

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 270**

21 Número de solicitud: 202130624

51 Int. Cl.:

C07D 233/90 (2006.01)

C07F 15/00 (2006.01)

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/295 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

02.07.2021

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.01.2023

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

14.04.2023

Fecha de concesión:

30.11.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.12.2023

73 Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (60.0%)
Avenida Blasco Ibáñez, 13
46010 València (Valencia) ES y
FUNDACIÓ INCLIVA (40.0%)

72 Inventor/es:

RIBAS DESPUIG, Gloria;
MARTÍNEZ LILLO, Francisco José;
ORTS ARROYO, Marta;
ALBANELL FERNÁNDEZ, Marta;
CASTRO BLEDA, Isabel;
JIMÉNEZ MARTÍ, Elena;
OLTRA SANCHÍS, Sara y
IBARROLA VILLAVA, Maider

74 Agente/Representante:

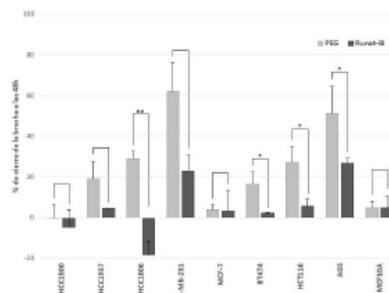
CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

54 Título: **COMPUESTO DE RUTENIO (III) Y 2,2'-BIIMIDAZOL (RUNAT-BI) Y SU USO TERAPÉUTICO**

57 Resumen:

Compuesto de Rutenio (III) y 2,2'-biimidazol (RUNAT-BI) y su uso terapéutico.

Compuesto mononuclear de Ru (III) que comprende dos moléculas de 2,2'-biimidazol como ligandos, procedimiento de obtención del mismo y uso terapéutico, preferentemente como agente anticancerígeno. El cáncer puede ser cáncer mama, cáncer gástrico y cáncer de colon, preferentemente cáncer de mama del subtipo TNA y/o luminal B.



DESCRIPCIÓN**Compuesto de Rutenio (III) y 2,2'-biimidazol (RUNAT-BI) y su uso terapéutico**

La presente invención pertenece al campo de los complejos de rutenio (III) y su uso
5 como agentes terapéuticos, especialmente como anticancerígenos selectivos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer es uno de los principales problemas en salud pública siendo la segunda causa
de muerte a nivel mundial. La quimioterapia es ampliamente usada para tratar tumores,
10 sin embargo, los fármacos empleados suelen presentar toxicidades elevadas en tejidos
sanos.

Actualmente, para el tratamiento del cáncer se están utilizando fármacos
anticancerígenos basados en platino (II) aunque tienen importantes efectos
secundarios que limitan su efectividad y su actividad frente a algunos tumores se ve en
15 ocasiones limitada. Además, los compuestos basados en platino (II) tienen limitada
solubilidad en agua y corto tiempo de vida media.

En la búsqueda de nuevos agentes antitumorales más eficaces y con menos efectos
adversos, han destacado los basados en Rutenio, los más conocidos son NAMI-A y
KP1019, que han logrado completar ensayos clínicos de fase I (Chem. Soc. Rev., 2018,
20 47, 909; *Structure–activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents –
towards clinical development*; Samuel M. Meier-Menches, Christopher Gerner, Walter
Berger, Christian G. Hartinger and Bernhard K. Keppler).

Actualmente, solo existen en la bibliografía sistemas de Ru (III) que contienen 1 o 3
moléculas de 2,2'-biimidazol (C. Tan et al. European Journal of Medicinal Chemistry
25 2011, 46, 1555-1563, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.01.074>), y solamente
se han hecho estudios in vitro (líneas celulares HepG2, MCF-7, 95-D y HeLa) y con
compuestos que presentan una sola molécula de 2,2'-biimidazol coordinada al Ru (III).

El artículo *Journal of Biological Inorganic Chemistry* (2019) 24:591–606; Agnieszka
Gilewska, Barbara Barszcz, Joanna Masternak, Katarzyna Kazimierczuk, Jerzy
30 Sitkowski, Joanna Wietrzyk, Eliza Turlej, describe un compuesto de Ru (II) con una
sola molécula de 2,2'-biimidazol, por lo tanto, distinto del complejo de la invención. La

toxicidad de este complejo se probó en líneas celulares de cáncer colorrectal, mama y leucemia y en fibroblastos murinos como control de línea celular no tumoral. En la Tabla 3 del artículo se observa que los complejos testados no son efectivos en la línea celular de cáncer de mama y en la de colon (además, en este caso el complejo más efectivo tiene iridio en vez de rutenio). En ambos casos el tiempo de incubación es de 72h.

La solicitud de patente CN101967164 divulga un complejo de Ru (II), de fórmula cis-[Ru(biim)₂Cl₂] 2H₂O, preparado a partir de RuCl₃ nH₂O, biimidazol y cloruro de litio, disuelto en dimetilformamida (DMF), y calentamiento a reflujo durante 8 h bajo argón. Se obtuvo, después de enfriar a temperatura ambiente, añadir acetona y enfriar, precipitación y filtrado, un rendimiento del 72% de cristales negro-púrpura.

Sin embargo, este complejo es un compuesto intermedio en la síntesis de otros que se preparan posteriormente y no se ha evaluado su toxicidad in vitro en un panel de líneas celulares de cáncer.

El nuevo compuesto de Ru (III), RUNAT-BI, no solo ha mostrado que se trata de un potencial agente antitumoral sino también que muestra un efecto selectivo entre líneas celulares humanas tumorales y no tumorales.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

De acuerdo con la presente invención se ha estudiado la actividad anticancerígena del agente RUNAT-BI, mezcla racémica de dos isómeros, y se ha analizado su actividad en nueve líneas celulares. Concretamente, se ha experimentado en seis líneas de cáncer de mama: cuatro de ellas pertenecientes al grupo de cáncer de mama en mujeres adultas (CMMA): MCF-7, BT474, HCC1806, y MDA-MB-231 y dos líneas celulares de cáncer de mama de mujeres jóvenes (CMMJ): HCC1937 y HCC1500, en una línea celular de cáncer de colon (HCT116) y en una línea celular de cáncer gástrico (AGS) para comprobar su actividad antitumoral. Además, para comparar si RUNAT-BI tiene efecto selectivo entre las líneas tumorales y las no tumorales se utilizó la línea MCF10A procedente de glándula mamaria de origen humano no tumoral. De todas ellas destacan los resultados obtenidos en cáncer de mama, colon, gástrico y una no tumoral de glándula mamaria.

Los complejos basados en rutenio (III) con 2,2'-biimidazol pueden tener interacciones entre pares de bases que facilitan aún más su mecanismo de acción con el ADN de las

células cancerosas. Asimismo, el hecho de que estos compuestos contengan rutenio (III) permite que sean aún más robustos e inertes a la hora de reaccionar en procesos redox o en reacciones de sustitución de ligando, permitiendo así aumentar la estabilidad y, por tanto, alargar la vida útil del compuesto en el medio fisiológico.

- 5 En la presente memoria la denominación RUNAT-BI se refiere a la mezcla racémica de los isómeros del compuesto de Ru(III): {cis-[RuCl₂(H₂biim)₂]Cl}₂·4H₂O (H₂biim = 2,2'-biimidazol). Por lo tanto, salvo que se indique otra cosa, el término "compuesto" o "complejo" a lo largo de la memoria se refiere a la mezcla racémica.

El término compuesto y complejo se usan indistintamente en esta memoria.

- 10 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto mononuclear de Ru (III) con dos moléculas de 2,2'-biimidazol.

El primer objeto de la presente invención se refiere a un compuesto de Ru (III) (RUNAT-BI), que tiene la fórmula {cis-[RuCl₂(H₂biim)₂]Cl}₂·4H₂O (H₂biim = 2,2'-biimidazol).

- 15 La difracción de rayos X sobre monocristal permitió dilucidar que en realidad el compuesto RUNAT-BI está formado por dos isómeros (figura 2).

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto de Ru (III) - RUNAT-BI - definido anteriormente, que comprende:

- realizar una síntesis solvotermal mediante una rampa de temperatura del compuesto de rutenio RuCl₃·H₂O, con 2,2'-biimidazol en ácido clorhídrico
- 20 - una etapa de enfriamiento hasta la temperatura ambiente (considerada entre 20-25 °C).
- el aislamiento del sólido RUNAT-BI obtenido en la mezcla de reacción a través de su cristalización.

- 25 Se puede definir como 'solvotermal' porque el disolvente no es agua pura, sino agua y ácido clorhídrico. Esta mezcla tiene un punto de ebullición por debajo del agua pura, que también se ve modificado por la presión que ejerce el recipiente cerrado.

La rampa de temperatura comprende alcanzar una temperatura de entre 85°C y 95°C, y más preferentemente de 90 °C.

- 30 Según realizaciones particulares, la rampa de temperatura comprende alcanzar una temperatura de entre 85°C y 95°C, temperatura comprende alcanzar una temperatura

de entre 85°C y 95°C, y más preferentemente de 90 °C y mantener dicha temperatura durante un tiempo entre 20 y 21 horas, preferentemente 20,5 h.

