



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 467**

51 Int. Cl.:
C07F 9/20 (2006.01)
C07F 9/78 (2006.01)
C07F 9/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00965636 .4**
96 Fecha de presentación : **20.09.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **1228076**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.08.2002**

54 Título: **Un compuesto sustancialmente impermeable a la membrana celular y uso del mismo.**

30 Prioridad: **20.09.1999 AU PQ2967**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2011

73 Titular/es: **NEWSOUTH INNOVATIONS Pty. LIMITED**
Rupert Myers Building Level 2
Gate 14 Barker Street UNSW
Sydney, NSW 2052, AU

72 Inventor/es: **Hogg, Philip, John y**
Donoghue, Neil

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 366 467 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

Un compuesto sustancialmente impermeable a la membrana celular y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos sustancialmente impermeables a la membrana celular que tienen la capacidad de inhibir las proteínas rédox activas, y a métodos para su síntesis. En particular, la invención se refiere a compuestos organoarsénicos trivalentes, sustancialmente impermeables a la membrana celular, y a métodos para su síntesis. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a métodos de tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, enfermedades de los vasos sanguíneos, trombosis, infecciones víricas, y tumores hematológicos y sólidos.

15 **Antecedentes de la invención**

Algunas proteínas secretadas experimentan reacciones rédox, es decir, transfieren o arrastran hidrógenos y electrones entre aminoácidos. El aminoácido implicado más a menudo es cisteína, implicando la reacción rédox en particular, cisteína tiol. Los cambios rédox en los restos cisteína puede conducir a una reducción neta, formación neta o intercambio neto de enlaces disulfuro.

La evidencia reciente sugiere que las proteínas de la superficie celular están bajo el control rédox, a diferencia de las proteínas intracelulares. La naturaleza reductora del entorno intracelular facilita el intercambio entre la forma reducida y oxidada de ditioles próximos (para una revisión, véase Huppa and Ploegh, 1998). En contraste, la naturaleza oxidante del entorno extracelular generalmente se considera que impide la existencia de ditioles próximos, que se cree que existen en lugar de los enlaces disulfuro o como disulfuros mixtos con otros compuestos de tiol. Los tioles próximos tienen la capacidad de intercambiar entre el ditiol reducido y el enlace disulfuro oxidado y, por lo tanto, es probable que sean importantes para la función de las proteínas rédox activas.

Los arsénicos trivalentes forman estructuras de anillo de alta afinidad con tioles próximos. Los ditioles próximos incluyen tioles que son químicamente vecinales, como en 2,3-dimercaptopropanol (DMP), por ejemplo, así como tioles que se llevan a una aposición espacial por plegado (Jauhianinen et al., 1998). Debido a factores entrópicos, los ditioarsenitos cíclicos resultantes son notablemente más estables que los productos no cíclicos formados a partir de arsénicos trivalentes y monotioles (Stockten and Thompson, 1946). Los derivados arsénicos se han usado en el pasado como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, las toxicidades inherentes de los compuestos arsénicos y su índice terapéutico generalmente desfavorable han impedido básicamente su uso como agentes farmacéuticos.

En consecuencia, hay una necesidad de desarrollar compuestos arsénicos terapéuticamente activos que sean relativamente no tóxicos y que sean eficaces en el tratamiento de enfermedades de mamífero, particularmente aquellas enfermedades relacionadas con células de proliferación rápida.

En *Chemico-Biological Interactions* 90 (1994), 139-155, Delnomdedieu et al. describen un estudio de RMN de la reducción y unión de arsenato y dimetil arsinato mediante glutatión. Se describe un compuesto arsénico pentavalente.

El uso de 4-arsono-2-nitrofluorobenceno para modificar químicamente ribonucleasa A se describe por Hummel et al. en *International Journal of Peptide and Protein Research* (1984), 24(1), 1-13 y en *Biochemistry* 1981, 20, 4843-4852. Ambas publicaciones describen compuestos arsono-nitrofenilo sustituidos con lisina o arginina, que son compuestos de arsénico pentavalente.

En *Archiv der Pharmazie* (Weinheim, Alemania), 1916, 254, 224-40, Sieburg presenta un estudio para sintetizar y estudiar el comportamiento químico de ésteres de compuestos de arsénico aromáticos con aminoácidos y alcoholes superiores. Entre los compuestos descritos están las p-arsinobenzoilamidas de ácido glutámico y ácido aspártico.

