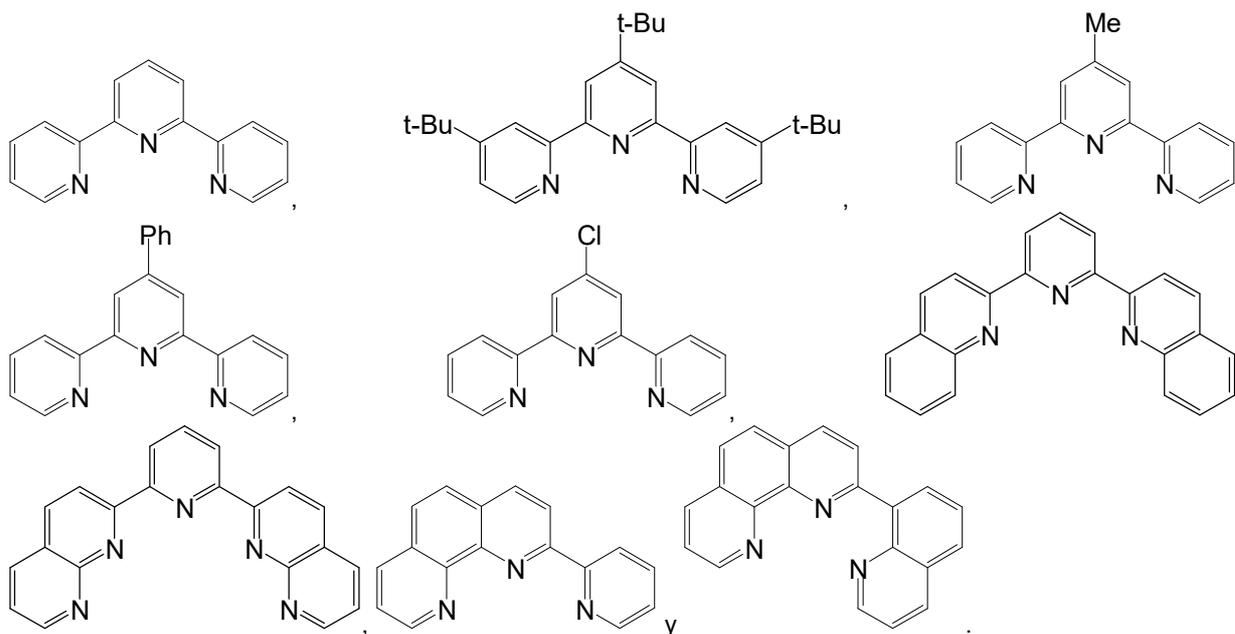
para su uso en el tratamiento de cáncer, donde el cáncer es un cáncer que comprende células madre cancerosas.

15 2. El complejo de rutenio para su uso según la reivindicación 1, en donde N₁-N₁-N₁ se selecciona del grupo formado por:

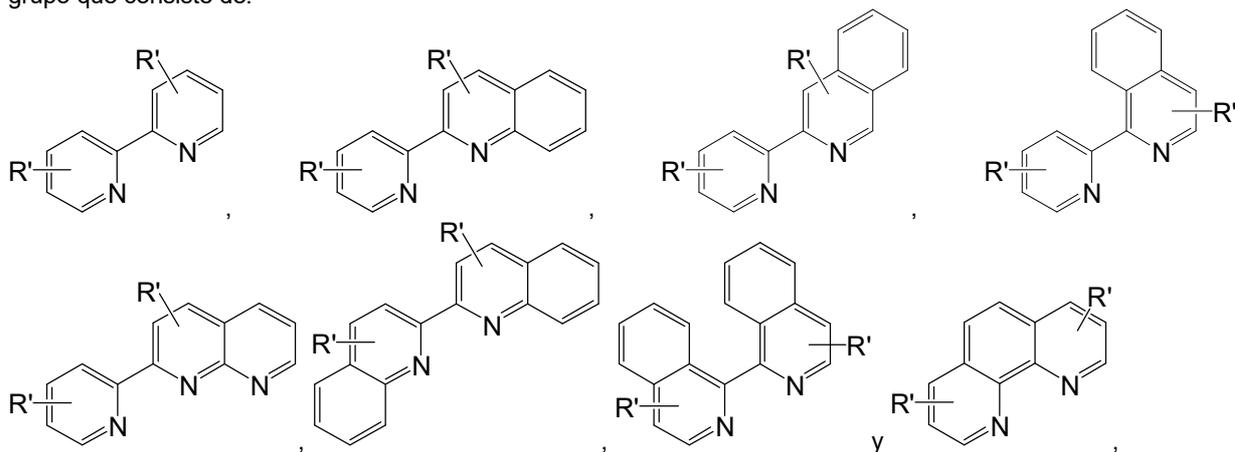


20

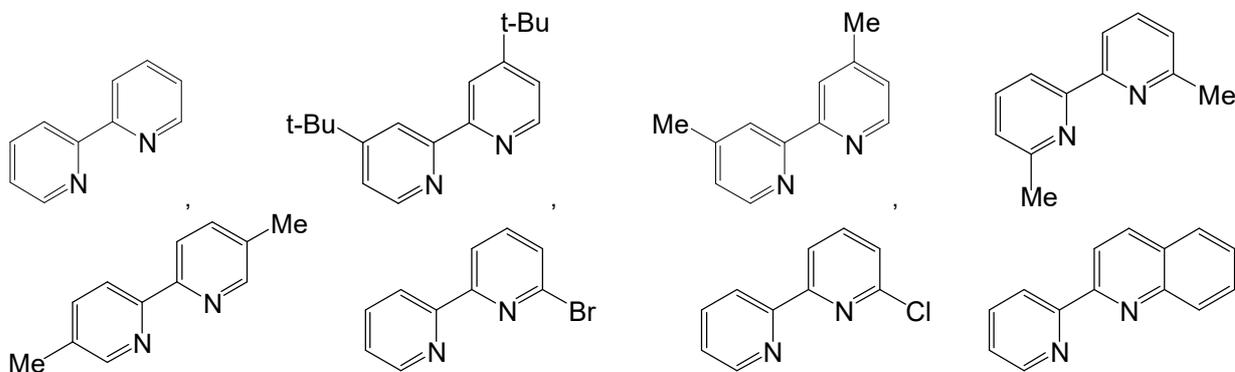
en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno, y en donde N₁-N₁-N₁ se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de:



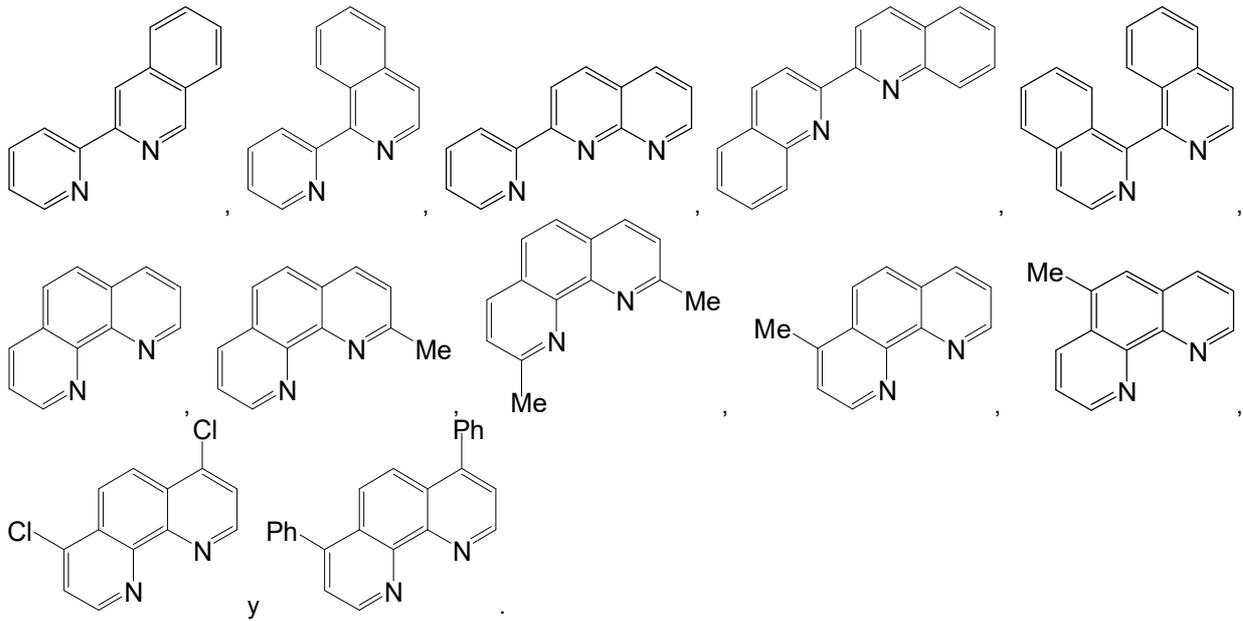
5 3. El complejo de rutenio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde N₂-N₂ se selecciona del grupo que consiste de:



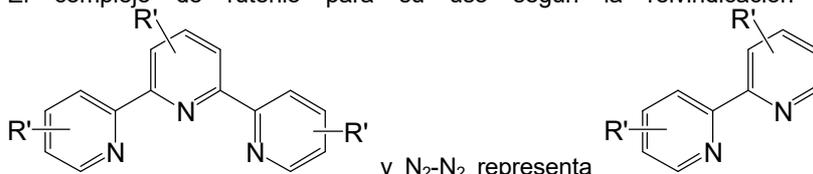
10 en donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C₁-C₆ opcionalmente sustituido, arilo C₆-C₁₄ opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno, y en donde N₂-N₂ se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en:

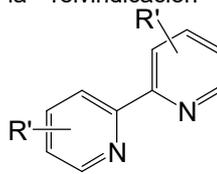


15

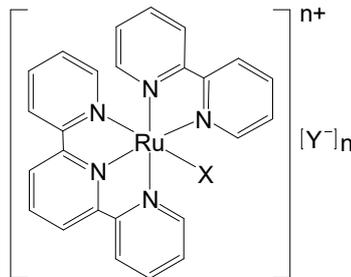


5 4. El complejo de rutenio para su uso según la reivindicación 1, en donde $N_1-N_1-N_1$ representa



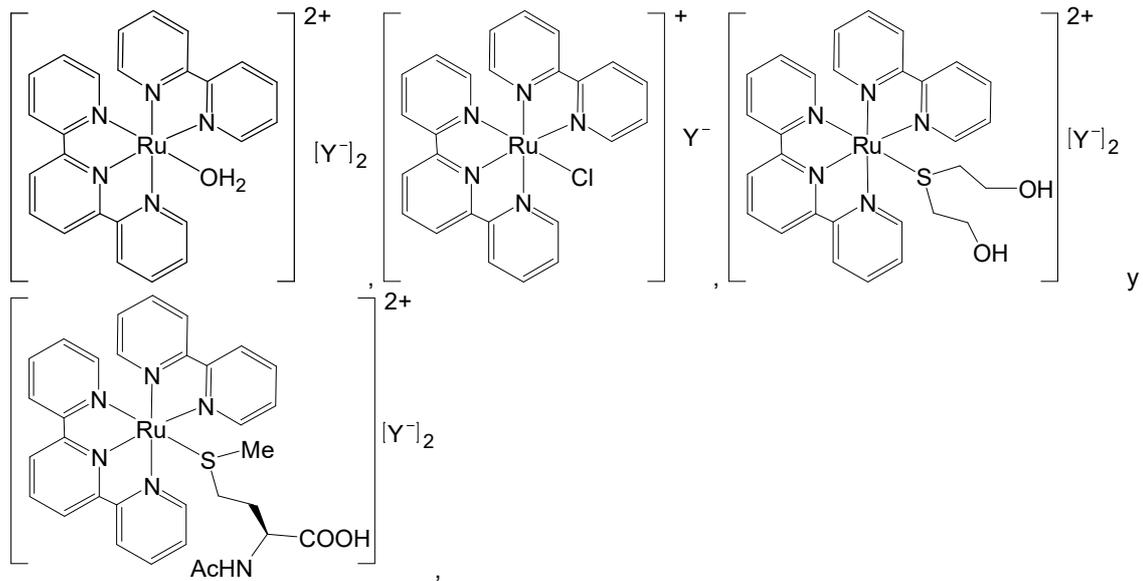
y N_2-N_2 representa , donde cada grupo R' se selecciona independientemente de hidrógeno, alquilo C_1-C_6 opcionalmente sustituido, arilo C_6-C_{14} opcionalmente sustituido, heteroarilo de 5 a 10 miembros opcionalmente sustituido y halógeno.