El tiempo invertido hasta alcanzar la temperatura final es de 1 a 6 horas, preferentemente de 5 horas.

- 5 La concentración de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la mezcla de síntesis es desde 0,01 a 0,05 M, preferentemente 0,012 M.

La concentración de 2,2'-biimidazol en la mezcla de síntesis es desde 0,01 a 0,05 M, preferentemente 0,036 M.

- 10 El ácido clorhídrico que se puede utilizar es comercial, y puede tener una concentración en la mezcla de síntesis de 1 a 6 M, preferentemente, de 3 M.

La etapa de enfriamiento puede durar entre 10 y 21 horas, de forma preferente la etapa de enfriamiento hasta temperatura ambiente es de 20,5 h.

- 15 Un segundo aspecto de la invención se refiere al compuesto RUNAT-BI para uso terapéutico, preferentemente para cualquier enfermedad caracterizada por una mayor tasa de crecimiento celular respecto a las células de tejidos sanos.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al complejo RUNAT-BI para su uso como agente anticancerígeno.

Existe, además, un efecto selectivo entre líneas tumorales y no tumorales, como se demuestra con la falta de efecto en la línea de glándula mamaria MCF10A.

- 20 El compuesto RUNAT-BI presenta actividad antitumoral. Concretamente, el compuesto RUNAT-BI (racémico) ha demostrado reducir considerablemente la proliferación, migración y expresión de las líneas tumorales HCT116 (colon), AGS (gástrico) y HCC1806 (mama).

- 25 La selectividad del compuesto de la invención entre líneas celulares tumorales y no tumorales puede deberse a los mecanismos moleculares alterados que presentan estas últimas, por ejemplo, presencia de mutaciones en oncogenes y otros genes que presentan las células tumorales y no se encuentran en las no tumorales. También puede deberse a la alta tasa de replicación de las células tumorales, al actuar el compuesto de RUNAT-BI sobre el ADN, afectará más a las células que tengan una tasa
30 de replicación más alta como es el caso de las células tumorales.

En una realización particular el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer de colon.

En los ejemplos de realización se muestra que las líneas celulares de CMMA (Cáncer de mama en mujeres adultas) que pertenecen al subtipo triple negativo (TNA) (HCC1806, MDA-MB-231 HCC1937 y HCC1500) y luminal B (BT474) presentan una mayor afectación por el tratamiento con RUNAT-BI, esto es muy relevante ya que los tumores de este perfil tienen un peor pronóstico y menos opciones de tratamiento.

En otra realización particular el cáncer de mama es subtipo TNA y/o luminal B.

En otra realización particular el cáncer de mama (CM) es cáncer de mama en mujeres jóvenes (CMMJ).

En la presente memoria, mujeres jóvenes son aquellas con una edad igual o inferior a 35 años. Esta distinción se aplica también a las líneas celulares CMMA y CMMJ.

Las ventajas de la presente invención son entre otras, las siguientes:

• El compuesto RUNAT-BI es estable durante al menos dos semanas en disolución en un solvente orgánico como el polietilenglicol (PEG) y protegido de la exposición a la luz, a temperatura ambiente, esto es, de entre 18 °C y 33 °C, preferentemente 21 °C y 26 °C, más preferentemente 25 °C. El compuesto RUNAT-BI como sólido aislado, es estable durante al menos un mes en contacto con el aire a temperatura ambiente de entre 18 °C y 33 °C, preferentemente 21 °C y 26 °C, más preferentemente 25 °C. Por lo tanto no es necesario prepararlo inmediatamente antes de su uso. No se encontraron diferencias significativas entre el efecto de compuesto cuando está preparado en fresco (recién preparado para su uso) o cuando estaba preparado entre una o dos semanas antes de su uso.

• RUNAT-BI se trata de un agente cuya diana de actuación se encuentra en el ADN, entre otras posibles, ya que afecta más a las líneas celulares cancerígenas con mayor capacidad de proliferación.

En una realización particular la concentración de RUNAT-BI es de entre 0,01 µM y 1000 µM, preferentemente, 1 µM y 100 µM, más preferentemente entre 0,1 µM y 50 µM. Dependiendo del tipo de cáncer se podrá emplear una concentración más reducida o elevada.

Un objeto adicional de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende RUNAT-BI y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Un "portador farmacéuticamente aceptable", después de ser administrado, no causa efectos fisiológicos indeseables. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" también en el sentido de que es compatible con el RUNAT-BI, o compuesto activo, y puede ser capaz de estabilizarlo. Uno o más agentes solubilizantes pueden ser utilizados como portadores o excipientes farmacéuticos para la entrega del compuesto activo. Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos biocompatibles, adyuvantes, aditivos y diluyentes para lograr una composición utilizable como forma de dosificación. Entre los ejemplos de otros portadores se incluyen el óxido de silicio coloidal, el estearato de magnesio, la celulosa, el laurilsulfato de sodio y el D&C Yellow 10.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal.

El término "parenteral", tal como se utiliza aquí, se refiere a la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como a cualquier técnica de infusión adecuada.

La composición farmacéutica de la invención puede administrarse como un inyectable estéril que puede ser una solución o suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable para la administración parenteral, tales soluciones incluyen, pero no se limitan a, 1,3-butanediol, manitol, agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, se emplean convencionalmente aceites fijos como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, como el aceite de oliva o el aceite de castilla, en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como la carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares. Otros tensioactivos comúnmente utilizados, tales como, Tweens o Spans u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares, que se utilizan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas

de dosificación aceptables también pueden ser utilizados para el propósito de la formulación.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación oralmente aceptable, incluyendo cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones acuosas, dispersiones y soluciones. En el caso de los comprimidos, los portadores comúnmente utilizados incluyen, entre otros, la lactosa y el almidón de maíz. También se suelen añadir agentes lubricantes, como el estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen la lactosa y el almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones o emulsiones acuosas se administran por vía oral, el ingrediente activo puede suspenderse o disolverse en una fase oleosa combinada con agentes emulsionantes o suspensores. Si se desea, pueden añadirse ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

El RUNAT-BI o la composición farmacéutica puede administrarse in vivo o ex vivo, solo o en una composición junto con otros fármacos o terapias, es decir, un cóctel terapéutico. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores, particularmente de tumores malignos, los agentes pueden utilizarse solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, radioterapéuticos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coagulantes. En algunas realizaciones, la administración de una composición farmacéutica de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otras realizaciones, un primer agente/terapia se administra antes de un segundo agente/terapia. Los expertos en la materia entienden que las formulaciones y/o las vías de administración de los diversos agentes/terapias utilizados pueden variar.

En una realización particular el RUNAT-BI o la composición farmacéutica puede administrarse como tratamiento posterior o simultáneamente a al menos un tratamiento seleccionado entre: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

En una realización particular, la composición farmacéutica incluye la administración a la persona de un agente terapéutico adicional. Los ejemplos del agente terapéutico adicional incluyen uno o más seleccionados del grupo que consiste en cis-platino, 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecan, capecitabina, gemcitabina, cetuximab, paclitaxel, docetaxel, bevacizumab, regorafenib, aflibercept, trastuzumab, pertuzumab, nab-paclitaxel, trastuzumab-emtansina, atezolizumab y carboplatino.

El RUNAT-BI o la composición farmacéutica de la invención puede utilizarse como tratamiento posterior o simultáneamente a al menos un tratamiento seleccionado entre: cirugía, quimioterapia, inmunoterapia o tratamiento farmacéutico.

5 En otra realización particular, el RUNAT-BI o la composición farmacéutica puede administrarse con un intervalo de administración variable, como por ejemplo de 1 a 7 veces por semana, preferiblemente de 2 a 6 veces por semana, más preferiblemente de 3 a 5 veces por semana.

10 Preferentemente el RUNAT-BI se administra con un intervalo de 15, 21 o 28 días y en forma de ciclos, por ejemplo, 4, 6, 8 o 12 ciclos, un experto en la materia sabría determinar la mejor pauta de administración de este compuesto empleando el conocimiento general común.

15 En otra realización particular, la dosis efectiva de RUNAT-BI y de la composición farmacéutica que lo comprende depende de la naturaleza de las condiciones, de la forma de ejecución y de la formulación farmacéutica, y será definida por la experiencia de un médico mediante la aplicación de las investigaciones habituales para un aumento de la dosis. Se puede considerar que la dosis efectiva es de 0,0001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal por día, o de 0,01 a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal por día, o de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal por día, o de 0,05 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día. Por ejemplo, la dosis diaria para 20 una persona adulta de aproximadamente 70 kg de peso corporal estará en el intervalo de 1 mg a 1000 mg, o entre 5 mg y 500 mg, y puede realizarse mediante dosis únicas o múltiples, diarias o no.

25 A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Además, la palabra "comprende" y sus variaciones engloban el término "que consiste en". Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente 30 invención. Además, la presente invención abarca todas las posibles combinaciones de las realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ejemplo de una rampa de temperatura para la síntesis de RUNAT-BI.

Figura 2: Estructura molecular de los dos isómeros catiónicos que forman la mezcla racémica activa RUNAT-BI. Los átomos de hidrógeno, los aniones cloruro y las moléculas de H₂O de la fórmula han sido omitidos para una mayor claridad. La diferente conectividad de los átomos para los dos isómeros se muestra en la Figura.