La presente invención proporciona compuestos en los que un arsénico trivalente está unido a un grupo colgante sustancialmente impermeable a la membrana celular. La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y su uso médico en el tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, enfermedades de los vasos sanguíneos, trombosis, infecciones víricas y tumores hematológicos y sólidos.

60

Descripción de la invención**1. Derivados organoarsénicos trivalentes**

La invención proporciona un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo:



en la que

A se selecciona entre glutatión, glucosamina, cisteinilglicina, ácido cisteico, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina, y en la que el átomo de azufre de cada compuesto que contiene azufre puede estar opcionalmente oxidado para formar un sulfóxido o sulfona;

Y comprende al menos un grupo arsenóxido representado por $-As=O$;

p es un número entero seleccionado de 1 a 10;

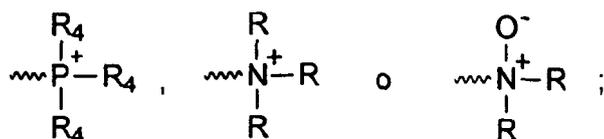
B se selecciona entre alquileo C_1-C_5 , arileno C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

X' se selecciona entre $-O-$, $-S-$, $-NR-$, $-C(O)-$ y $-C(O)O-$, o está ausente;

B' es alquileo C_1-C_5 , arileno C_6-C_{12} o está ausente; y

R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

en el que para cada caso de que B y/o B' sea arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido) pueden estar en una relación para, meta u orto, y en el que cada alquileo, arileno y acilo pueden estar sustituidos independientemente con hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a} , SR_6 , nitro, arsenóxido, $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)R_4R_4$, $-NMR''$)₂, $-NRC(O)(CH_2)_mQ$, $-C(O)R_5$,



en las que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} o acilo C_2-C_5 ;

R_{2a} se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)(R_4)_2$ o $-C(O)R_5$;

cada R_3 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 o ariltio C_6-C_{12} ;

cada R_4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , halo o $N(R)_2$;

cada R_5 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , OH, SH o $N(R)_2$;

R_6 se selecciona entre alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$ o $-C(O)R_5$,

R'' es igual que R anterior;

Q se selecciona entre halógeno y $-OS(O)_2Q_1$; en la que Q_1 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , perfluoralquilo C_1-C_4 , fenilo, p-metilfenilo; y

m es de 1 a 5,

en el que la suma total de átomos de carbono en A y $[(XBX')_nB']$ juntos es mayor de 6.

Típicamente A es glutatión.

Típicamente p es un número entero de 1 a 8. Más típicamente p es un número entero de 1 a 5. Aún más típicamente p es un número entero de 1 a 3. Aún más típicamente, p es 1.

Aún más típicamente,

B es acilo C_2-C_5 ;

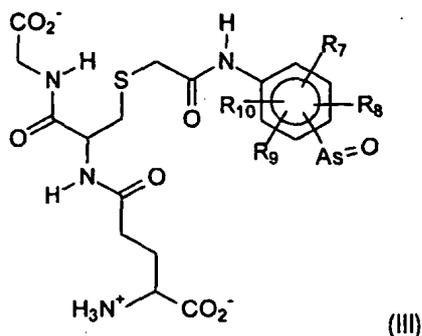
X' es NR;

B' es fenileno; y

R es H;

en la que los sustituyentes unidos directamente al anillo de fenileno están en una relación para, meta u orto.

En una realización el compuesto de la invención se representa mediante la Fórmula (III):

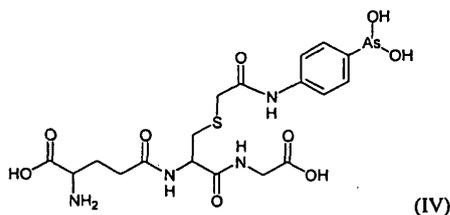


5 en la que R_7 a R_{10} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C_1-C_5 , $-OS(O)_2R_3$ y $NHC(O)CH_2Q$ en la que Q es halógeno, $-OS(O)_2CH_3$, $-OS(O)_2C_6H_5$ y $-OS(O)_2-p$ toliolo.