10 5. El complejo de rutenio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el complejo de rutenio presenta la siguiente fórmula:



15 en donde
 X se selecciona de OH_2 , Cl, Br, I y SR_1R_2 ;
 R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido; preferiblemente R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de alquilo C_1-C_{12} opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados de halógeno, OR'' , $N(R'')$, $N(R'')COR''$, CN, NO_2 , COR'' , CO_2R'' , $OCOR''$, OCO_2R'' , $OCONHR''$, $OCON(R'')_2$, $CONHR''$, $CON(R'')_2$, 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;
 20 Y^- es un anión monovalente; y
 n es 1 o 2;
 preferiblemente, en donde X representa OH_2 y n es 2.

25 6. El complejo de rutenio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el complejo de rutenio se selecciona del grupo que consiste de:



en donde Y⁻ es un anión monovalente.

5

7. El complejo de rutenio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 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 cervical, cáncer renal, y cáncer de páncreas; preferiblemente el cáncer es cáncer de páncreas; más preferiblemente el cáncer es adenocarcinoma de páncreas.

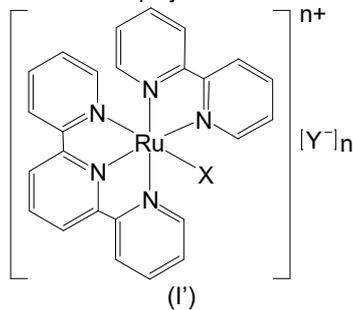
10

8. Un conjugado que comprende:

- un complejo de rutenio de fórmula (I), tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y un sustrato de ABCG2 o un fármaco antitumoral, seleccionado de imatinib, gefitinib, flavopirodól, topotecan, irinotecan, SN-38, mitoxantrona, cimetidina, prazosin, estatinas, zidovudina, estrona, 17β-estradiol, protoporfirina IX, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina, amsacrina, asparaginasa, azatioprina, bisantreno, bleomicina, busulfan, capecitabina, carboplatino, carmustino, clorambucil, cisplatino, cladribino, clofarabino, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, epirubicina, etoposido, flavopiridol, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, idarubicina, ifosfamida, irinotecan, hidroxiaurea, leucovorina, daunorubicina liposomal, liposomal doxorubicina, lomustina, mecloretamina, melfalan, mercaptopurina, mesna, methotrexato, mitomicina, mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, pentostatina, procarbazona, satraplatino, streptozocina, tegafur-uracilo, temozolomida, teniposida, tioguanina, tiotepa, treosulfan, topotecan, vinblastina, vincristina, vindesina, SN-38, vinorelbina, riboflavina, D-luciferina, rodamina 123, feoforbido a, BODIPY-prazosin, y Hoechst 33342; preferiblemente, el sustrato de ABCG2 es riboflavina.

20

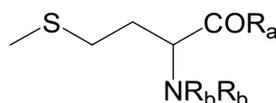
9. Conjugado según la reivindicación 8, donde el complejo de rutenio es un complejo de fórmula (I')



donde X, n e Y son como se definen en cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

30

10. Conjugado según la reivindicación 9, donde X en el complejo de rutenio de fórmula (I) representa SR₁R₂, donde R₁ y R₂ se seleccionan independientemente de alquilo C₁-C₁₂ opcionalmente sustituido; preferiblemente, X se selecciona de metionina o un derivado de metionina; más preferiblemente X es un compuesto de fórmula

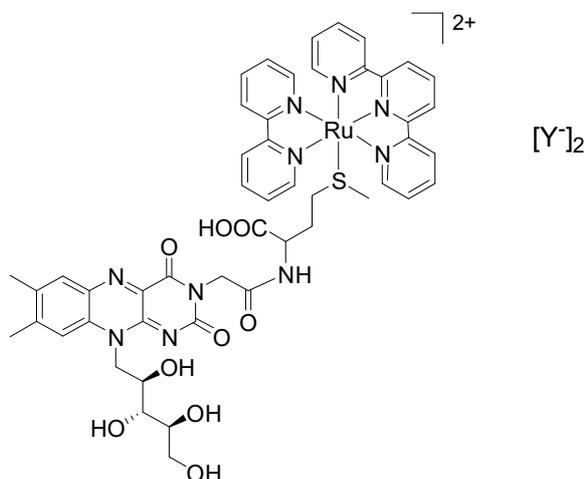


35

donde

Ra se selecciona de OH, O-alquilo C₁-C₆, OAc, NH₂, NH-alquilo C₁-C₆, N(alquilo C₁-C₆)₂, y NHAc; y cada Rb se selecciona independientemente de H, alquilo C₁-C₆ y Ac.

- 5 11. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el conjugado comprende un linker unido covalentemente al complejo de rutenio y al sustrato de ABCG2 o al fármaco antitumoral; preferiblemente en donde el linker es una cadena hidrocarbonada de entre 1 y 20 átomos de longitud, donde uno o más de los átomos de carbono de la cadena puede estar reemplazado por un heteroátomo seleccionado de NR', O y S, donde R' se selecciona de H, alquilo C₁-C₆ y acetilo; y donde uno o más de los átomos de carbono de la cadena puede estar sustituido por un sustituyente seleccionado de =O, OH, SH, NH₂, COOH, CH₃ y Ph; preferiblemente en donde el linker se selecciona de un aminoácido o una secuencia de aminoácidos unidos a través de enlaces peptídicos.
- 10
12. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende:
- un complejo de rutenio de fórmula (I), según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que X es metionina,
 - riboflavina, y
 - opcionalmente, un linker unido covalentemente a la metionina del complejo de rutenio y a la riboflavina; preferiblemente el conjugado presenta la siguiente estructura:
- 15



donde Y⁻ es un anión monovalente.

13. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso como medicamento.
- 25
14. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 para su uso en el tratamiento de cáncer, en donde el cáncer es un cáncer que comprende células madre cancerosas, y 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 cervical, cáncer renal y cáncer de páncreas; preferiblemente el cáncer es cáncer de páncreas; más preferiblemente adenocarcinoma de páncreas.
- 30
15. El complejo de rutenio para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el conjugado para su uso según la reivindicación 14, en donde el complejo de rutenio o el conjugado están en combinación con un agente terapéutico adicional.
- 35
16. El complejo de rutenio para su uso según la reivindicación 15, o el conjugado para su uso según la reivindicación 15, en donde dicho agente terapéutico adicional es un fármaco antitumoral.
- 40
17. El complejo de rutenio para su uso según la reivindicación 16, o el conjugado para su uso según la reivindicación 16, en donde dicho agente terapéutico adicional es administrado de manera simultánea, separada o secuencialmente con respecto al complejo de rutenio o al conjugado.