Figura 3: Porcentaje de viabilidad de ocho de las líneas celulares tratadas con RUNAT-BI fresco a las 24, 48 y 72 h. Las líneas de CM: MCF-7, HCC1937, MDA-MB-231, BT474, HCC1806, HCC1500, la línea de cáncer gástrico: AGS y la línea de cáncer de colon: HCT116. Todas las líneas celulares fueron tratadas con RUNAT-BI fresco (0 a 42 μ M) durante 24 horas (A); 48 horas (B) y 72 horas (C). La proliferación celular se determinó con el ensayo MTT. Los puntos indican la media de tres experimentos independientes.

Figura 4: Porcentaje de viabilidad de la línea celular no tumoral tratada con RUNAT-BI fresco a las 72 h. La línea celular de glándula mamaria MCF10A se ha empleado como modelo para comprobar la selectividad de RUNAT-BI entre líneas tumorales y no tumorales. Esta línea celular ha sido tratada con RUNAT-BI fresco (0 a 42 μ M) durante 72 horas. La proliferación celular se determinó con el ensayo MTT. Los puntos indican la media de tres experimentos independientes.

Figura 5. Porcentaje de viabilidad de tres de las líneas celulares tratadas con RUNAT-BI no fresco a las 24, 48 y 72 h. Las líneas de CM perteneciente al grupo cáncer medular de mama atípico (CMMA): MCF-7 y MDA-MB-231 y la perteneciente al grupo cáncer de mama de mujeres jóvenes (CMMJ), fueron tratadas con RUNAT-BI no fresco (0 a 42 μ M) durante 24 horas (A); 48 horas (B) y 72 horas (C). La proliferación celular se determinó con el ensayo MTT. Los puntos indican la media de dos experimentos independientes.

Figura 6. Comparación de la migración celular del ensayo “cierre de la herida” en las líneas celulares estudiadas a las 48 h de tratamiento. La migración celular de las líneas celulares se midió con el ensayo “cierre de la herida” después de haber sido tratadas con el agente RUNAT-BI (21 μ M) durante 48 horas. Tres experimentos independientes se realizaron y se muestran los resultados más significativos. Las columnas expresan la media \pm SD del porcentaje de cierre en tres experimentos independientes. El color gris claro representa los controles con PEG mientras que el

gris oscuro son las células tratadas con RUNAT-BI. *P ≤ 0.1, **P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.01 estadísticamente significativo.

Figura 7: Comparación de la migración celular del ensayo “cierre de la herida” en las líneas celulares estudiadas a las 72 h de tratamiento. La migración celular de las líneas celulares se midió con el ensayo “cierre de la herida” después de haber sido tratadas con el agente RUNAT-BI (21 μM) durante 72 horas. Tres experimentos independientes se realizaron y se muestran los resultados más significativos. Las columnas expresan la media ±SD del porcentaje de cierre en tres experimentos independientes. El color gris claro representa los controles con PEG mientras que el gris oscuro son las células tratadas con RUNAT-BI. *P ≤ 0.1, **P ≤ 0.05, ***P ≤ 0.01 estadísticamente significativo.

Figura 8: Crecimiento celular de las líneas celulares tratadas con RUNAT-BI. Representación del crecimiento celular durante 10 días para estudiar la relación entre la efectividad de RUNAT-BI y la velocidad de crecimiento celular. El crecimiento se midió con la cámara de Neubauer empleando “Automated Cell Counter TC10TM”. Los puntos indican la media de dos experimentos independientes.

Ejemplos

Ejemplo 1:

20 Síntesis del compuesto RUNAT-BI:

Mediante la rampa de temperatura de síntesis solvotermal mostrada en la figura 1, se hizo reaccionar RuCl₃·H₂O (6,6 mg, 0,03 mmol) y 2,2'-biimidazol (12,1 mg, 0,09 mmol) en HCl (2,5 mL, 3 M) a 90 °C durante 20,5 h. Seguidamente, la mezcla de reacción se sometió a un proceso de enfriamiento durante 20,5 h hasta alcanzar la temperatura ambiente (25 °C). En la disolución azul oscuro generada aparecen cristales de color verde azulado. Rendimiento: 25-30%. El compuesto obtenido, RUNAT-BI, presenta las siguientes bandas de infrarrojo (IR/ cm⁻¹): 3278 (m), 3147 (m), 3129 (m), 3010 (m), 2923 (m), 2765 (m), 1638 (s), 1526 (s), 1417 (m), 1394 (m), 1319 (w), 1252 (w), 1177 (m), 1129 (m), 1078 (m), 1008(w), 922 (w), 870 (w), 811 (w), 754 (s), 682 (m).

30 La rampa de temperatura (mostrada en la figura 1) comprende una etapa de calentamiento durante 5 horas hasta alcanzar una temperatura de 90 °C,

mantenimiento de esta temperatura durante 20,5 horas y una etapa de enfriamiento hasta temperatura ambiente de 20,5 horas.

Métodos

5 Cultivo de las líneas celulares

Las células se crecieron en cultivo siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor. El medio de cultivo utilizado fue Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI), y para las líneas celulares BT474 y MCF10A Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), en ambos casos suplementado con 1% L-Glutamina y 10% Suero Fetal Bovino FBS y Penicilina/Estreptomicina al 1%, en unas condiciones de 37 °C al 10 5% de CO₂. Cuando los cultivos llegaron a una confluencia del 80-90%, las células fueron tripsinizadas con tripsina al 0,05% y se dividieron en una ratio 1:2 en medio fresco para permitir la expansión de los cultivos. Para la recogida del pellet, se esperó hasta que las células habían alcanzado una confluencia del 95% en el cultivo y se 15 recogieron con PBS en frío mediante raspado con Cell Scraper. A continuación, las células recogidas se centrifugaron a 1500 rpm a 4 °C durante 10 minutos y se guardaron a -80 °C hasta próximo uso.

Ensayos de proliferación celular: MTT

El protocolo usado fue un ensayo de MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- 20 difeniltetrazol) en el que se cultivaron 3000 células en placas de 96 pocillos. Posteriormente las células fueron tratadas con el agente específico y se realizó el ensayo de MTT a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento. MTT se trata de un ensayo colorimétrico indicador de la supervivencia y proliferación celular. Se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol 25 realizada por la enzima mitocondrial Succinato-deshidrogenasa, en unas condiciones definidas, a un compuesto coloreado de color morado (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. MTT, se trata de un tetrazol amarillo que se reduce a morado en las células vivas. Una solución de DMSO se añade para solubilizar el compuesto y convertir el insoluble formazan morado en una 30 solución coloreada, de la cual se mide posteriormente su absorbancia a 560 nm en el espectrofotómetro. Un incremento en la absorbancia se corresponde con un incremento en la proliferación celular, mientras que una disminución de la absorbancia supone una disminución de la proliferación celular. Cada valor se repite por triplicado y se calcula la

media. Cada absorbancia del compuesto ensayado se compara con su respectivo control no tratado. La viabilidad se calcula de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{DO células tratadas} \times 100) / \text{DO células control}$$

DO: Densidad óptica

5 Ensayos de migración celular: "cierre de la herida"

El ensayo "cierre de herida" (*Wound healing assay*) tiene como objetivo el estudio de la migración celular. Es un ensayo fácil, barato y ampliamente utilizado por los investigadores. Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluyente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o "herida".

- 10 Las células en el borde de la brecha se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la "herida". Captando las imágenes al principio y en intervalos de tiempo regulares durante la migración celular cerca de la brecha, se logra comparar y cuantificar la migración celular. En el estudio se cultivaron placas de 6 pocillos con una densidad de 4×10^5 células/pocillo y se incubaron durante
- 15 la noche hasta que alcanzaron una confluencia del 70%. Para crear la brecha en la capa celular se usó la punta de una pipeta y posteriormente las células se trataron con RUNAT-BI (21 μM). Cada experimento se realizó por triplicado y se repitió al menos 2 veces. Las imágenes se obtuvieron a las 0, 24, 48 y 72 h en la misma posición y el porcentaje de migración celular se evaluó usando el programa ImageJ, un programa
- 20 para procesar imágenes digitales.

Cálculo del tiempo de doblaje celular

Las líneas celulares de CM, tanto las de cáncer de CMMJ: HCC1500 y HCC1937, las de CMMA: MCF-7, BT474, MDA-MB-231, HCC1806. En la tabla 1 se muestra información de estas líneas celulares:

TABLA1: categorización, información y condiciones de cultivo de las líneas celulares de cáncer de mama empleadas.

Líneas celulares	Receptor Estrógenos	Receptor Progesterona	Receptor HER2	Mutación BRCA1	Subtipo	Medio de cultivo
MCF-7	+	+	-	WT	LA	RPMI, DMEM
MDA-MB-231	-	-	-	WT	TNA	RPMI
BT474	+	+	+	WT	LB	DMEM
HCC1937	-	-	-	MU	TNA	RPMI
HCC1806	-	-	-	ND	TNA	RPMI
HCC1500	-	-	-	WT	TNA	RPMI

- 5 Mutación BRCA1: WT (normal), MU (mutación), ND (No determinado) Subtipo: LA (Luminal A), LB (Luminal B), TNA (Triple negativo). Medio de cultivo: RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) y DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).