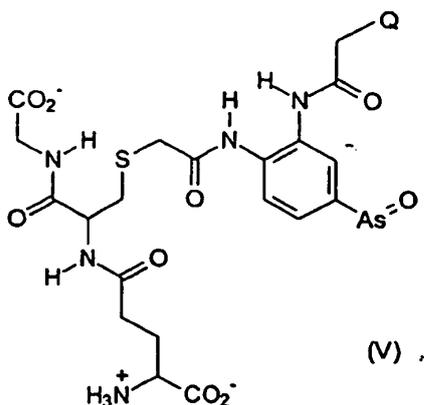
Más típicamente, R_7 a R_{10} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi, alcoxi C_1-C_5 , metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo y $NHC(O)CH_2Q$ en la que Q es halógeno, $-OS(O)_2CH_3$, $-OS(O)_2C_6H_5$ o $-OS(O)_2-p$ toliolo.

10 Cuando B' es arileno, los sustituyentes fijados al anillo de arileno están en una relación orto-, meta- o para- respecto al $-As=O$. Más típicamente, los sustituyentes están en una relación meta o para respecto al grupo $-As=O$.

15 En otra realización el compuesto de la invención es 4-(N-(S-glutationilacetil)amino)-fenilarsenóxido (GSAO) y está representado por la Fórmula IV:

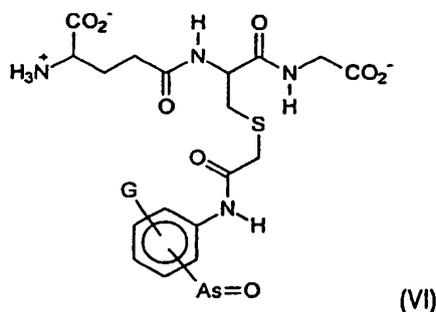


20 En una realización adicional el compuesto de la presente invención está representado por la Fórmula (V):



25 en la que Q es cualquier halógeno. Por ejemplo, la invención proporciona los compuestos 3-(N-(fluoroacetil)amino)-4-(N-(S-glutationilacetil)amino)fenilarsenóxido, que puede abreviarse como GSFAO, 3-(N-(cloroacetil)amino)-4-(N-(S-glutationilacetil)amino)fenilarsenóxido, que puede abreviarse como GSCAO, 3-(N-(bromoacetil)amino)-4-(N-(S-glutationilacetil)amino)fenilarsenóxido, que puede abreviarse como GSBAO y 3-(N-(yodoacetil)amino)-4-(N-(S-glutationilacetil)amino)fenilarsenóxido, que puede abreviarse como GSIAO.

En otra realización más el compuesto de la invención se representa por la Fórmula (VI):



5 en la que G se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, alquilo C₁-C₅ y arilo C₆-C₁₂ y -NHC(O)CH₂Q, en la que Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ o OS(O)₂-p toliolo.

Típicamente, G se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo y -NHC(O)CH₂Q, en la que Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ o OS(O)₂-p toliolo.

Más típicamente, en un compuesto de Fórmula VI, G es hidroxilo, flúor, amino o nitro.

Típicamente, el grupo G está en una relación orto-, meta- o para- respecto al grupo arsenóxido, más típicamente en una relación orto o para.

Típicamente, la actividad del átomo de arsénico puede modificarse mediante el grupo G, cuando G y el átomo de arsénico están en una relación orto o para entre sí. Por ejemplo, cuando G es un grupo dador de electrones, tal como OH (ionizado a O⁻ a un pH fisiológico), el átomo de arsénico debería estar desactivado hacia los ditiolos y, por lo tanto, hacerse más selectivo, reaccionando solo con ditiolos muy reactivos. Como alternativa, cuando G es un grupo aceptor de electrones, tal como NO₂, la densidad electrónica se extraería del átomo de arsénico, haciéndolo más reactivo a todos los ditiolos. La inhibición selectiva de algunas proteínas redox y no de otras puede conseguirse por manipulación de G.

Los compuestos de la invención pueden unirse a grupos detectores.

Típicamente, el grupo detector se selecciona entre un fluoróforo, biotina, un radionúclido, fluoresceína, y un grupo que comprende un elemento de transición.

30 Cuando el grupo detector es un radionúclido, típicamente se selecciona entre ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re y ^{99m}Tc.