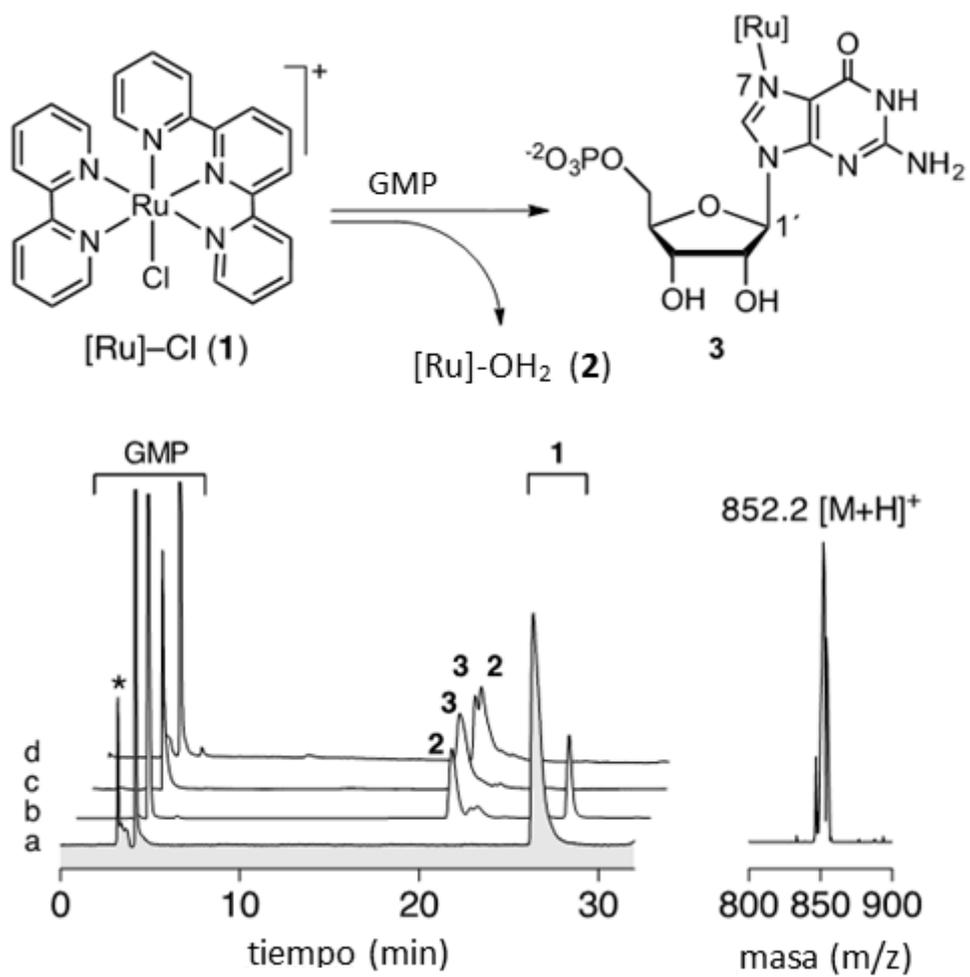


Fig. 1

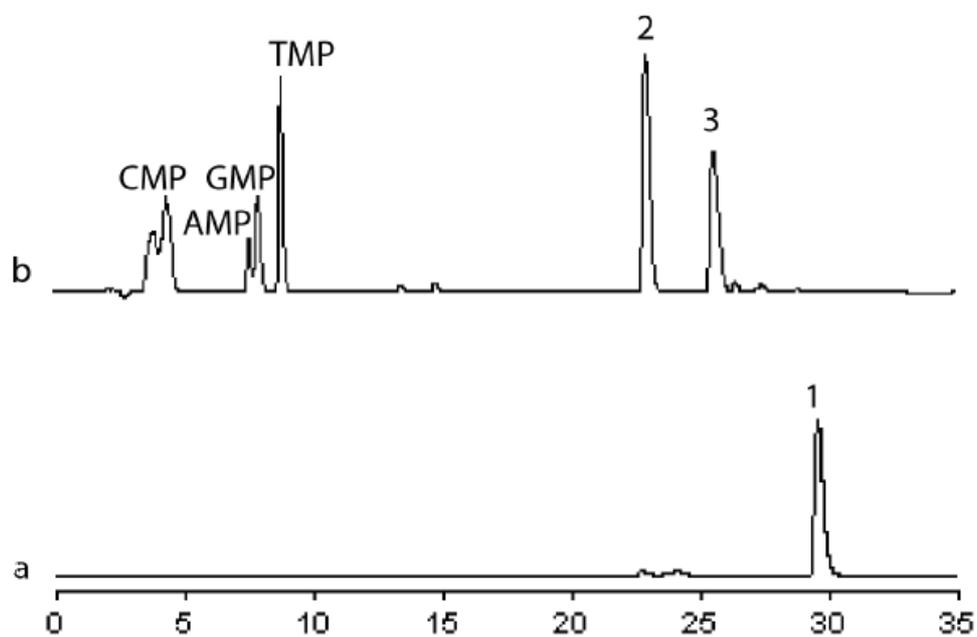


Fig. 2

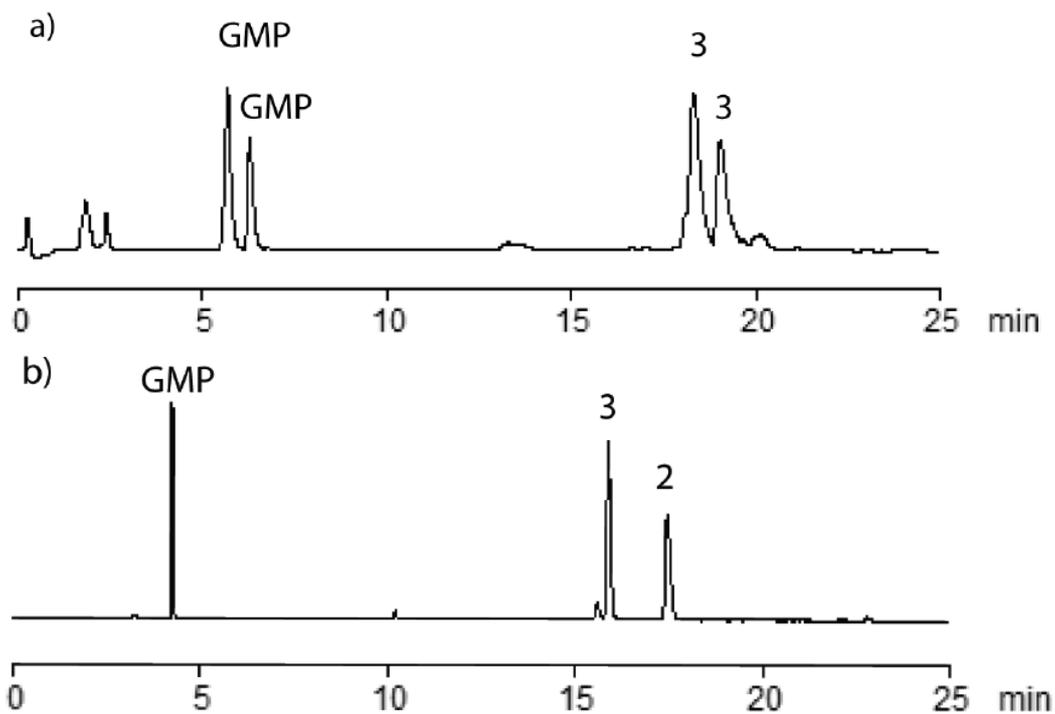


Fig. 3

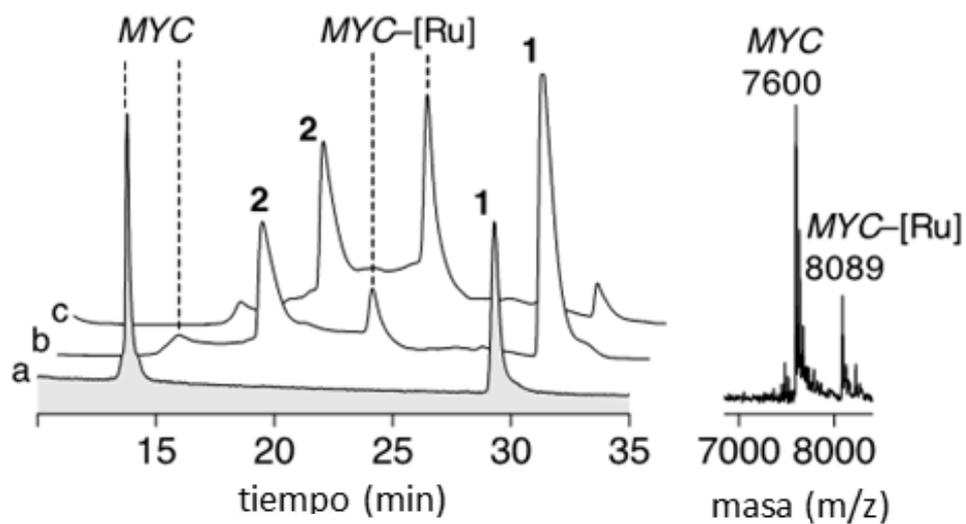


Fig. 4

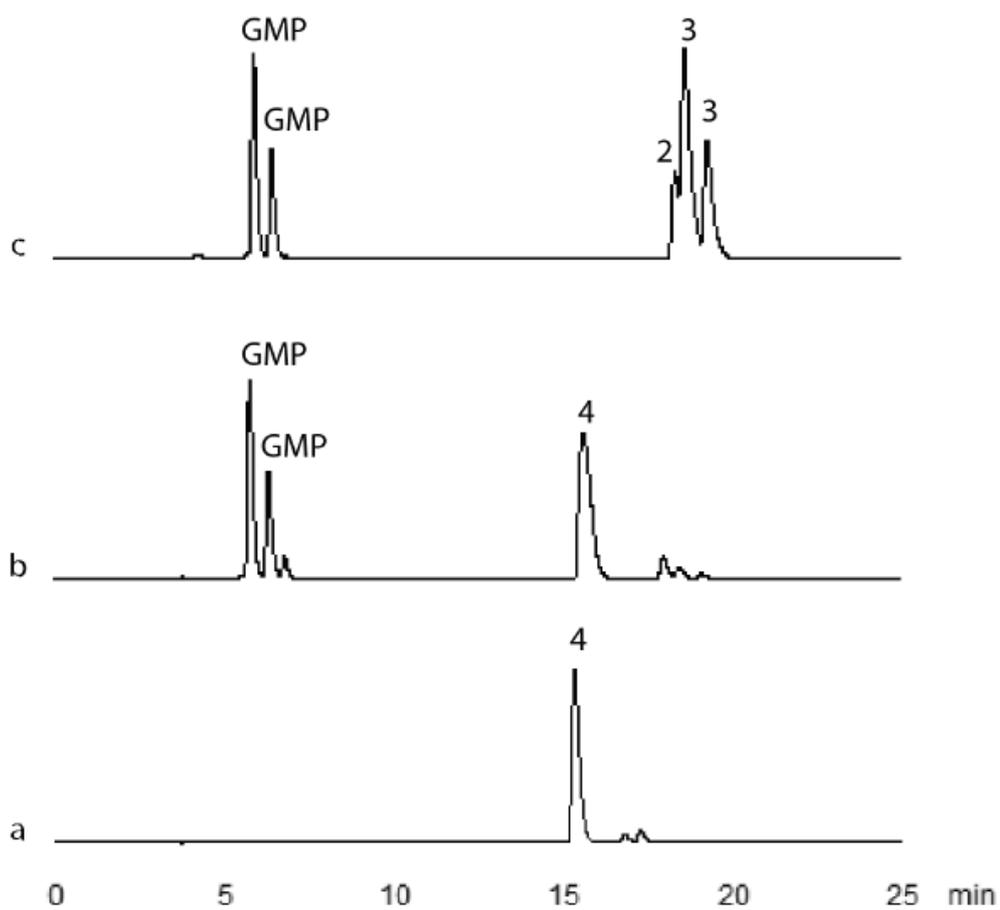


Fig. 5

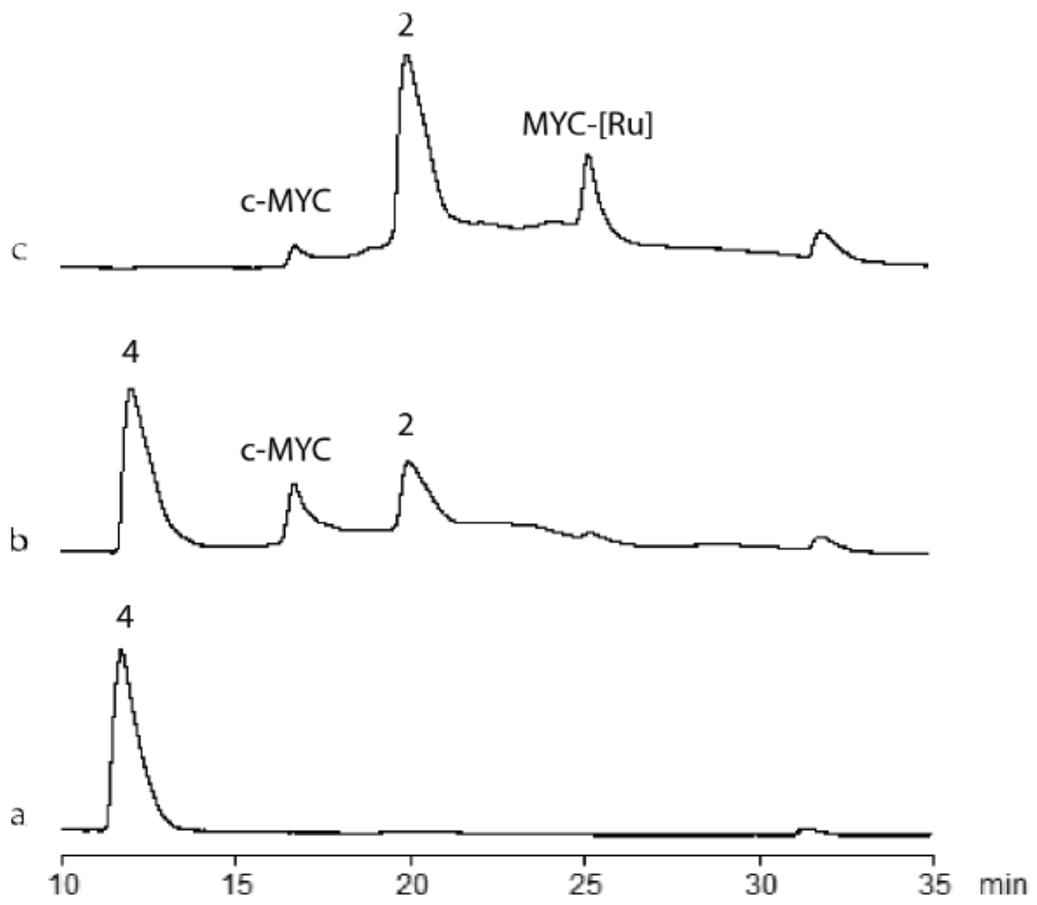


Fig. 6