10 La línea celular de glándula mamaria no tumoral (MCF10A), la línea celular de cáncer gástrico (AGS) y la línea celular de cáncer de colon (HCT116), se han usado para estudiar la velocidad de crecimiento celular y determinar el tiempo de doblaje celular (CDT). Se hicieron recuentos de células a intervalos regulares. En el día 0 las células se plaquearon en placas de 6 pocillos, con una concentración inicial de 1×10^5 células por pocillo y cada línea celular se cultivó por duplicado. Se hicieron recuentos por duplicado en cámara de Neubauer empleando "Automated Cell Counter TC10TM"

15 (BioRad), cada 24 h durante 10 días después de teñir las células con azul de trypan. A partir de los datos de los recuentos de células, durante el tiempo estudiado se construyó la curva de crecimiento celular y se calculó el CDT mediante la herramienta online <http://www.doubling-time.com/compute.php>

Resultados

- 20 Salvo que se indique lo contrario RUNAT-BI se prepara fresco antes de realizar cada experimento.

Ensayo de proliferación celular tras el tratamiento con RUNAT-BI en líneas celulares tumorales

- Las líneas de CM pertenecientes al grupo de cáncer de mama en mujeres adultas CMMA: HCC1806, MCF-7, BT474 y MDAMB-231 y las pertenecientes al grupo Cáncer de mama en mujeres jóvenes CMMJ: HCC1937 y HCC1500, la línea celular de cáncer de colon (HCT116), la línea celular de cáncer gástrico (AGS) y la línea de glándula mamaria de origen humano no tumoral (MCF10A) se sometieron a concentraciones crecientes de RUNAT- BI (0, 5,25, 10,5, 21 y 42 μM) durante 24, 48 y 72 horas. Se han empleado dichas concentraciones ya que el compuesto madre elaborado tenía una concentración inicial de 42 mM (2 mg de producto en 100 μL de PEG). RUNAT-BI se preparó antes de cada experimento.
- 10 Tal y como muestra la Figura 3 se observó en casi todas las líneas una reducción en la proliferación celular, dosis y tiempo dependiente. A las 24 h no se observaron resultados destacables en ninguna de las líneas (Figura 3 A) y tabla 2:

TABLA 2: % de viabilidad celular a 24 h de tratamiento con distintas concentraciones de RUNAT-BI (μM)

μM	MCF-7	HCC1937	MDA-MB-231	BT474	HCC1806	HCC1500	HCT116	AGS
0	100	100	100	100	100	100	100	100
5,3	94,2	98,7	94,9	93,9	95,4	104,0	89,8	99,7
11	101,0	104,7	97,7	91,4	101,2	100,4	75,3	91,1
21	98,2	90,7	93,1	87,2	85,4	99,4	76,1	80,7
42	91,1	92,2	80,9	87,4	68,6	95,1	72,5	68,7

15

- aunque en varias de ellas: AGS, HCC1806 y HCT116 la viabilidad ya se redujo en torno a un 30% a 42 μM . A las 48 h (Figura 3 B) ya se observó una reducción muy consistente de la viabilidad de las líneas HCT116 y HCC1806, cuyos resultados se corroboran con los obtenidos a las 72 h llegando a un 25% y 35% de viabilidad, respectivamente. La línea de cáncer gástrico AGS mostró también una reducción de la viabilidad bastante importante llegando casi al 40%, con notables diferencias entre 48 h y 72 h. Las líneas de CMMA: MDAMB- 231 y BT474 mostraron una reducción de la viabilidad en torno al 30% a las 48 h. La línea MDA-MB-231 redujo casi un 30% su viabilidad a las 48h y un 40% a las 72h (Figura 3 B y C). La línea BT474 redujo un 30% a las 48h y un 50% la viabilidad en 72h. La línea de CMMJ: HCC1937, no fue de las más afectadas, quedándose a los tres tiempos (24, 48 y 72 h) sobre el 80% de viabilidad y la línea HCC1500 no presentó cambios en su viabilidad a ningún tiempo, quedándose por encima del 90% a las 72 h. Ocurrió algo semejante con MCF-7, perteneciente al grupo
- 20
- 25

CMMA, que no mostró reducciones significativas, quedándose en torno al 80% a las 72 h, al igual que HCC1937. En las tablas 3 y 4 se pueden observar los resultados de viabilidad a 48 y 72 h.

5

TABLA 3: % de viabilidad celular a 48 h de tratamiento con distintas concentraciones de RUNAT-BI (μM)

μM	MCF-7	HCC1937	MDA-MB-231	BT474	HCC1806	HCC1500	HCT116	AGS
0	100	100	100	100	100	100	100	100
5,3	112,4	105,3	91,4	107,8	93,6	122,1	85,0	79,0
11	104,2	97,3	92,4	101,3	80,3	108,2	73,5	83,5
21	93,0	83,4	83,5	78,2	48,4	96,7	40,0	69,2
42	92,5	79,9	69,7	71,4	36,2	88,7	41,5	64,7

TABLA 4: % de viabilidad celular a 72 h de tratamiento con distintas concentraciones de RUNAT-BI (μM)

μM	MCF-7	HCC1937	MDA-MB-231	BT474	HCC1806	HCC1500	HCT116	AGS
0	100	100	100	100	100	100	100	100
5,3	110,9	110,3	99,5	82,5	104,1	107,5	76,6	109,2
11	108,3	110,6	103,0	75,0	91,1	100,8	67,3	95,2
21	100,1	92,8	90,1	49,4	50,8	90,9	35,2	74,5
42	81,0	79,7	61,5	51,1	38,9	91,4	25,1	44,7

10 El tratamiento con RUNAT-BI muestra una relación entre la reducción de la viabilidad celular y la velocidad de crecimiento (tiempo de doblaje celular), observando que las líneas que más rápido crecen son las más afectadas por RUNAT-BI. Esta relación se muestra con más detalle en los resultados del estudio del cálculo del tiempo de doblaje celular.

15 Ensayo de proliferación celular tras el tratamiento con RUNAT-BI en una línea celular no tumoral

Para comprobar la selectividad de actuación de RUNAT-BI entre líneas tumorales y no tumorales, se empleó la línea de glándula mamaria no tumoral MCF10A. Tal y como muestran los resultados de la Tabla 5, no se reduce su viabilidad a ningún tiempo ni a ninguna concentración. A pesar del rápido crecimiento de esta línea celular, ya que se encuentra inmortalizada y por tanto se divide muy rápido, el tratamiento con RUNAT-BI no le afecta. El incremento en la viabilidad durante el paso del tiempo se puede

20

relacionar con la velocidad de crecimiento de dicha línea, ya que su tiempo de doblaje celular se encuentra en torno a 1,92 por lo que a los tres días debería doblar su población en torno al doble-triple, como se observa en la Tabla 5. El compuesto de la presente invención no afecta al crecimiento de líneas celulares no tumorales, como se observa con el ejemplo de la línea celular no tumoral MCF10A a las 72 h.

TABLA 5: % de viabilidad celular de la línea no tumoral MCF10A a 24, 48 y 72 h de tratamiento con distintas concentraciones de RUNAT-BI (μM)

μM	MCF10A	MCF10A	MCF10A
0	100	100	100
5,3	113,2	149,7	140,4
11	120,1	155,8	199,5
21	116,6	156,1	229,5
42	105,2	127,1	242,6

10 Comparación entre RUNAT-BI fresco y no fresco en proliferación celular

Otro de los experimentos llevado a cabo con RUNAT-BI fue comprobar si existían diferencias en la efectividad de RUNAT-BI en fresco o tras un máximo de 2 semanas desde su preparación, a temperatura ambiente y protegido de la luz. Para ello se sometieron a las líneas celulares de CM: MCF-7, HCC1937 y MDA-MB-231 a concentraciones crecientes de RUNAT-BI no fresco (0, 5,25, 10,5, 21 y 42 μM). Se seleccionaron estas líneas para valorar si el tiempo de preparación condicionaba la efectividad de RUNAT-BI y valorar si en estas líneas se obtenía mayor o menor reducción de la viabilidad, ya que en dos de ellas (MCF-7 y HCC1937) RUNAT-BI en fresco no mostró resultados muy efectivos y en MDA48 MB-231 la reducción de la viabilidad tampoco fue de las más notables, quedando al 60% a las 72 h de tratamiento.

Como muestran los resultados de la Figura 5, a las 24 h del tratamiento con RUNAT-BI no fresco no se observan cambios muy notables en la viabilidad, datos que coinciden con los experimentos de RUNAT-BI en fresco. A las 48 h, la línea MDA-MB-231 es la que muestra una reducción más importante llegando a una viabilidad del 70%, sin embargo, las otras dos líneas se muestran menos afectadas por el tratamiento. A las 72 h, MDA-MB-231 sigue siendo la línea que más reduce su viabilidad quedándose en torno al 60% como ocurría con RUNAT-BI en fresco, tal y como se observa en la gráfica

C de la Figura 3. Lo mismo ocurre con MCF-7 y HCC1937, también muestran mayor reducción a las 72 h quedándose en torno al 75-80% en ambos casos, como ocurre con RUNAT-BI fresco. Estos resultados confirman que no hay diferencias significativas entre el RUNAT-BI fresco, es decir preparado inmediatamente antes de usar, o no fresco, preparado con varias semanas de antelación.