Más típicamente, el grupo detector de radionúclidos es ³H o ¹⁴C.

Un compuesto de la invención puede prepararse mediante un proceso que comprende hacer reaccionar un grupo (A) con un grupo enlazador y/o espaciador (XB'X')B', al que está fijado al menos un arsenóxido.

Una persona experta en la materia reconocerá que el orden específico de las reacciones dependerá del compuesto particular de la invención que se está produciendo.

40 Por ejemplo, el proceso típicamente comprende hacer reaccionar glutatión con un grupo enlazador y/o espaciador adecuado (XB'X')B' al que está fijado al menos un arsenóxido, en condiciones de reacción adecuadas.

2. Composiciones farmacéuticas/terapéuticas y usos de las mismas

45 La presente invención proporciona también una composición farmacéutica que comprende un compuesto o sal de la invención, como se ha definido anteriormente, junto con un vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Además, la invención proporciona un compuesto o sal de la invención como se ha definido anteriormente para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular.

Típicamente, la enfermedad se selecciona entre enfermedades dependientes de angiogénesis, trastornos inflamatorios y/o enfermedades autoinmunes, enfermedad vascular y trombosis, infección vírica y cáncer. De esta manera, en una realización el compuesto o sal de la invención, como se ha definido anteriormente, es para su uso

en la inhibición de angiogénesis. La invención proporciona adicionalmente el uso de un compuesto o sal de la invención como se ha definido anteriormente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular o para el uso en la inhibición de angiogénesis.

5 En los usos médicos de la invención, las sales de los compuestos de la presente invención serán sales farmacéuticamente aceptables; aunque pueden usarse otras sales en la preparación del compuesto de la presente invención o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Típicamente, para los fines de los usos médicos de la invención como se ha definido anteriormente, un experto en la materia podrá, por experimentación rutinaria, determinar qué cantidad eficaz, no tóxica del compuesto de la presente invención será adecuada para el fin de tratar una enfermedad particular.

15 En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "que comprende" significa "que incluye principalmente, aunque no necesariamente únicamente". Adicionalmente las variaciones de la palabra "que comprende" tales como "comprender" y "comprende" tienen significados que varían correspondientemente.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "arsenóxido" significa el grupo $-As=O$.

20 En el contexto de esta memoria descriptiva, los grupos descritos como $-As=O$ y $-As(OH)_2$ deben considerarse como sinónimos.

El término "arsénico" como se usa en este documento, incluye cualquier compuesto que contiene arsénico.

25 El término "acilo" como se usa en este documento, incluye restos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo y cicloalquenilo monovalentes y divalentes que poseen un sustituyente carbonilo terminal en el que la fijación puede ocurrir en el resto hidrocarburo, el resto carbonilo o ambos.

30 El término "alquilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, saturados y monovalentes.

El término "alquenilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, monovalentes que tienen al menos un doble enlace.

35 El término "alquinilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal o ramificada monovalentes que tienen al menos un triple enlace.

El término "alquilenilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal saturados divalentes.

40 El término "alquenileno" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal divalentes, que tienen al menos un doble enlace.

45 El término "alquinileno" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo de cadena lineal divalentes, que tienen al menos un triple enlace.

El término "arilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo aromáticos conjugados y condensados, polinucleares, individuales y monovalentes.

50 El término "arileno" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo aromáticos conjugados y condensados, polinucleares, individuales y divalentes.

La expresión "ditiol próximo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, tioles que son químicamente vecinales, así como tioles que se llevan a aposición espacial gracias a la conformación molecular.

55 El término "cicloalquilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y monovalentes.

60 El término "cicloalquileno" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y divalentes.

El término "cicloalquenilo" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y monovalentes, que tienen al menos un doble enlace.

65 El término "cicloalquileno" como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales hidrocarburo monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y divalentes, que tienen al menos un

doble enlace.

El término “halo” como se usa en este documento, incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

- 5 El término “heteroarilo” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales aromáticos monovalentes, individuales, polinucleares, conjugados y condensados que tienen de 1 a 12 átomos en el que de 1 a 6 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

- 10 El término “heteroarileno” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales aromáticos divalentes, individuales, polinucleares, conjugados y condensados que tienen de 1 a 12 átomos en el que de 1 a 6 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N y S.

- 15 El término “heterocicloalquilo” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales monovalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o condensados en los que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N o S.