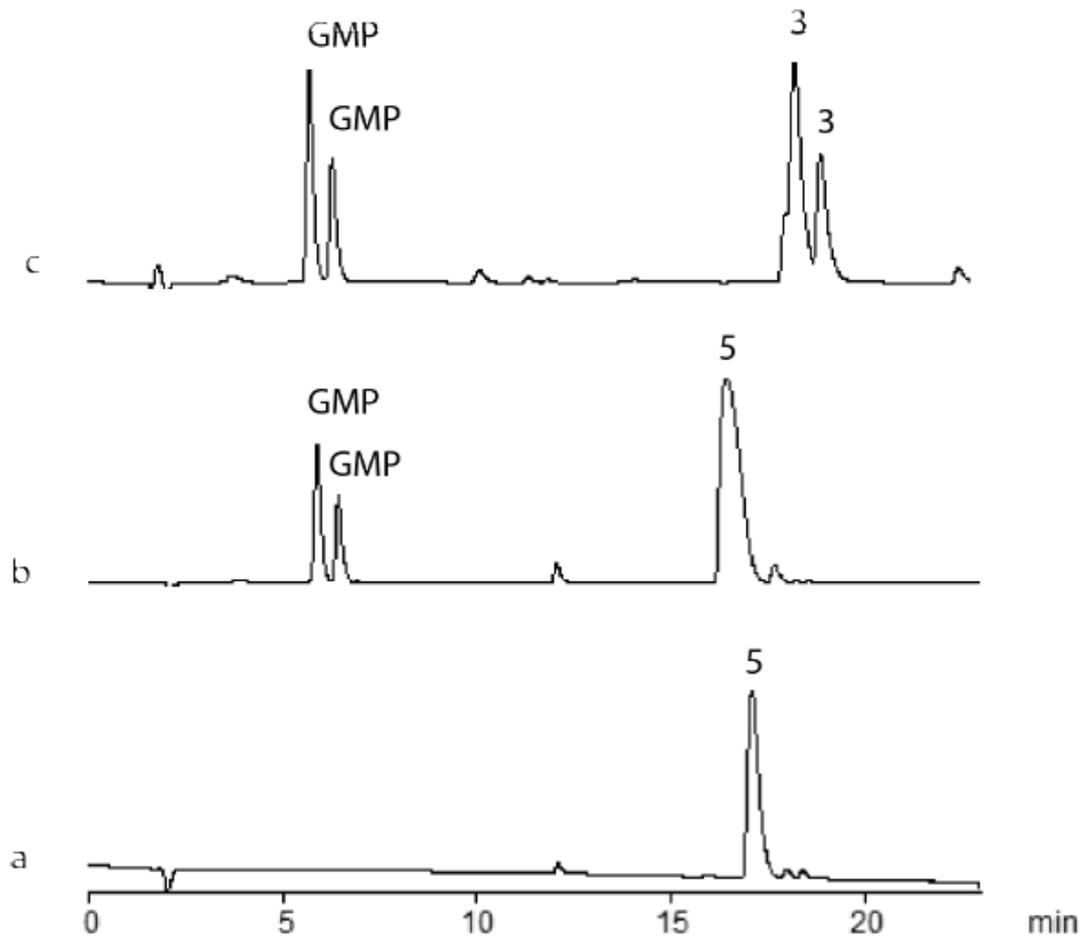


Fig. 7

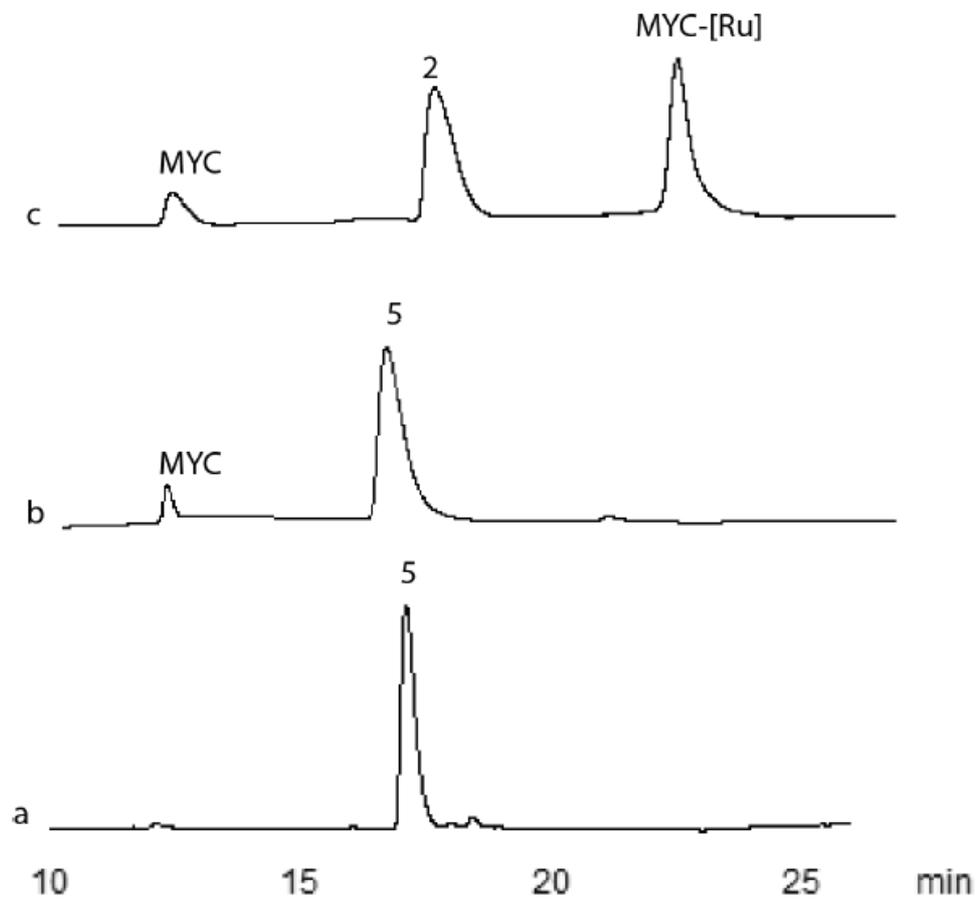


Fig. 8

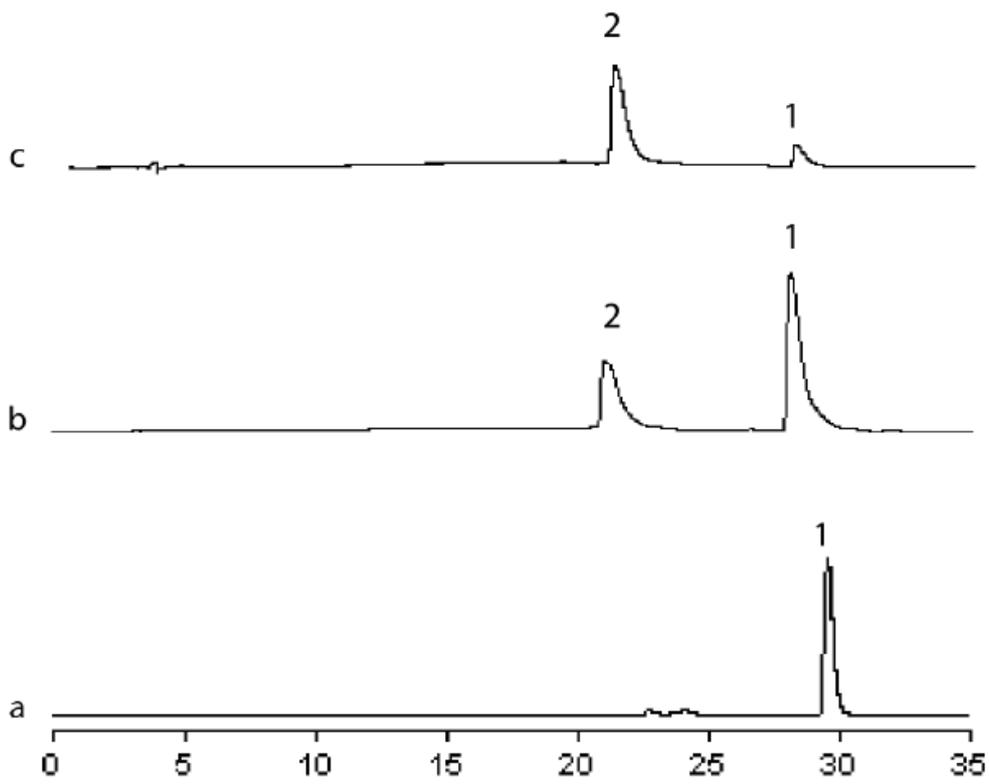


Fig. 9

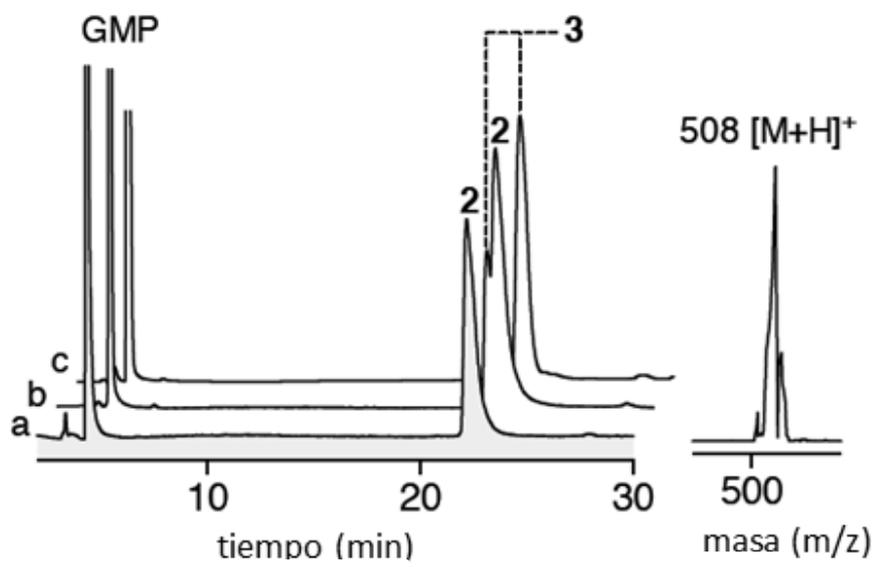


Fig. 10

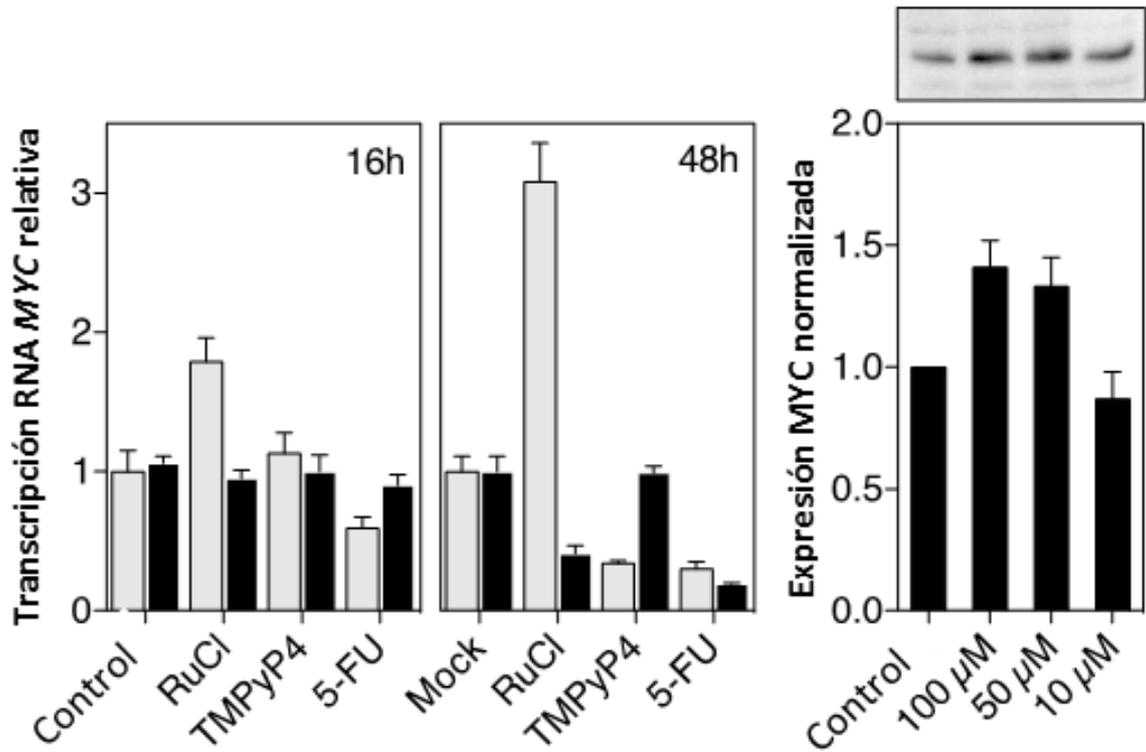


Fig. 11

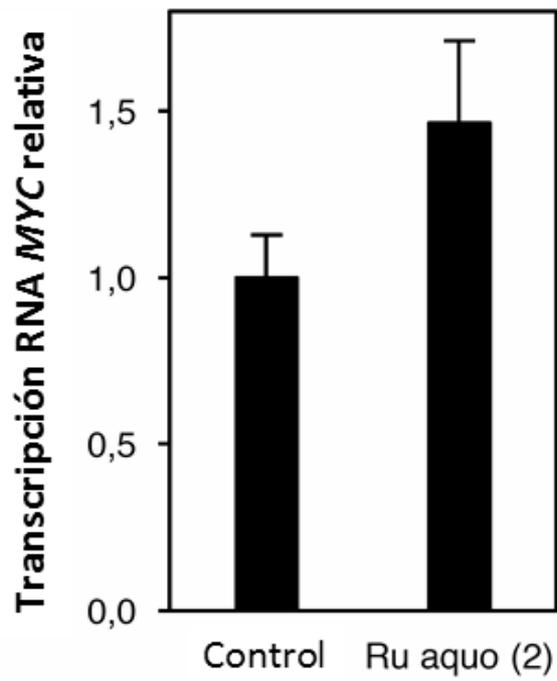


Fig. 12