Reducción de la migración de las líneas celulares tratadas con RUNAT-BI, medidos con el ensayo “cierre de la herida”

Las líneas de CM pertenecientes al grupo CMMA: MCF7, MDA-MB-231, HCC1806 y BT474, las pertenecientes al grupo CMMJ: HCC1937 y HCC1500, la línea de cáncer gástrico: AGS, la línea de cáncer de colon: HCT116 y la línea de glándula mamaria de origen humano no tumoral: MCF10A fueron tratadas con 21 μ M de RUNAT-BI o 21 μ M de PEG (control). Se realizó una brecha (herida) a las 0 h y el porcentaje de cierre de dicha herida se midió usando imágenes de 0 a 72 h. En la Figura 6 se muestran los resultados a 48 h y en la Figura 7 a 72 h. En la tabla 6 se pueden ver los resultados en ambos tiempos.

El ensayo “cierre de la herida” demostró que el agente antitumoral RUNAT-BI reduce significativamente la migración celular de estas líneas celulares. Más concretamente la línea HCC1806 tratada con RUNAT-BI mostró una reducción de la migración del 47,1% a las 48 h y del 65,7% a las 72 h respecto a la línea HCC1806 tratada con PEG. AGS tratada con RUNAT-BI mostró también una reducción muy significativa, sobre todo a las 72 h llegando al 54,3% respecto a la línea AGS tratada con PEG. HCT116 tratada con RUNAT-BI no mostró diferencias significativas en la reducción de la migración celular entre las 48 h y 72 h, quedándose en ambos casos entre 21-22% de cierre respecto a la línea HCT116 tratada con PEG. Cabe destacar que AGS y HCT116 son líneas celulares con una velocidad de crecimiento muy alta, en el caso de HCT116 en el tratamiento con RUNAT-BI se observó una reducción significativa en la velocidad de crecimiento celular en comparación con el tratamiento control (tratada con PEG) mientras que AGS mantuvo su elevada velocidad de crecimiento y su tiempo de doblaje celular, pero mostró mayor reducción en la migración celular. Los valores de migración se obtienen de la diferencia en el área de la herida entre las 0 h y las 48 h o 72 h para cada condición. Estos resultados concuerdan con los observados anteriormente en los ensayos de MTT, ya que estas tres líneas presentaron una reducción significativa de la viabilidad celular con el tratamiento con RUNAT-BI. La línea BT474 a las 48 h en el tratamiento con RUNAT-BI mostró una reducción de la migración celular del 14,1% y a

las 72 h redujo la migración a 23,1% respecto a la línea BT474 tratada con PEG. Sin embargo, cabe destacar que esta línea celular mostró una clara apoptosis con el tratamiento RUNAT-BI a las 72 h, por ser una línea que crece muy lentamente.

TABLA 6 Porcentaje de cierre de herida a 48 y 72 horas

	48 h		72 h	
	PEG	RUNAT-BI (21□M)	PEG	RUNAT-BI (21□M)
HCC1500	-0,4	-4,8	4,7	-5,7
HCC1937	19,0	4,5	30,5	11,5
HCC1806	28,8	-18,3	68,1	2,4
MDA-MB-231	62,0	22,8	60,2	45,7
MCF-7	3,6	3,1	9,3	7,3
BT474	16,3	2,2	17,8	-5,3
HCT116	27,0	5,4	33,9	11,6
AGS	51,4	26,7	84,8	30,5
MCF10A	4,8	4,6	21,3	20,5

5

Las líneas celulares pertenecientes al grupo CMMJ: HCC1937 y HCC1500, eran de las líneas que mostraron menor reducción de la viabilidad y ocurrió parecido con la migración celular, HCC1937 tratada con RUNAT-BI redujo su migración un 14,5 % a las 48 h y un 19,0% a las 72 h respecto a la línea HCC1937 tratada con PEG. Cabe destacar que las muestras de esta línea celular tratadas con RUNAT-BI redujeron considerablemente su velocidad de crecimiento, al igual que ocurrió en BT474. HCC1500 no mostró apenas migración con el tratamiento control (PEG) a ningún tiempo, probablemente, debido al lento crecimiento celular de esta línea y con el agente RUNAT-BI la apertura de la brecha incluso se aumentó a las 48 h y 72 h, observándose un claro incremento de células muertas entre las imágenes a las 0 h y a las 48 h y 72 h.

La línea de glándula mamaria no tumoral MCF10A no mostró diferencias en la migración entre condiciones, quedándose prácticamente igual en el tratamiento con RUNAT-BI que, en el control, con PEG. Sí que se observaron diferencias entre las 48 h y 72 h, ya que a este último tiempo en las dos condiciones se produjo migración celular. Esta línea no mostró apoptosis en las muestras tratadas con RUNAT-BI, tal como se ha mostrado en los experimentos anteriores de proliferación. Estos resultados corroboran los obtenidos en el ensayo de viabilidad celular, demostrando de nuevo la selectividad de RUNAT-BI entre líneas tumorales y no tumorales.

20

Los resultados obtenidos en el ensayo de migración celular se corroboran con los obtenidos en los ensayos de viabilidad, siendo claramente las líneas HCT116, AGS y HCC1806 en las que RUNAT-BI ejerce mayor efecto. La selectividad de actuación entre las líneas tumorales y la línea no tumoral (MCF10A) se vuelve a demostrar con los resultados obtenidos en el ensayo “cierre de la herida”, ya que a ninguno de los dos tiempos estudiados se observa diferencia en la migración entre las distintas condiciones. En la Figura 6 se muestran las diferencias de migración celular expresadas por línea celular a las 48 h, y en la Figura 7, a las 72 h.

En casi todas líneas se observa mayor migración a las 72 h que a las 48 h y una clara diferencia entre las muestras control (tratadas con PEG) y las tratadas con RUNAT-BI. Generalmente son las líneas que más rápido crecen las que más logran cerrar la brecha en las muestras control, algunas de ellas son capaces de cerrar casi por completo la brecha, como por ejemplo la línea celular AGS a las 72 h.

15 Tiempo del doblaje celular (CDT) de las líneas celulares empleadas.

Se ha calculado el tiempo de doblaje celular (CDT, Cell Doubling Time) de las líneas celulares HCC1500, HCC1937, MCF-7, BT474, MDA-MB-231, HCC1806, AGS, HCT116 y MCF10A. Este valor nos permite conocer la velocidad de crecimiento de cada línea, ya que cuanto menor sea el CDT más rápido crece esa línea. Se ha estudiado la relación entre el CDT y la efectividad del RUNAT-BI, ya que la principal diana de acción principal se encuentra en el ADN y se quiere conocer la relación entre la velocidad de crecimiento celular y la efectividad del agente. El RUNAT-BI tiene mayor efecto en las líneas que más rápido se dividen, ya que, al replicarse más rápido, el complejo se intercala con el ADN que se está replicando, afectando así a la viabilidad de la célula.

25 En la Figura 8 se observa la gráfica de crecimiento de cada una de las líneas celulares en 10 días, en la Tabla 7 se puede observar el tiempo de doblaje celular del panel de líneas celulares del experimento. Son las líneas HCT116, HCC1806 y AGS las que mayor pendiente muestran en la gráfica, por tanto, las que menor CDT tienen, como se observa en la tabla contigua y además son en las que RUNAT-BI ha resultado más efectivo, ver panel C de la Figura 3. Las líneas con mayor CDT y que, por tanto, crecen más lento son HCC1500 y HCC1937. En las líneas BT474 y MDAMB-231 RUNAT-BI presentaba menor efectividad. Este hecho se puede relacionar con que su velocidad de crecimiento es inferior a HCT116, HCC1806 y AGS. Sin embargo, no existen una

relación tan obvia ya que MCF-7 es una línea que se divide relativamente rápido, sin embargo, RUNAT-BI, no tiene un efecto muy significativo en ella. De forma similar ocurre con MCF10A, que a pesar de tener una división rápida RUNAT-BI no interfiere en su crecimiento.