- 20 El término “heterocicloalquileno” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y divalentes, en los que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N o S.

- El término “heterocicloalquenilo” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y monovalentes, que tienen al menos un doble enlace y en los que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N o S.

- 25 El término “heterocicloalquenileno” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado, radicales monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados, saturados y divalentes, que tienen al menos un doble enlace y en los que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados entre O, N o S.

- 30 La expresión “ácido fenilarsónico” como se usa en este documento, debe considerarse sinónimo de “ácido benceno sulfónico”.

- 35 La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en este documento, incluye dentro de significado una cantidad no tóxica, aunque suficiente, de un compuesto o composición de la invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie a tratar, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la afección a tratar, el agente particular que se administra y el modo de administración y similares. De esta manera, no es posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, una “cantidad eficaz” apropiada puede determinarla un experto en la materia usando solo experimentación rutinaria.

- 40 La expresión “elemento de transición” como se usa en este documento, incluye dentro de su significado los grupos de elementos que comprenden los metales de transición, los lantánidos y los actínidos.

Abreviaturas

- 45 pAA, ácido *p*-arsanílico, ácido 4-aminobencenoarsónico; AspAO, ácido *N*-(3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-L-aspártico; BAE, endotelial aórtico bovino; BCE, endotelial capilar bovino; BCS, suero de ternera bovino; BSA, albúmina de suero bovino; BRAA, ácido 4-(*N*-(bromoacetil)amino)fenilarsónico; BRAO, 4-(*N*-(bromoacetil)amino)-fenilarsenóxido; BVS, músculo liso vascular bovino; CAM, membrana crioalantoica de polluelo; Cys*AO, ácido *N*-(3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-L-cisteico; DMEM, Medio de Eagle Modificado por Dulbecco; DMP, 2,3-dimercaptopropanol; DMSO, dimetilsulfóxido; DTNB, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico); DTT, ditioneitol; EDTA, ácido etilendiaminatetraacético; FCS, suero de ternera fetal; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos, GSAO-F, 4-(*N*-(*S*-(*N*-(3-(fluorescein-5-carbamoilmetiltio)propanoil)glutacionil)acetil)amino)fenilarsenóxido; FXAO, una mezcla de 4-(*N*-(6-(fluorescein-5-carboxamido)hexanoil)amino)fenilarsenóxido y 4-(*N*-(6-(fluorescein-6-carboxamido)hexanoil)amino)fenilarsenóxido; GlcAO, *N*-(3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-D-glucosamina; GluAO, ácido *N*-(3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-L-glutámico; GSAA, ácido 4-(*N*-(*S*-glutacionilacetil)amino)fenilarsónico; GSAO, 4-(*N*-(*S*-glutacionilacetil)amino)fenilarsenóxido; GSAO-B, 4-(*N*-(*S*-(*N*-(6-(*N*-(6-(*N*-(biotiniloil)amino)hexanoil)amino)hexanoil)glutacionil)acetil)amino)fenilarsenóxido; GSH, glutatión reducido; HDMVEC, célula endotelial microvascular dérmica humana; HEPES, ácido *N*-(2-hidroxiethyl)piperazin-*N'*-(2-etanosulfónico); VIH, virus de inmunodeficiencia humano; HRP, peroxidasa de rábano rústico; HUVEC, célula endotelial de vena umbilical humana; Ig, inmunoglobulina; MPB, 3-(*N*-maleimidilpropionil)biotina; PAO, fenilarsenóxido; pAPAO, 4-aminofenilarsenóxido; PBMC, células mononucleares de sangre periférica; PBS, solución salina tamponada con fosfato; PDI, proteína disulfuro isomerasa; PVDF, fluoruro de polivinildietileno; SCID, inmunodeficiente combinado grave; SDS-PAGE, electroforesis en gel SDS-poliacrilamida; SSB, sulfosuccinimidobiotina; TCR, receptor de células T; TNB, dianión 5-tio-2-nitrobenzoato; VEGF, factor de crecimiento celular endotelial vascular.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Estructura de GSAO y GSAA.

5 Figura 2. Representación esquemática de la inhibición irreversible de una proteína redox activa mediante la unión inicial de un grupo arsenóxido con un ditiol de la proteína, seguido de alquilación del sitio activo de la proteína.