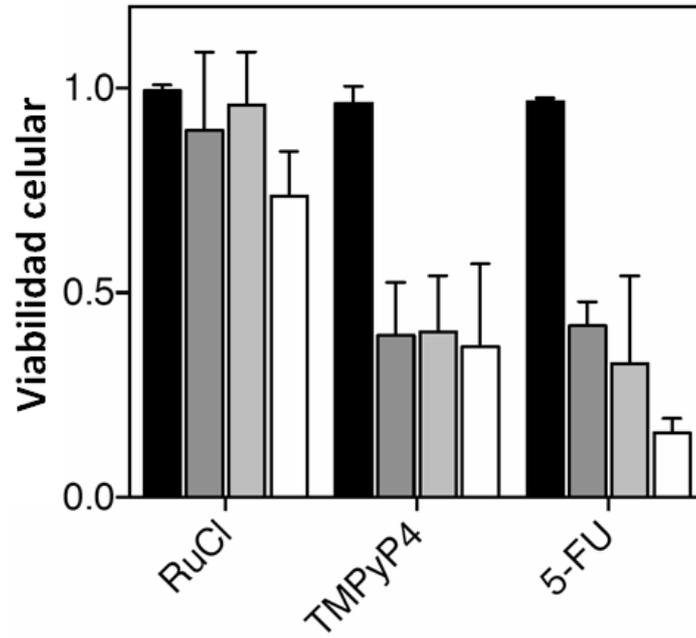


Fig. 13

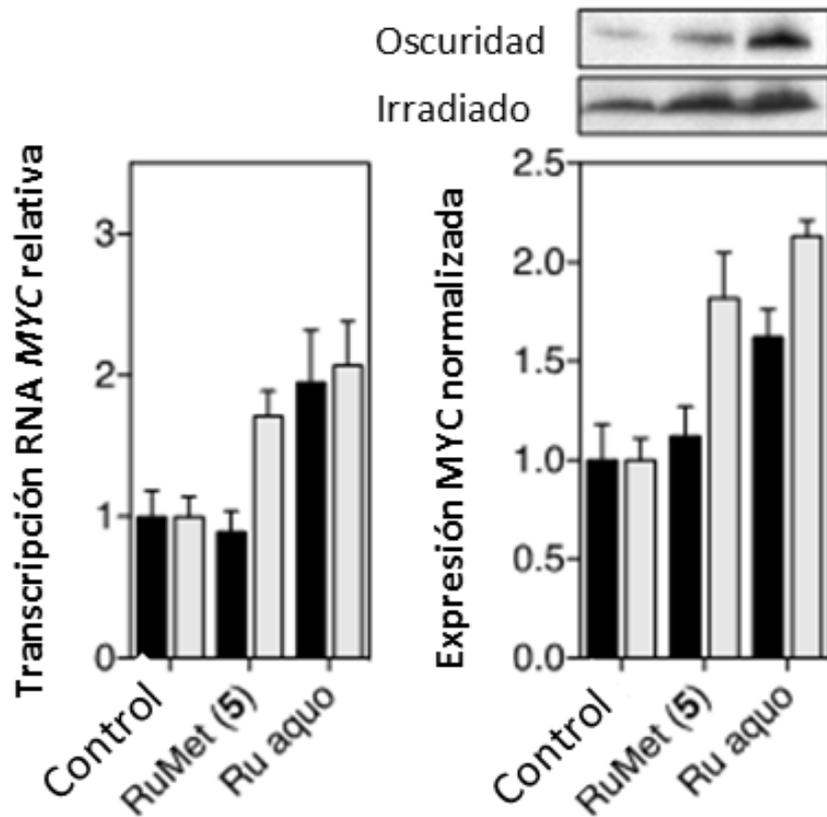


Fig. 14

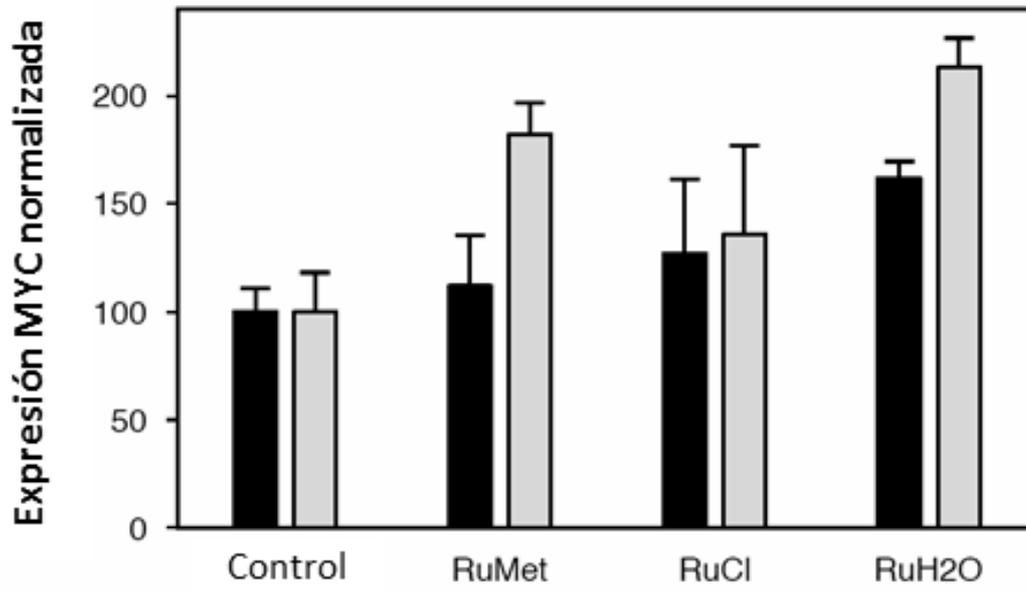


Fig. 15

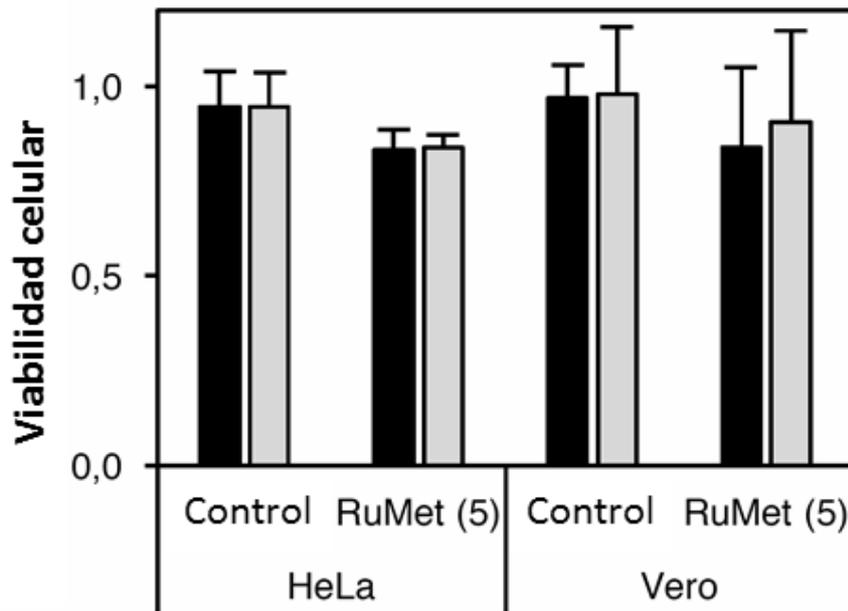


Fig. 16

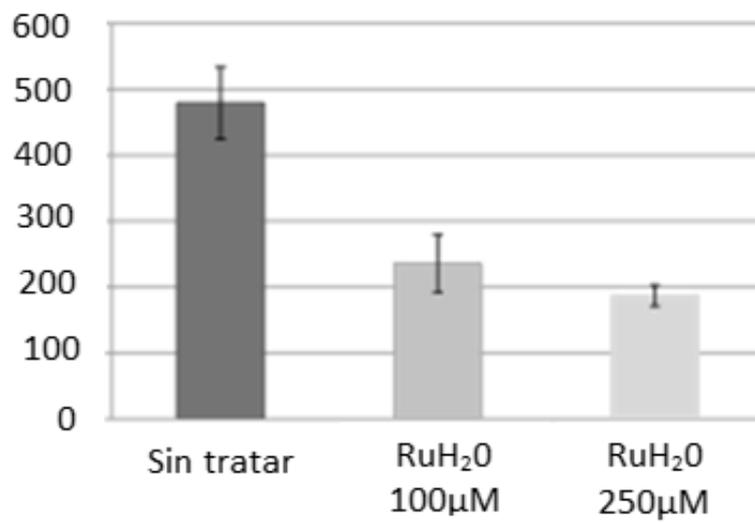
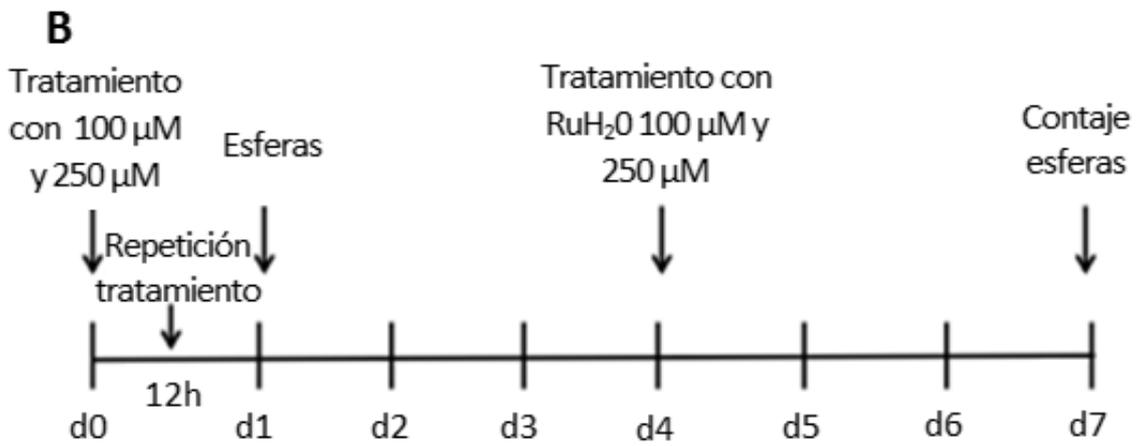
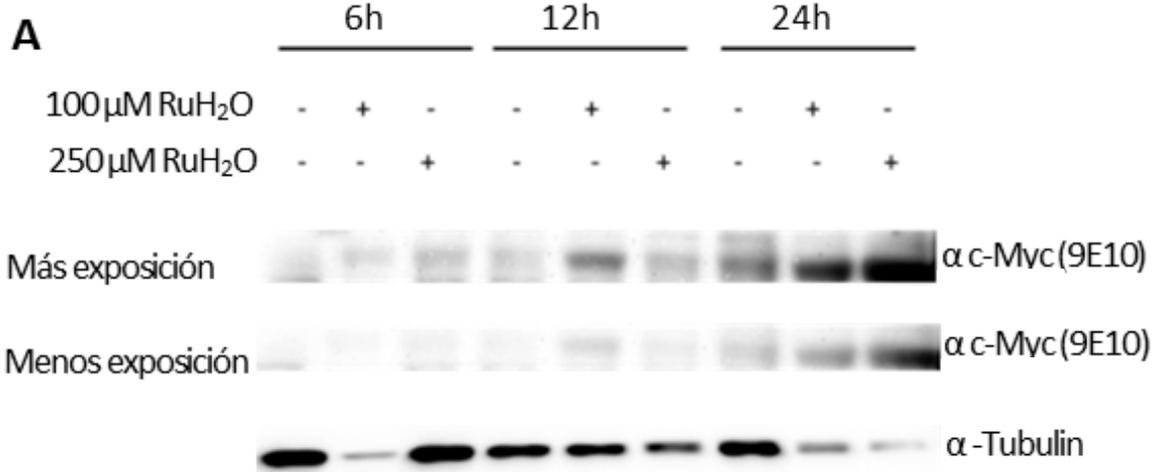