5 TABLA 7: Tiempo de doblaje celular de un panel de líneas celulares empleadas

Línea celular	CDT (días)
HCT116	0,972
HCC1806	1,029
AGS	1,113
MCF10A	1,922
MCF-7	2,199
MDA-MB-231	2,241
BT474	2,530
HCC1937	3,419
HCC1500	4,579

A la vista de los resultados, el efecto de RUNAT-BI se relaciona con la velocidad de crecimiento celular.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de rutenio (III) que tiene la fórmula $\{\text{cis}[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{biim})_2]\text{Cl}\}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en la que H_2biim significa 2,2'-biimidazol.
2. Compuesto según la reivindicación 1, que está formado por dos isómeros.
- 5 3. Procedimiento para la preparación de un compuesto de Ru (III) definido en una de las reivindicaciones 1 a 2 que comprende:
 - realizar una síntesis solvotermal mediante una rampa de temperatura de un compuesto de rutenio de partida, que es $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, con 2,2'-biimidazol en ácido clorhídrico,
 - una etapa de enfriamiento hasta la temperatura ambiente.
- 10 - aislamiento del sólido obtenido en la mezcla de reacción.
4. Procedimiento según la reivindicación anterior en el que la rampa de temperatura comprende elevar la temperatura hasta una temperatura entre 85 y 95°C.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 o 4, en el que el tiempo invertido hasta alcanzar la temperatura final es de 1 a 6 horas, preferentemente de 5 horas.
- 15 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la concentración de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la mezcla de síntesis es desde 0,01 a 0,05 M, preferentemente 0,012 M.
7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 6, en el que la concentración de 2,2'-biimidazol en la mezcla de síntesis es desde 0,01 a 0,05 M, preferentemente 0,036 M.
- 20 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 3 a 7, en el que el ácido clorhídrico tiene una concentración en la mezcla de síntesis de 1 a 6 M, preferentemente, de 3 M.
9. Compuesto definido en una de las reivindicaciones 1 o 2, u obtenido de acuerdo con el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, para su uso terapéutico.
- 25 10. Compuesto definido según la reivindicación anterior, para su uso como agente anticancerígeno.
11. Compuesto según la reivindicación anterior, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer gástrico y cáncer de colon.
12. Compuesto según una de las reivindicaciones 10 u 11, en el que el cáncer de mama es subtipo TNA y/o luminal B.
- 30

13. Compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que el cáncer de mama es cáncer de mama en mujeres jóvenes.

14. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 o 2, u obtenido de acuerdo con el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

15. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido en una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 1 o 2, u obtenido de acuerdo con el procedimiento definido en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, que comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable para su uso como agente anticancerígeno, según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15, que se administra a un paciente por vía parenteral, oral, nasal, rectal, tópica o bucal.

17. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 15 a 16, que se administra como tratamiento posterior o simultáneamente a al menos un tratamiento seleccionado entre: cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia.

18. La composición farmacéutica según la reivindicación 15 a 17, que comprende además un agente terapéutico adicional como cis-platino, 5-fluorouracilo, oxaliplatino, irinotecan, capecitabina, gemcitabina, cetuximab, paclitaxel, docetaxel, bevacizumab, regorafenib, aflibercept, trastuzumab, pertuzumab, nab-paclitaxel, trastuzumab-emtansina, atezolizumab, carboplatino.

19. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 anteriores, en la que la dosis eficaz de $\{\text{cis-}[\text{RuCl}_2(\text{H}_2\text{biim})_2]\text{Cl}\}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ es de 0,0001 a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal por día.