10 Figura 3. Síntesis de GSAO. Representación esquemática de la síntesis de GSAO que muestra la estereoquímica y el esquema de numeración usado en el análisis del espectro de ^1H - ^{13}C RMN HMBC de 2D.

15 Figuras 4. Asignación de la Estructura de GSAO. Una expansión del espectro de ^1H - ^{13}C HMBC de GSAO en $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$, que muestra la región alifática. El espectro muestra cualquier acoplamiento heteronuclear de alto rango (^1H - ^{13}C) como picos cruzados, en línea con las señales ^1H - ^{13}C correspondientes a lo largo de los ejes horizontal y vertical. Los picos cruzados recuadrados corresponden al acoplamiento ^1H - ^{13}C entre los metileno C7 y C11, confirmando que la alquilación por BRAO ha ocurrido en el átomo de azufre del glutatión. Los picos y picos cruzados marcados como "i" se deben a impurezas; un pico cruzado de un enlace correspondiente al metileno C9 y el metino C2 también pueden observarse también como dobletes debido a la filtración incompleta de la secuencia de pulso de HMBC.

20 Figura 5. Representación esquemática de la síntesis de GSAA

Figura 6. Representación esquemática de la síntesis de GSAO-B

25 Figura 7. Representación esquemática de la síntesis de GSAO-F

Figuras 8: Representación esquemática de la síntesis de GSAO-CyTM5.5

30 Figura 9: Síntesis de FXAO.

Figura 10. Ruta sintética general para compuestos de la invención en la que A es una amina hidrófila. Los ejemplos de R-NH₂ incluyen D-glucosamida; ácido L-aspártico; ácido L-glutámico y ácido L-cisteico.

35 Figura 11. Valoración de DMP o cisteína con GSAO. Se incubó DMP (150 M correspondiente a tioles 30 μM) o cisteína (28 μM) con GSAO (0 - 50 μM) durante 10 minutos. Después se añadió DTNB (950 μM) y las reacciones se incubaron durante 10 minutos más. La concentración de tiol en las reacciones se determinó a partir de la absorbancia del dianión TNB a 412 nm. GSAO se unió a DMP y evitó la interacción del ditiol con DTNB mientras que cualquier interacción de GSAO con cisteína se desplazaba por DTNB.

40 Figura 12. Interacción de GSAO con ditiolos peptídicos, sintéticos y proteicos. Se incubó DMP (A) (15 μM), ácido 6,8-tióctico (B) (11 M), ditiotreitolo (C) (8,5 μM), TrpCysGlyProCysLys (D) (4,6 μM), TrpCysGlyHisCysLys (E) (5,5 μM) o tiorredoxina (F) (4,1 μM correspondiente a tioles 20,6 μM) con GSAO (0 -56 μM) durante 10 minutos. Después se añadió DTNB (950 μM) y las reacciones se incubaron durante 10 minutos más. La concentración de tiol en las reacciones se determinó a partir de la absorbancia del dianión TNB a 412 nm. Las líneas continuas representan el mejor ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos de la Ecuación 1 (A a E) o la Ecuación 2 (F) y se han dibujado usando las estimaciones paramétricas en la Tabla 1. La línea de puntos en la parte A representa una valoración simulada suponiendo una afinidad infinita de GSAO por el ditiol. El GSAO unido a ditiolos tanto sintéticos como peptídicos y proteicos con constantes de disociación en el intervalo 130 nM a 1,4 μM .

50 Figura 13. Inhibición de tiorredoxina por GSAO. Se incubó tiorredoxina (1 μM) con GSAO (0,1 o 10 μM) durante 10 minutos a temperatura ambiente en Hepes 20 mM, NaCl 0,14 M, tampón pH 7,4. Se añadió el fragmento de fibronectina de 70 kDa (10 μg por ml) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las reacciones se marcaron con MPB (100 μM) durante 10 minutos a 37 °C. El MPB se inactivó con GSH (200 μM) durante 10 minutos a 37 °C seguido de yodoacetamida (400 μM) durante 10 minutos a temperatura ambiente. El fragmento de 70 kDa marcado con MPB se resolvió en una SDS-PAGE al 5-15%, se transfirió a una membrana de PVDF y el MPB se detectó por transferencia con estreptavidina peroxidasa. Las posiciones de los marcadores Mr se muestran a la izquierda.