Fig. 17

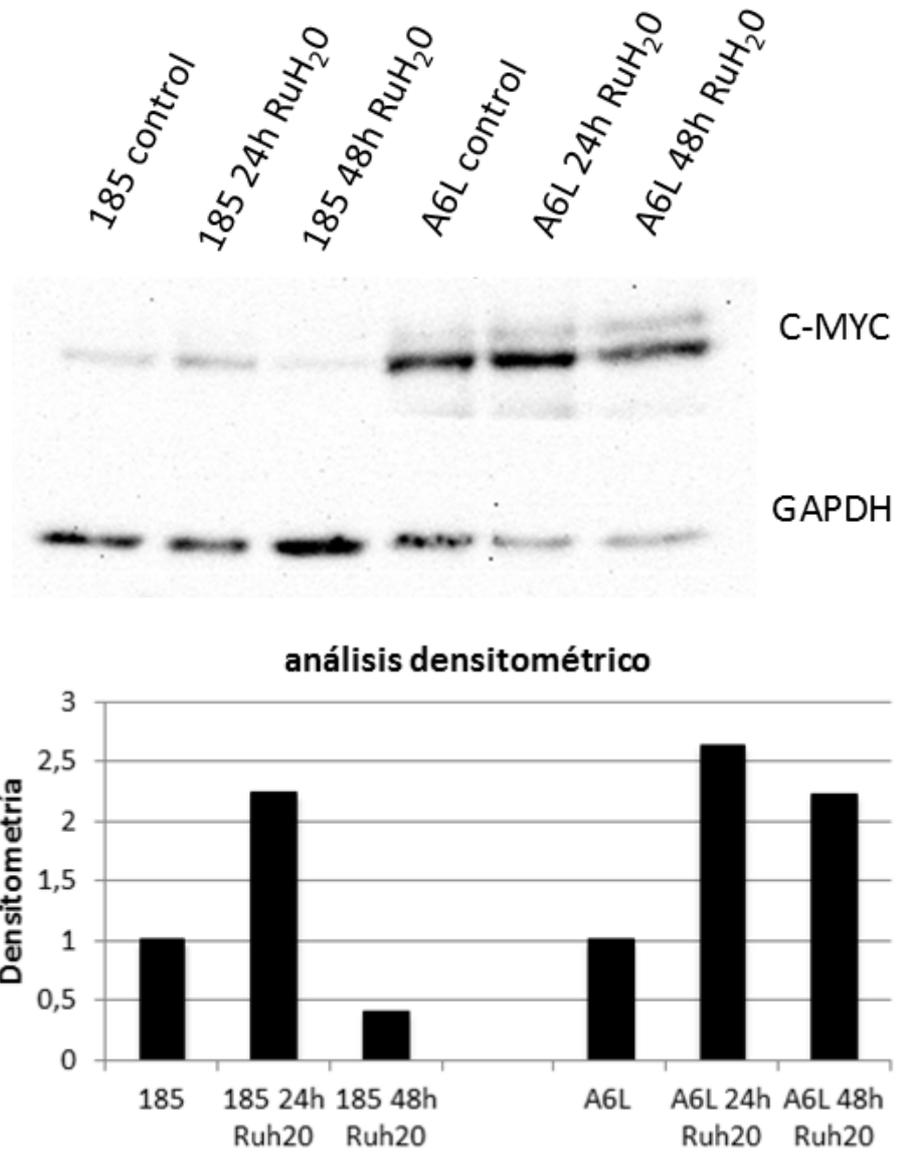


Fig. 18

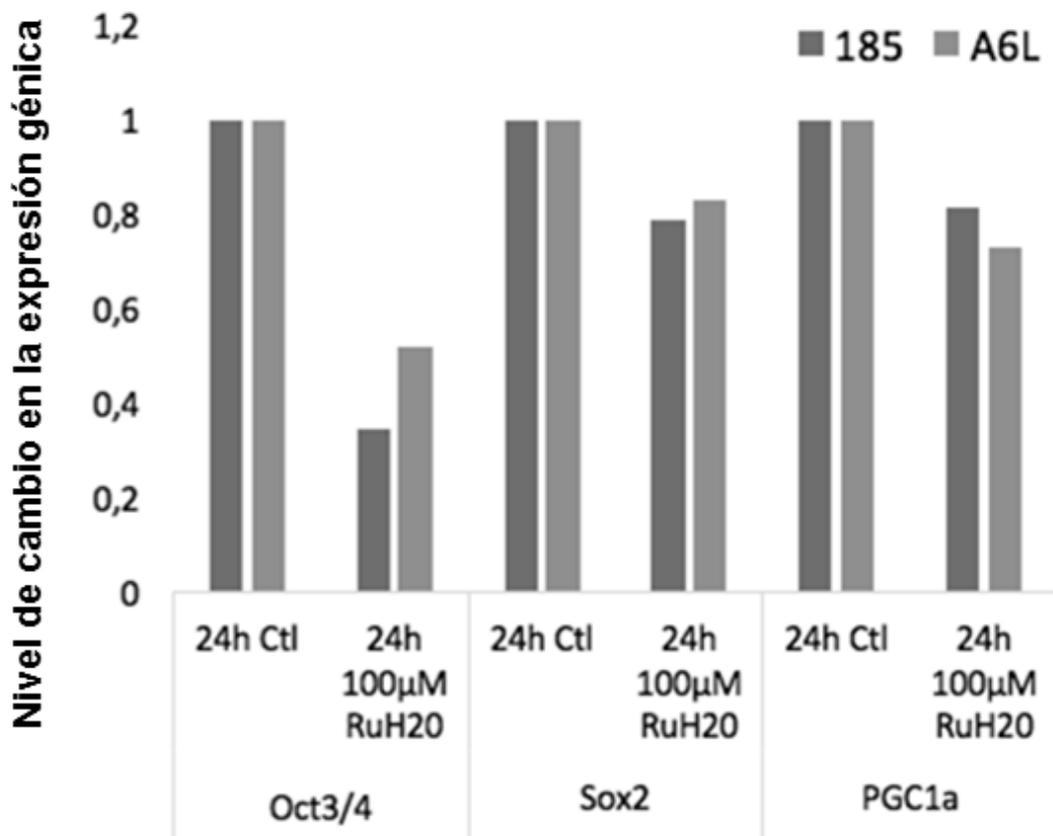
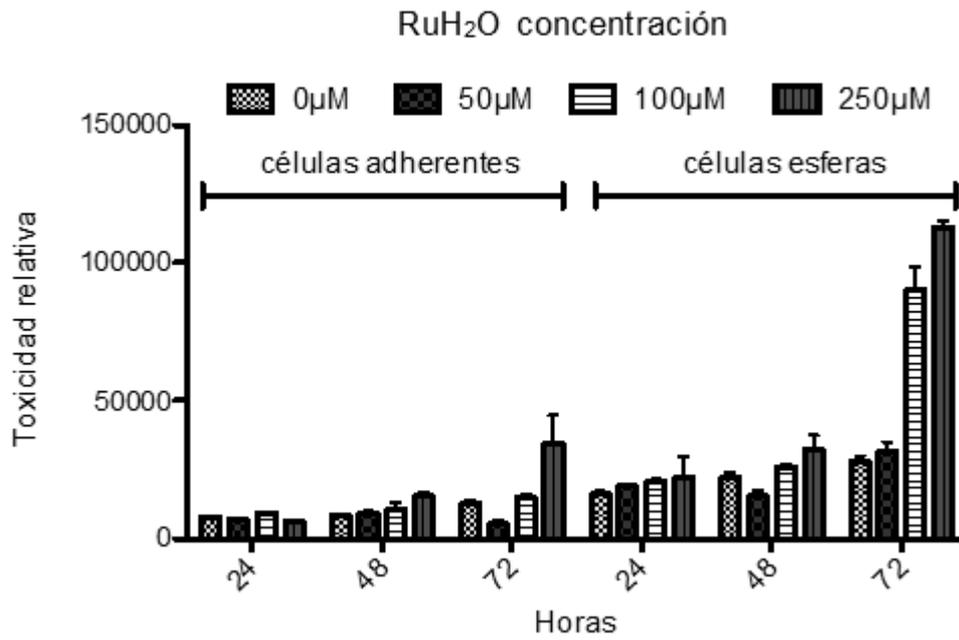