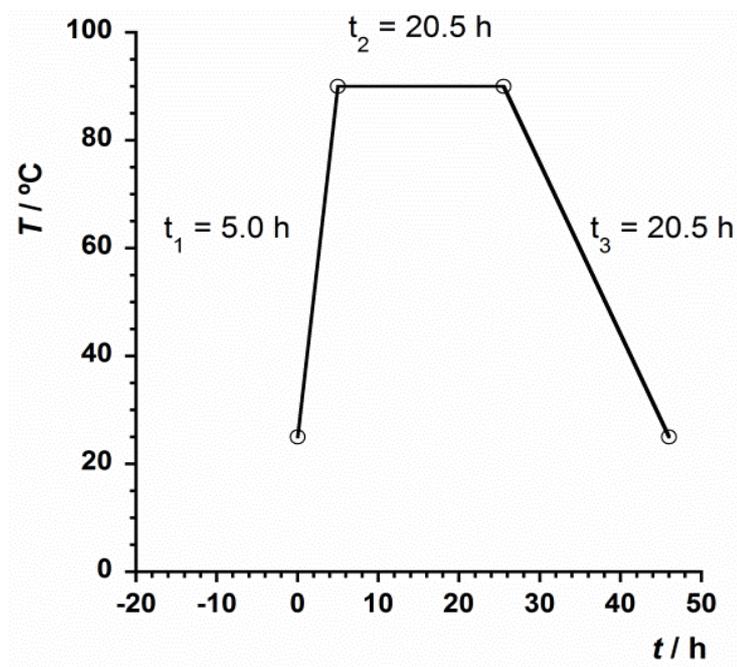


Figura 1

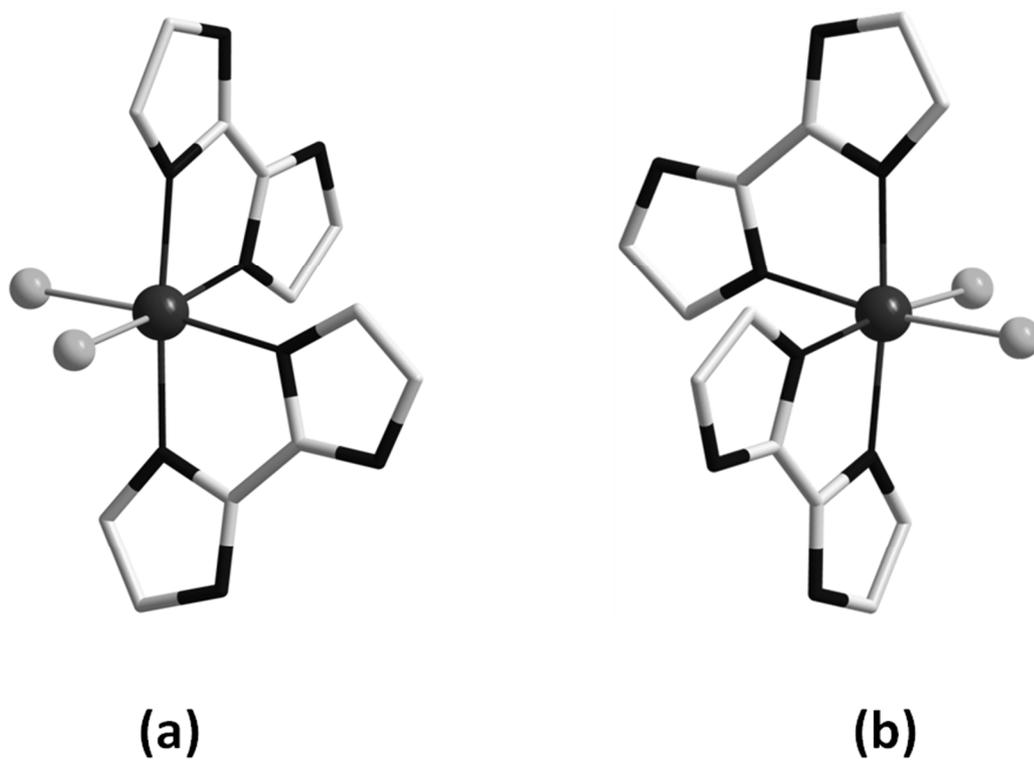


Figura 2

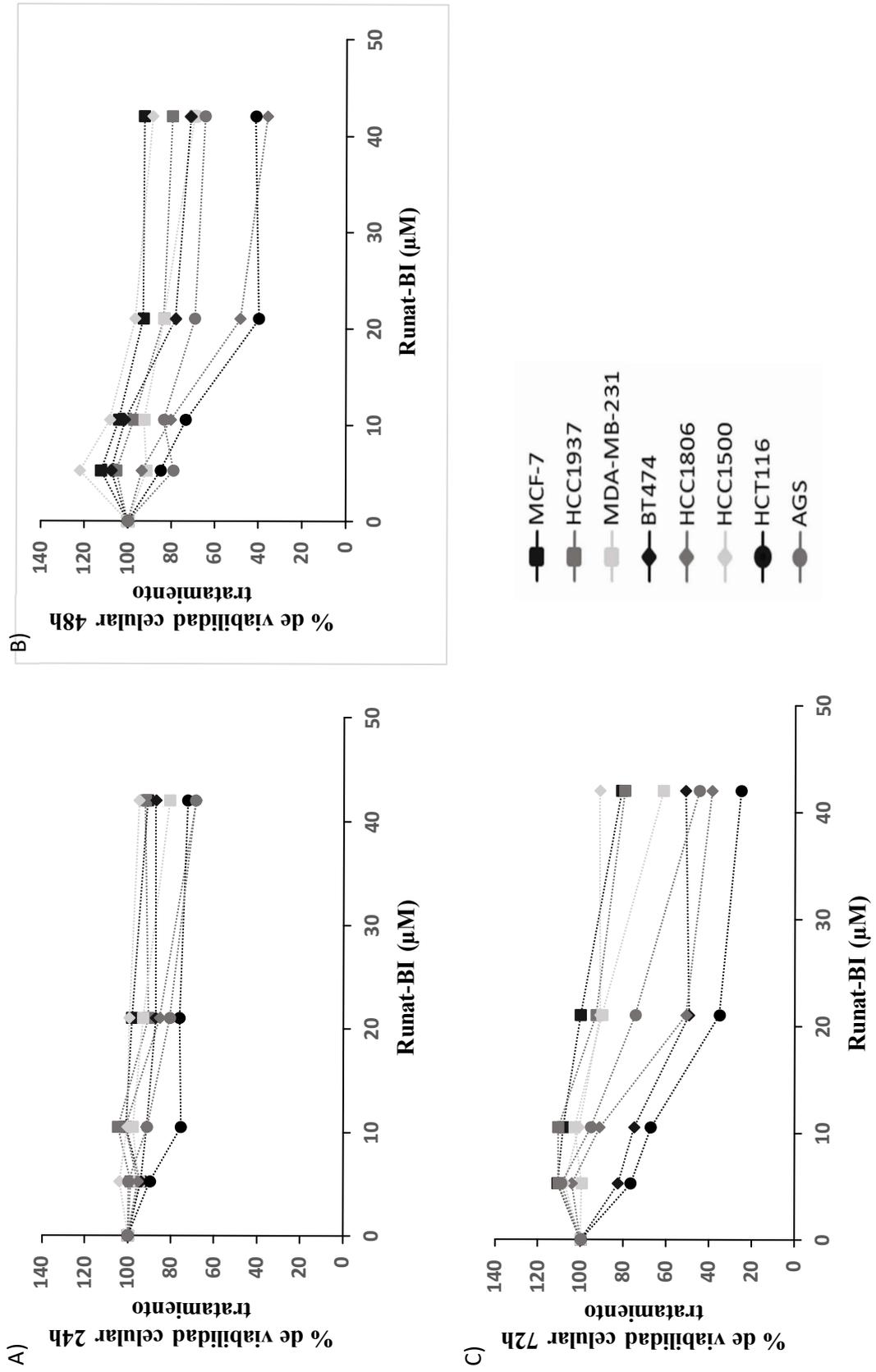


Figura 3

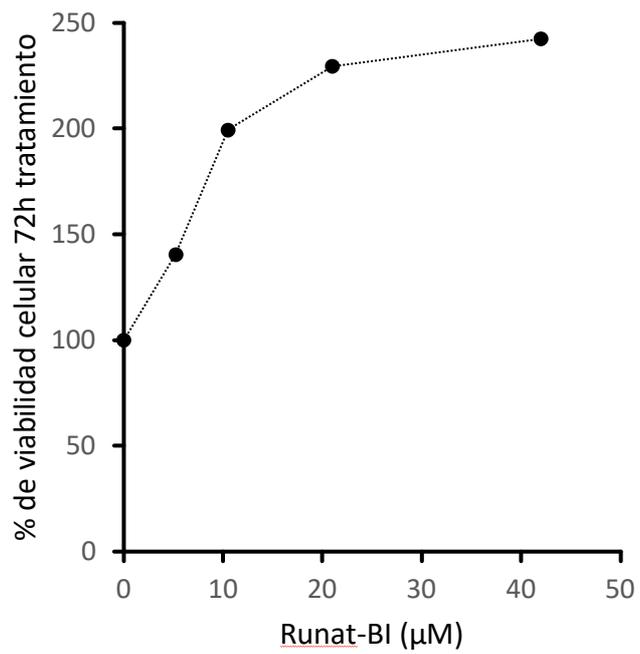


Figura 4

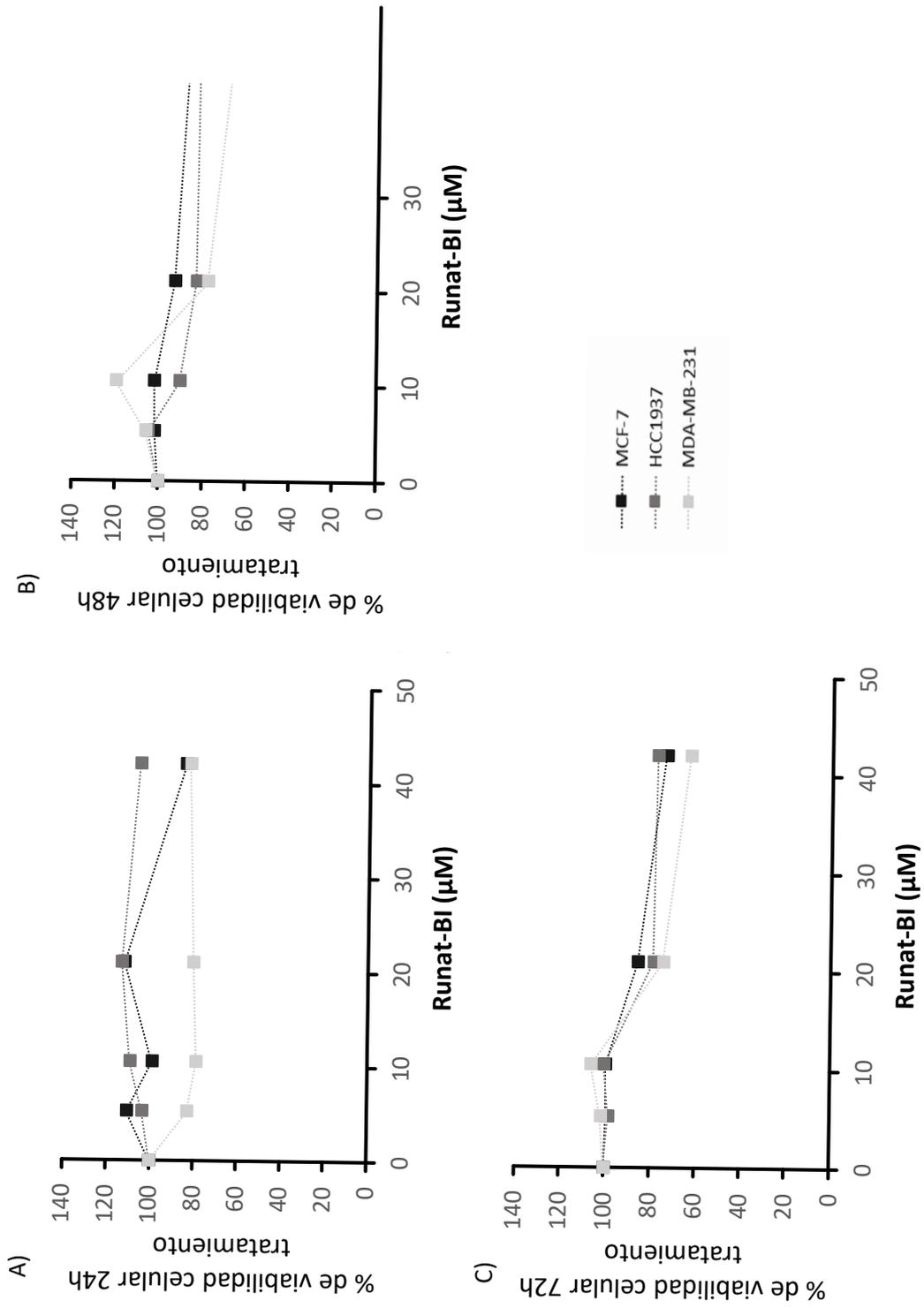


Figura 5

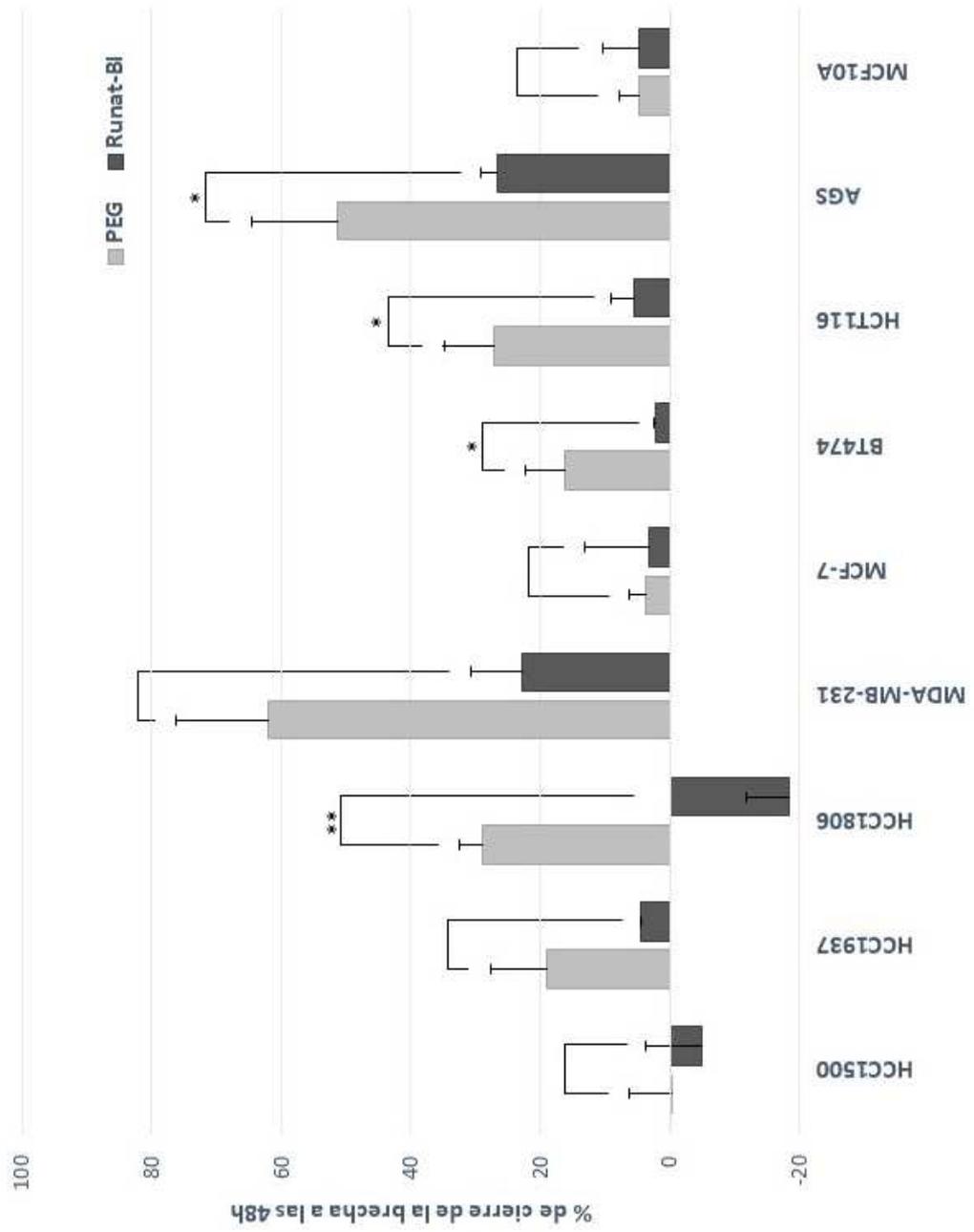


Figura 6

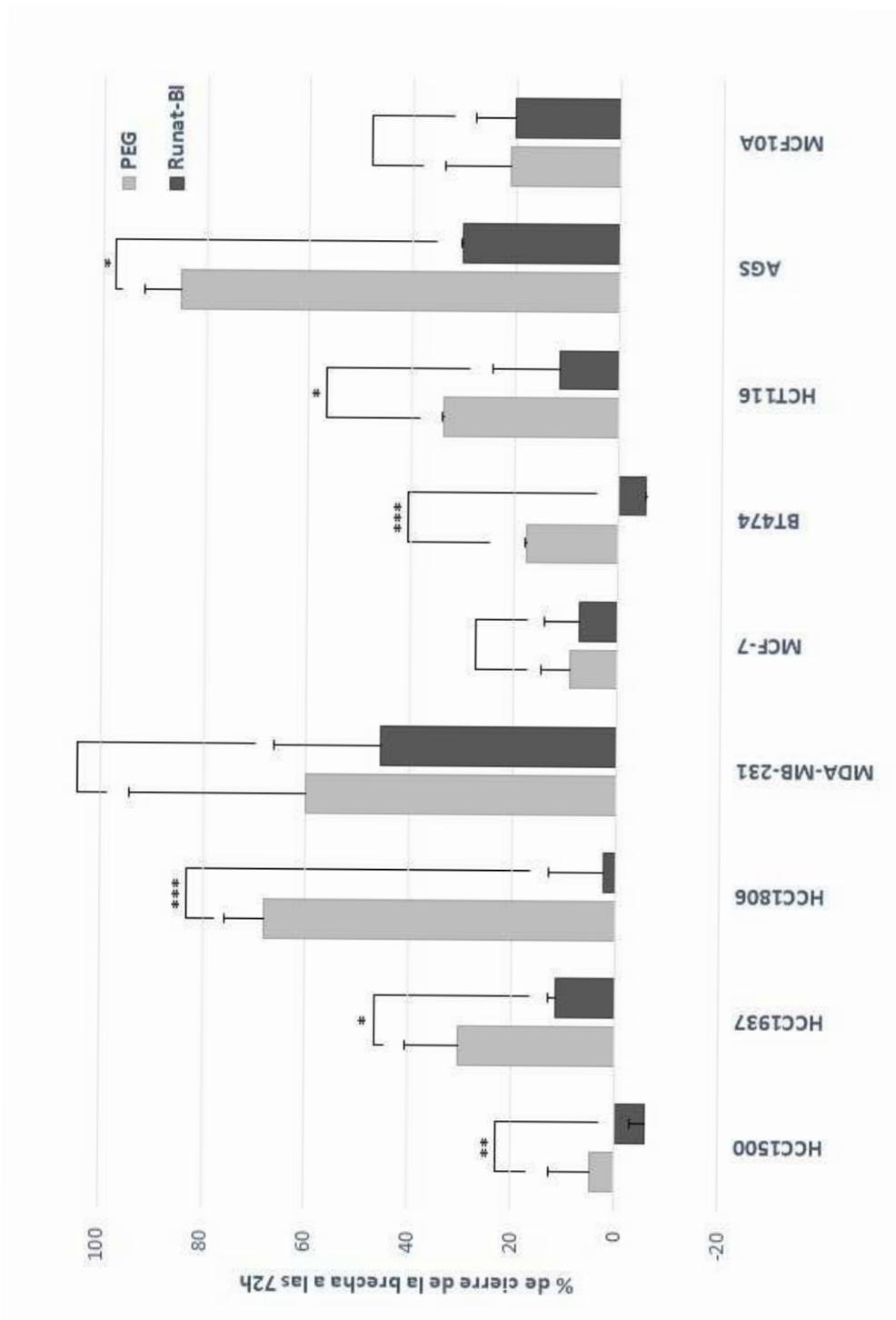


Figura 7

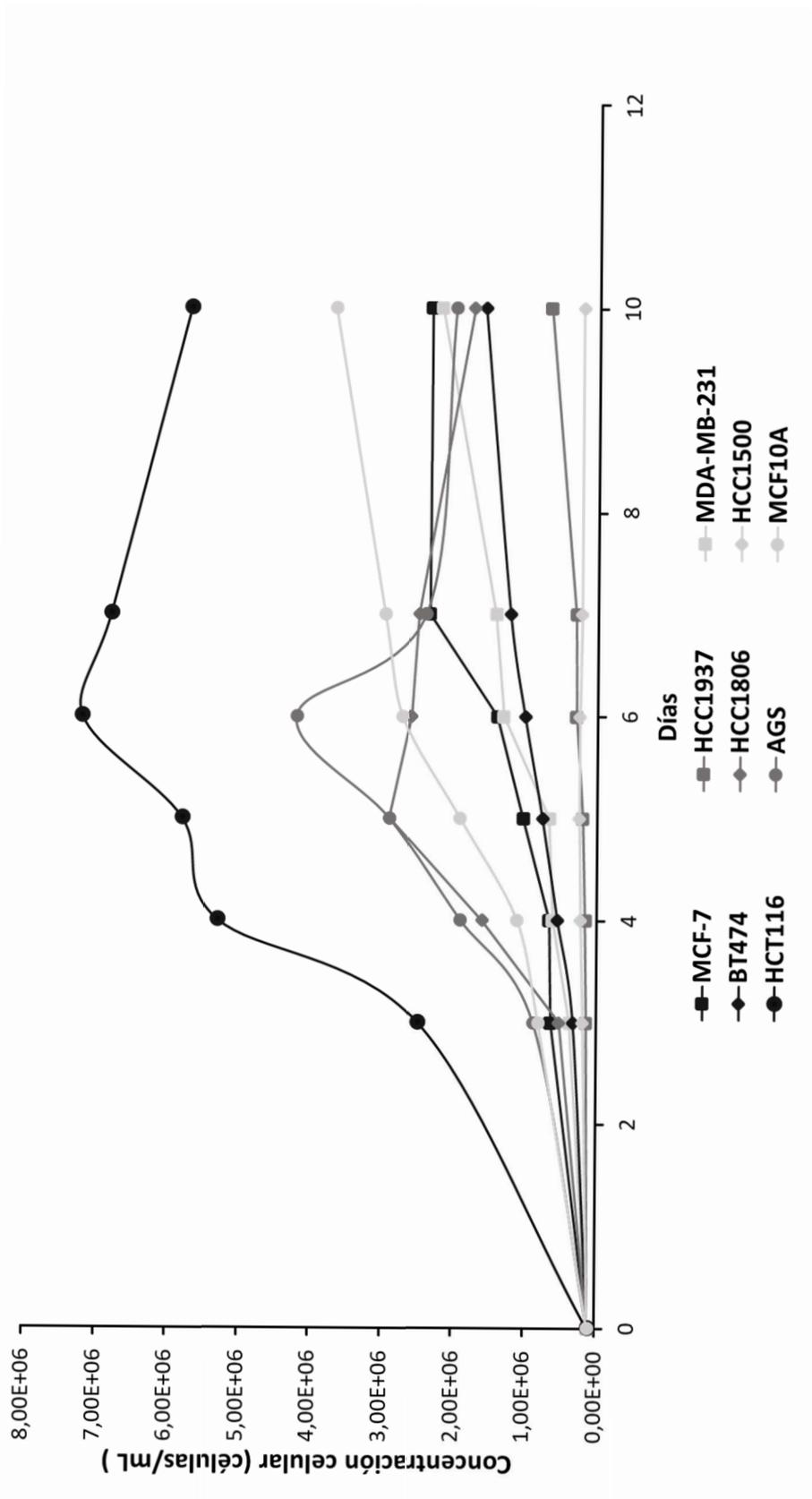


Figura 8