Fig. 19

A



B

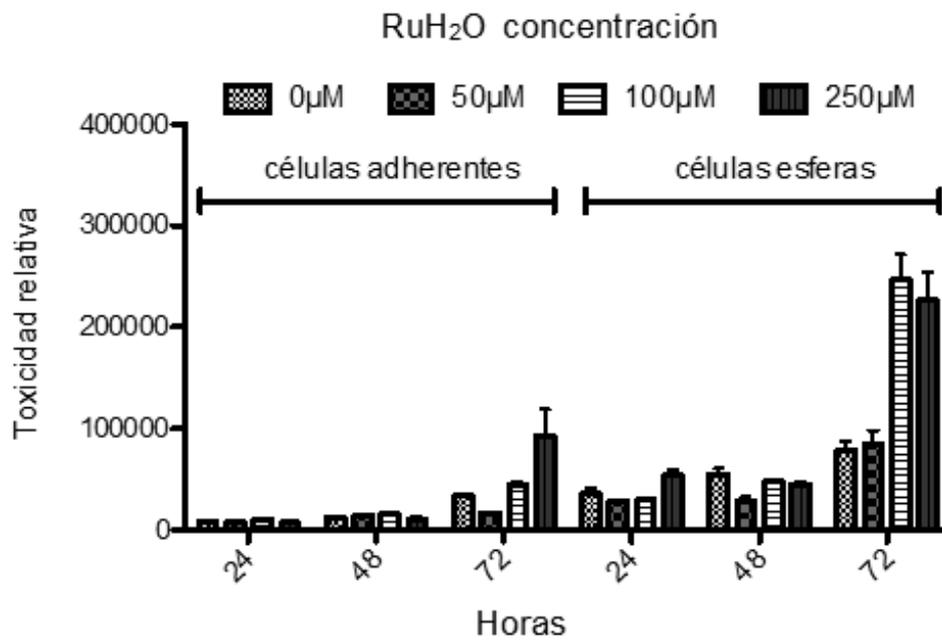


Fig. 20

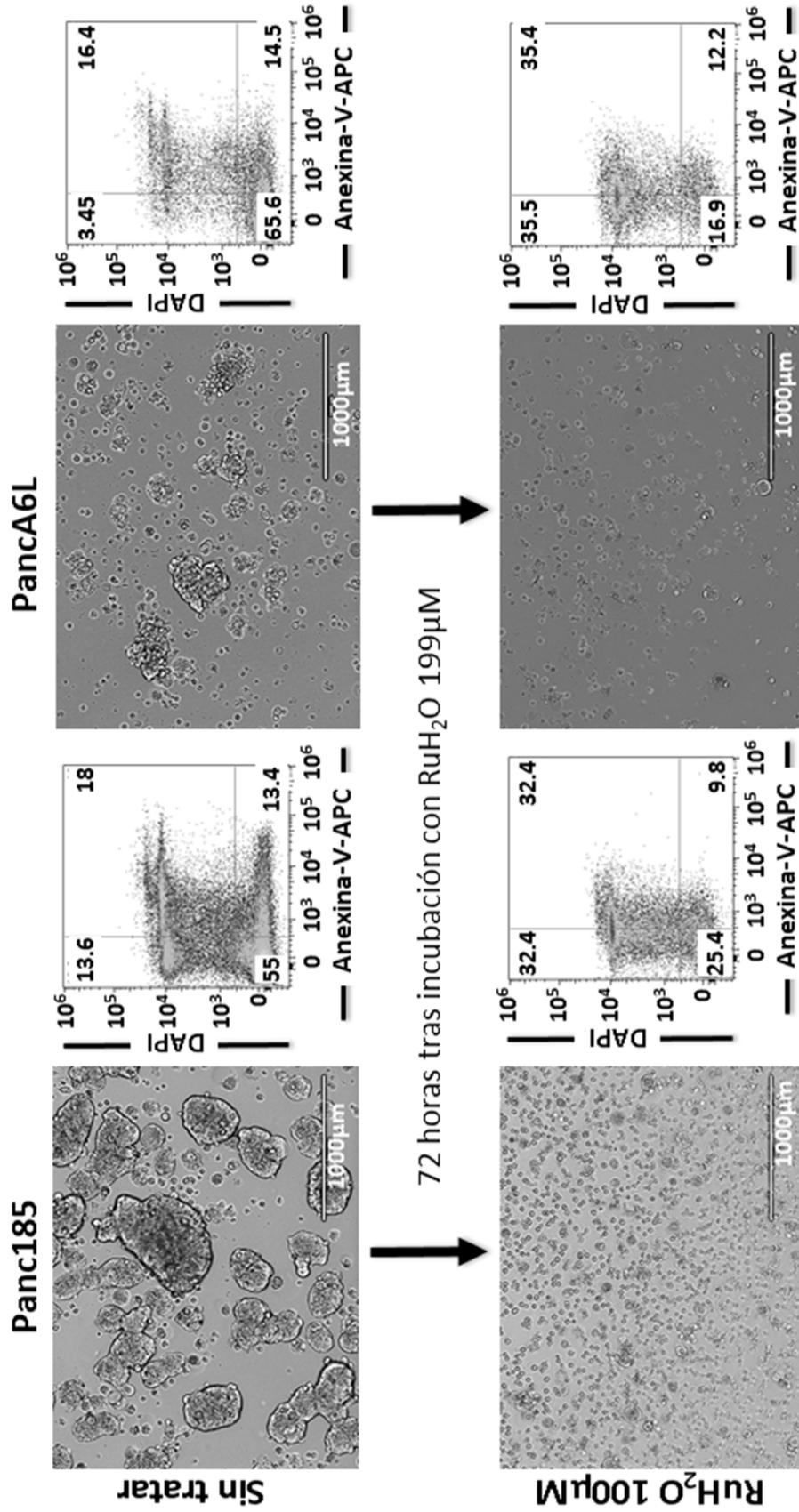


Fig. 21

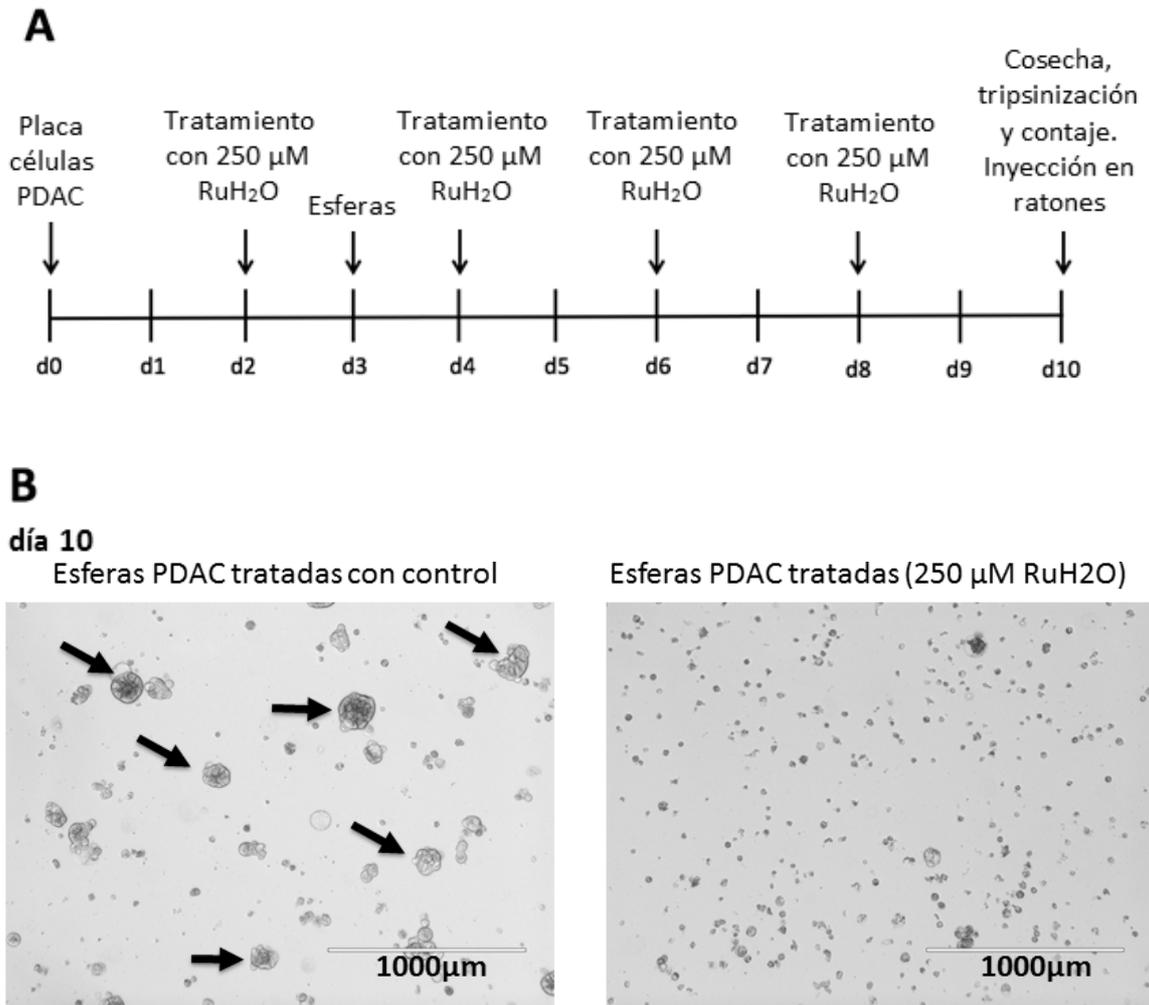
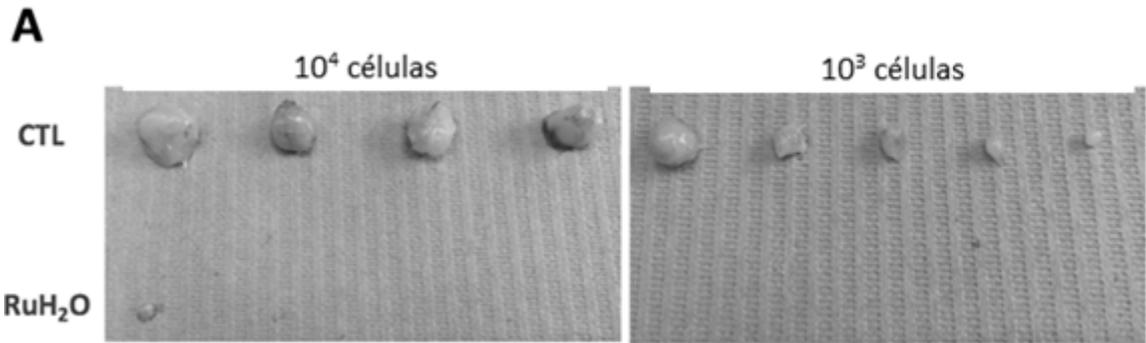


Fig. 22



Ratones NOD-SCID. Resección tumoral 12 semanas tras inyección

B

Nº tumores/inyección (12 semanas)

| | células 10^4 | células 10^3 |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| Tratados con control | 4/4 | 5/6 |
| RuH ₂ O (250 μ M) | 1/6 | 0/6 |

C

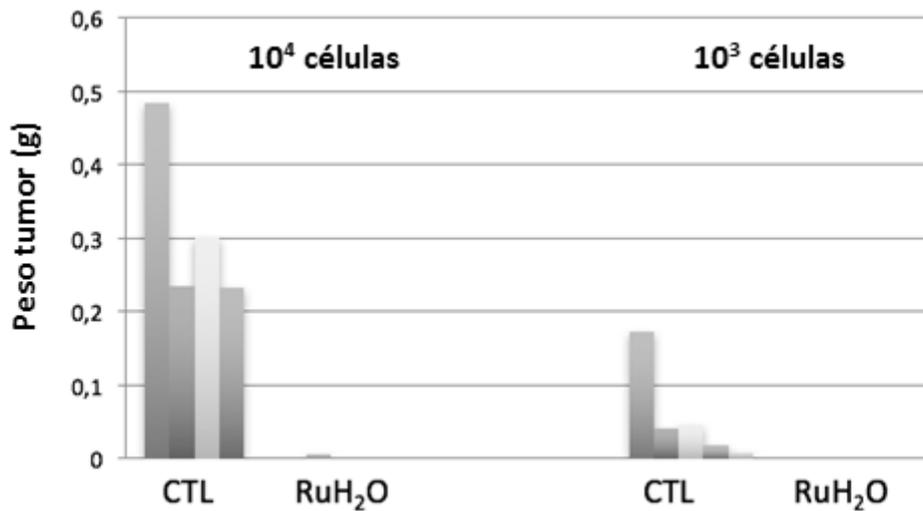


Fig. 23

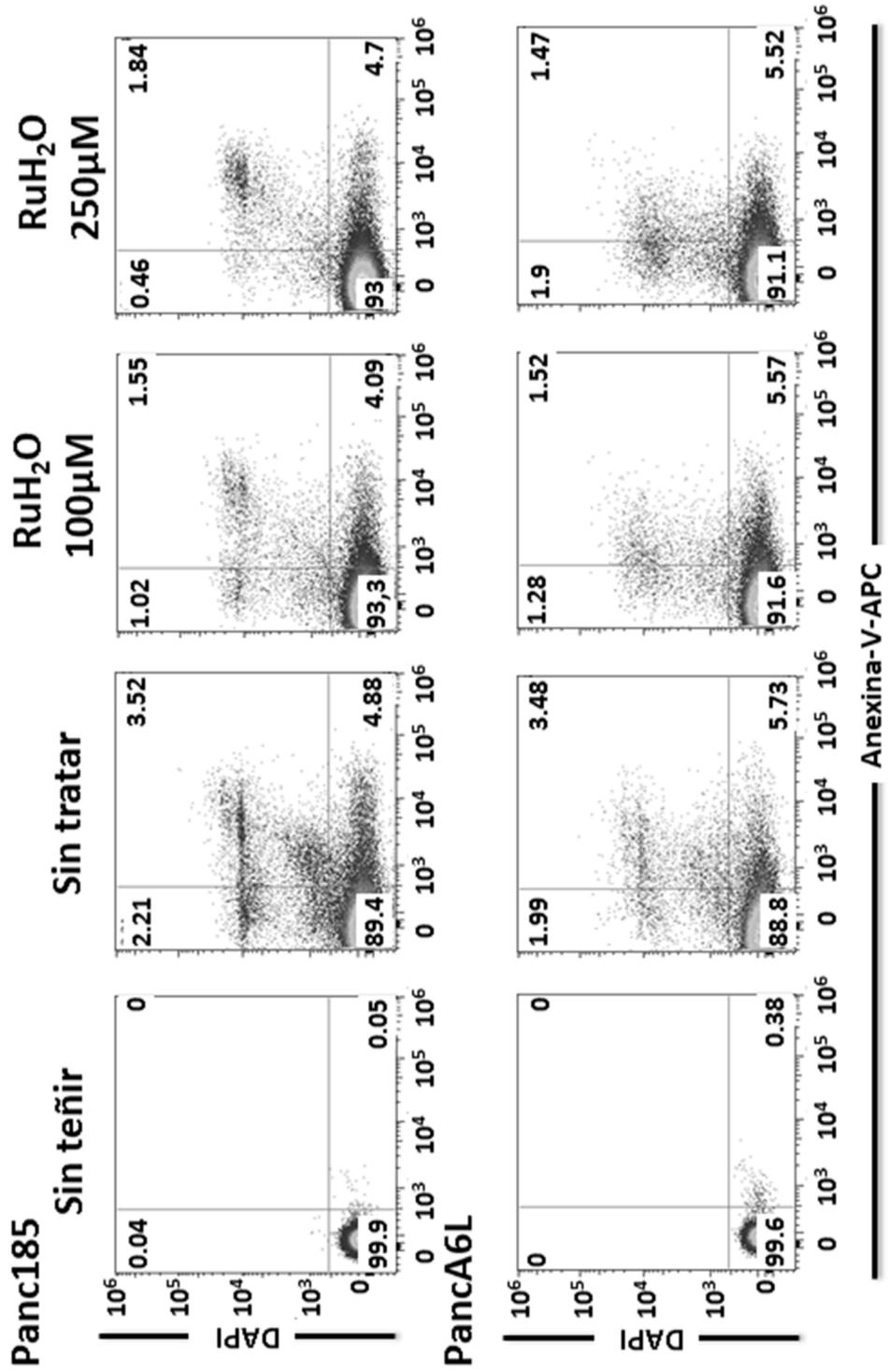


Fig. 24

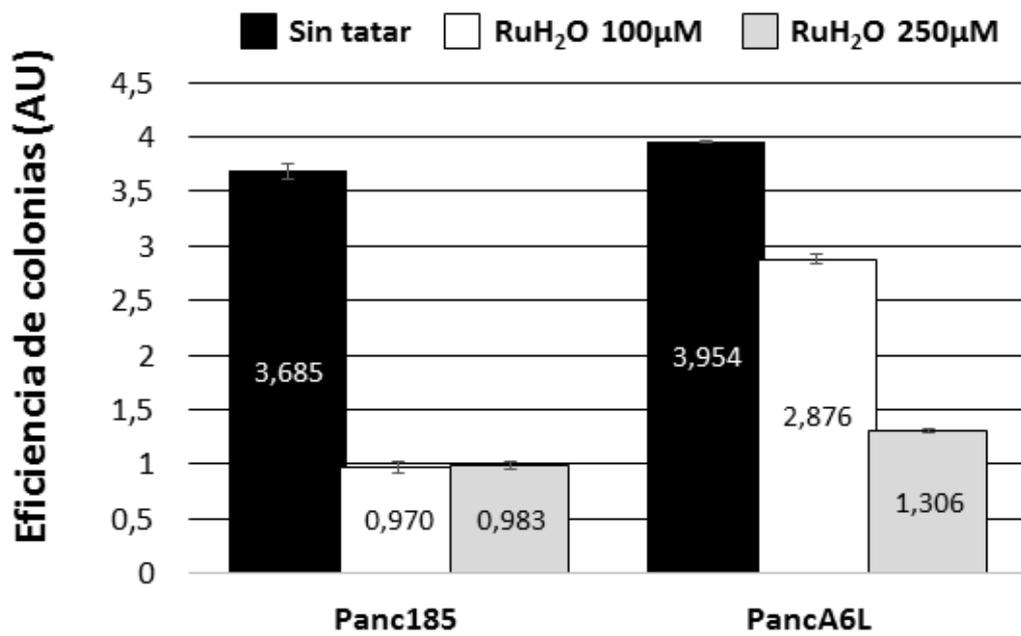
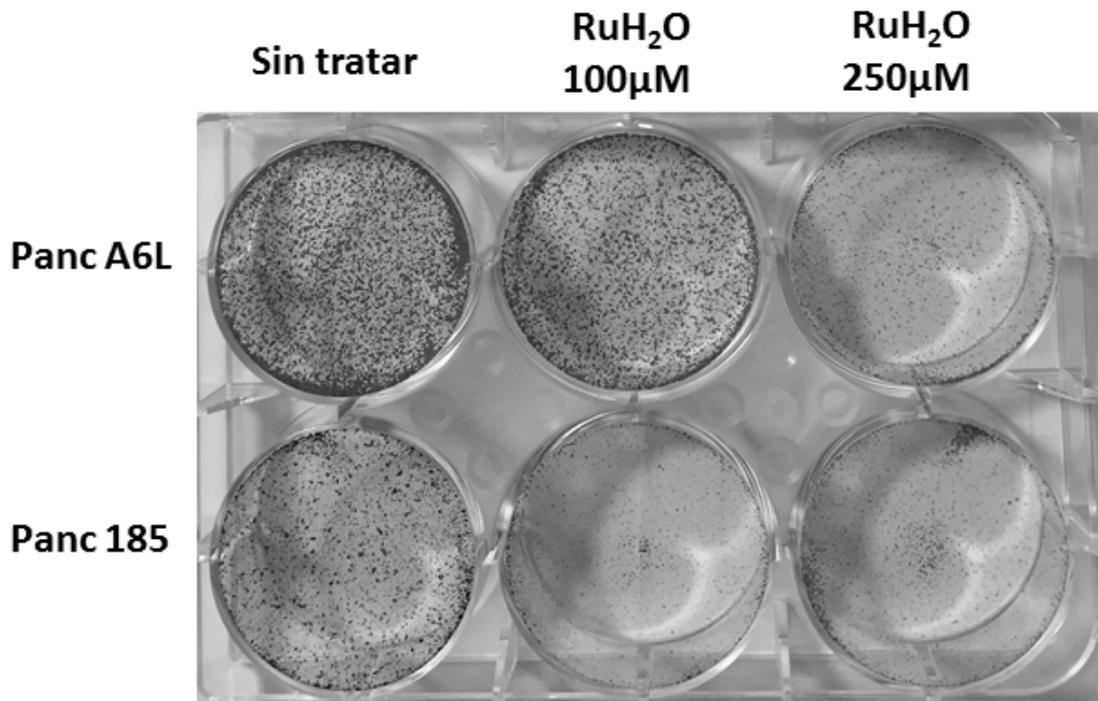


Fig. 25

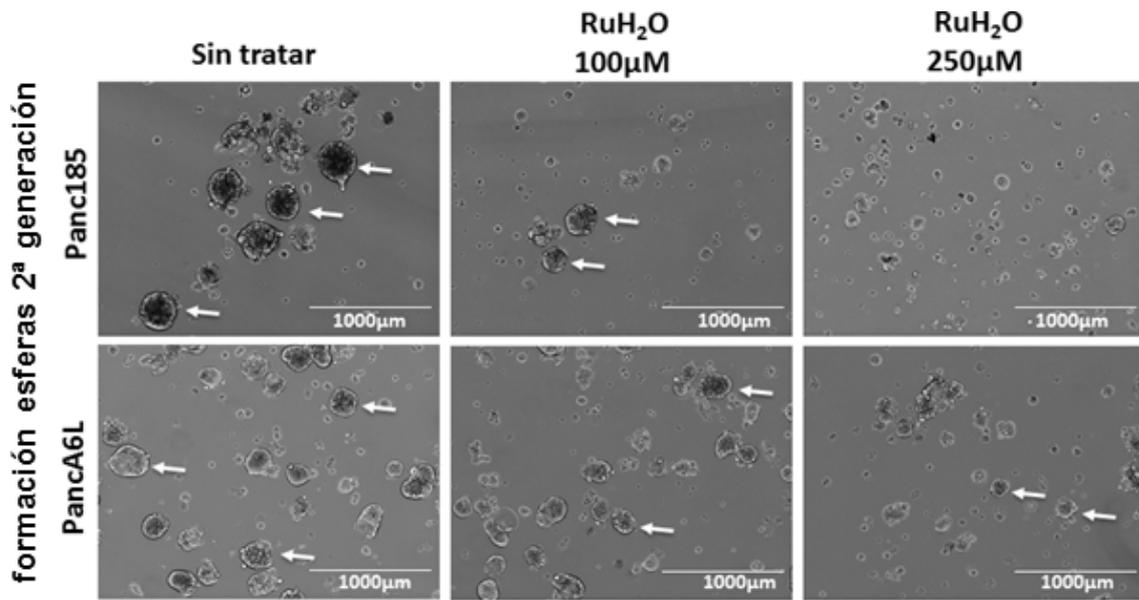


Fig. 26

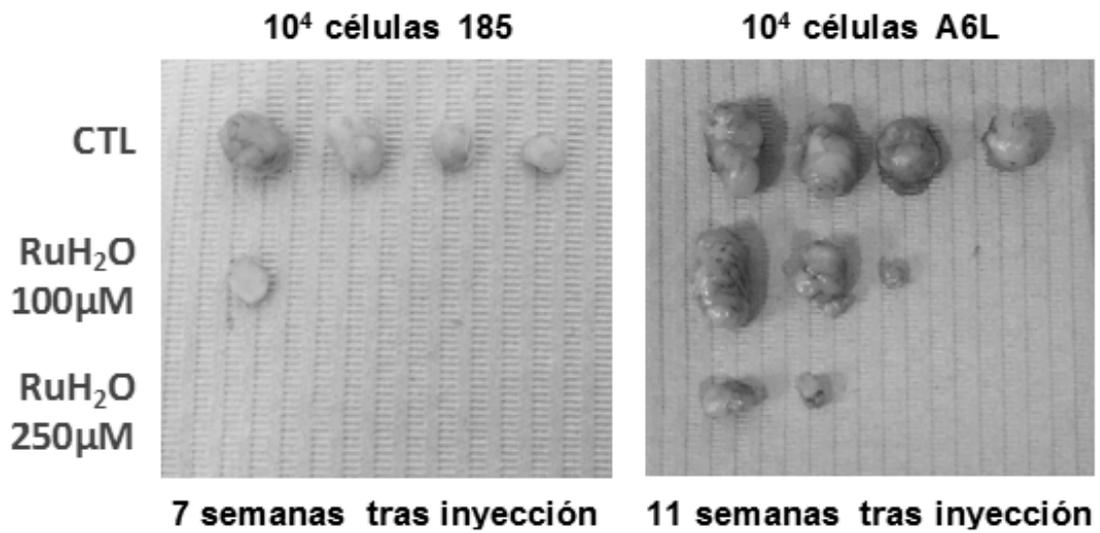


Fig. 27

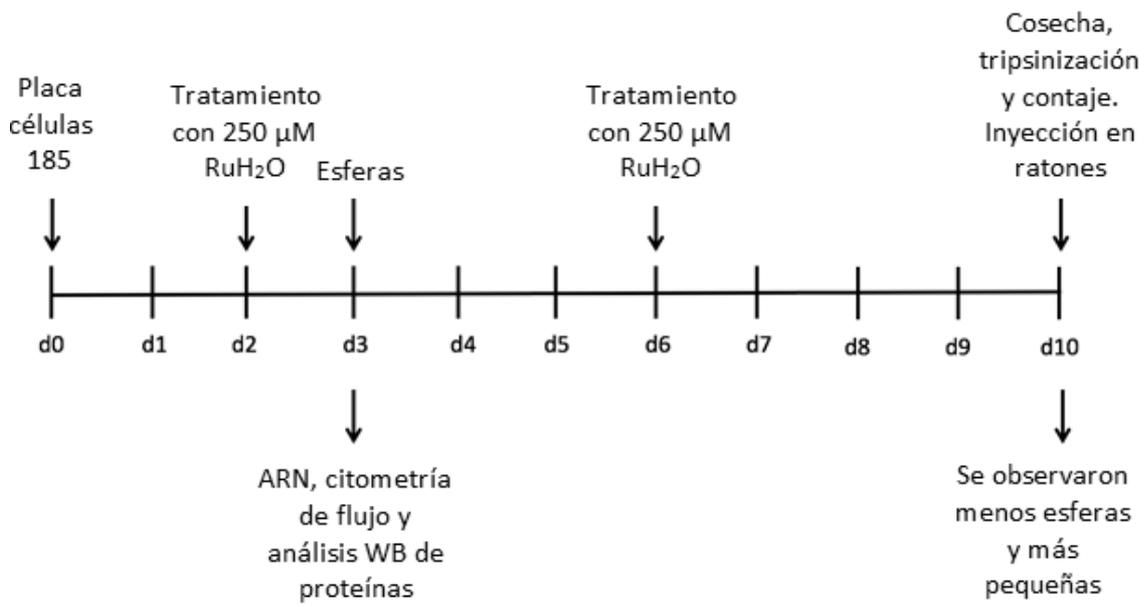


Fig. 28

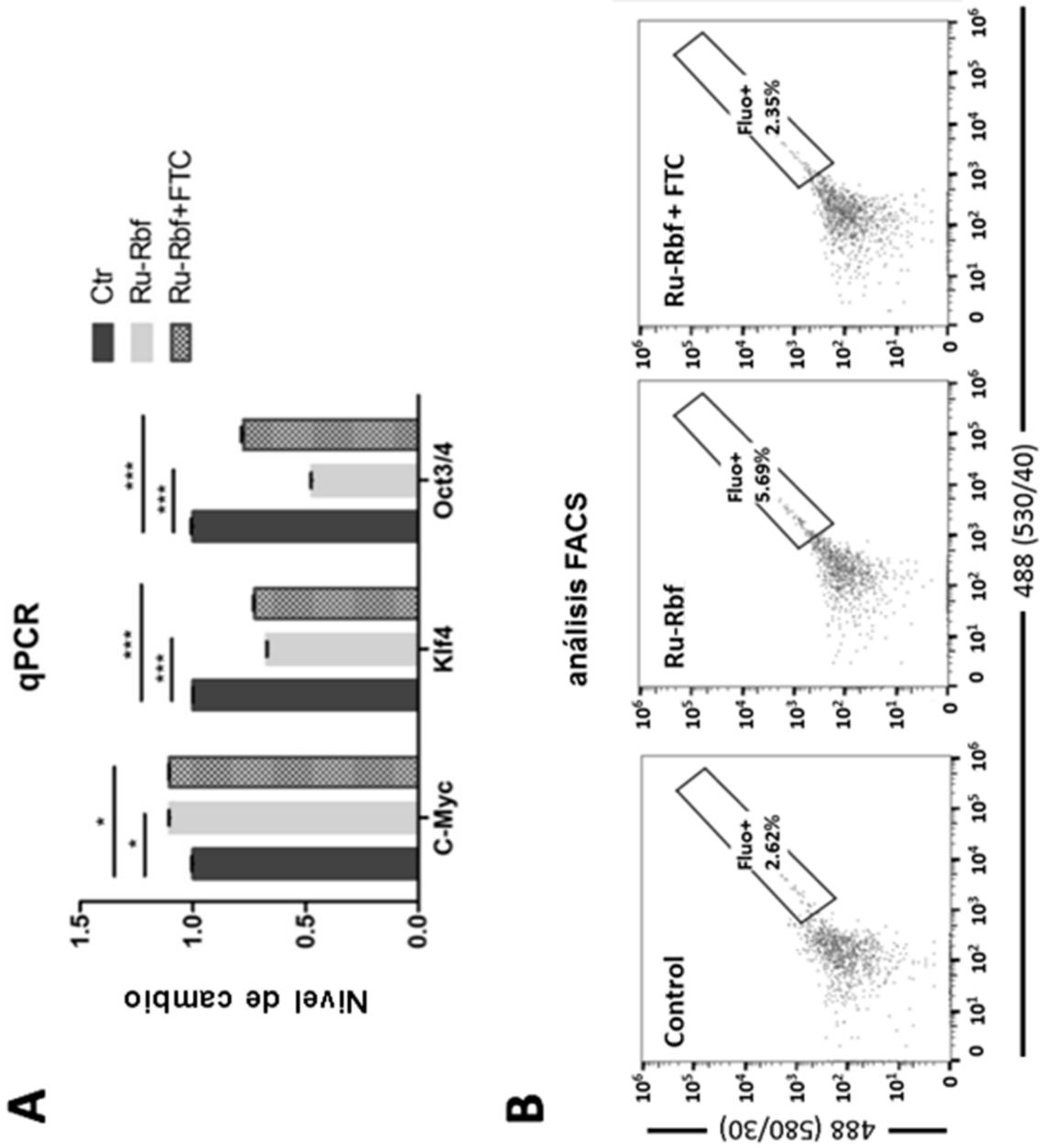


Fig. 29

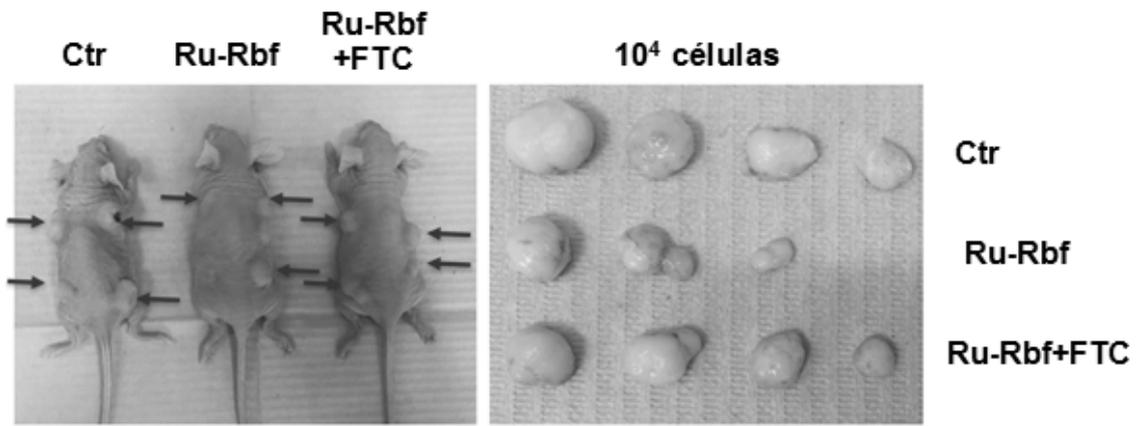


Fig. 30