60 Figuras 14. Interacción de GSAO-B con PDI y tiorredoxina. A Estructura de GSAO-B. B Se incubó PDI recombinante humano purificado (5 μM), tiorredoxina recombinante humana (5 μM) o albúmina de suero bovino (50 M) con ditiotreitolo (10 μM) durante 60 minutos a temperatura ambiente para asegurar que el disulfuro (o disulfuros) del sitio activo de PDI y la tiorredoxina estaban en forma ditiol reducida. Después se añadieron GSAO-B (100 μM) o GSAO-B y DMP (400 μM) y las reacciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. El PDI marcado (carriles 1 y 2), la tiorredoxina (carriles 3 y 4) y la albúmina (carril 5) (75 pmoles) se

65

resolvieron en SDS-PAGE al 4-16%, se transfirió a una membrana de PVDF, y se realizó transferencia con estreptavidina-peroxidasa para detectar el marcador GSAO-B. Las posiciones de los marcadores M_r se muestran a la izquierda.

5 Figuras 15. Comparación de los efectos citotóxicos de una membrana permeable frente a una membrana sustancialmente impermeable a arsénicos trivalentes. Se sembraron células BAE (5×10^3 células) en pocillos de placas de 96 pocillos y se permitió que se fijaran durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5%. Las células, que tenían una confluencia de aproximadamente el 80%, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con 100 μ l de medio completo que contenía concentraciones en aumento de cualquiera de PAO, GSAO, AspAO, GluAO, Cys*AO, GlcAO o FXAO (0 a 0,6 mM) durante 24 horas a 37 °C y CO₂ al 5%. Las células se lavaron después dos veces con PBS para retirar las células no adherentes y las células adherentes se contaron usando azul de metileno como describen Oliver et al. (1989). Los puntos de datos son la media y el ET (error típico) de pocillos por triplicado.

15 Figura 16. Identificación de proteínas de la superficie de células endoteliales que contienen ditio (o ditioles) próximos entre sí. A Se marcó la superficie de células HMEC-1 o HUVE (2×10^6 células en 0,4 ml) con GSAO-B (100 μ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia (carriles 1 y 3) o presencia de DMP (400 μ M) (carril 2). Se realizó la lisis de las células endoteliales y el lisado de ambas incubaciones se resolvió en SDS-PAGE al 4-15%, se transfirió a una membrana de PVDF y se realizó transferencia con estreptavidina peroxidasa para detectar el marcador GSAO-B. Los resultados representan el marcaje de 3×10^4 células HMEC-1 (carriles 1 y 2) de células HUVE (carril 3). Las posiciones de los marcadores M_r se muestran a la izquierda. B Perfil de densitometría de las proteínas marcadas superficiales (carriles 1 y 3). Se indican los M_r apreciables de las proteínas individuales.

25 Figura 17. PDI era una de las proteínas marcadas con GSAO-B en la superficie de las células endoteliales Se marcaron células HUVEC (5×10^6 células en 0,75 ml) con GSAO-B (100 μ M) durante 30 minutos a 37 °C en ausencia (carril 1) o presencia de DMP (400 μ M) (carril 2). Se realizó la lisis de las células y se incubaron con perlas de estreptavidina-agarosa para recoger las proteínas marcadas con biotina. Las proteínas marcadas se resolvieron en SDS-PAGE al 4-15%, se transfirieron a una membrana de PVDF y se realizó transferencia con anticuerpos monoclonales anti-PDI. Los resultados representan el marcaje de 5×10^6 células endoteliales. Las posiciones de los marcadores M_r se muestran a la izquierda.

35 Figura 18. Inhibición de proliferación y reducción de viabilidad de células BCE por GSAO. Se sembraron 15.000 (parte A y B) o 50.000 (parte C y D) células BCE por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos gelatinizados y se permitió que se fijaran durante 24 horas (parte A, B y D) o 72 horas (parte C). Después, los medios se sustituyeron por DMEM que contenía BCS al 5% y GSAO o GSAA de 0 a 1 mM y 1 ng por ml de FGF-2 (parte A) o 10 ng por ml de VEGF (parte B). En la parte D, los medios se sustituyeron por DMEM que contenía BCS al 5% y cualquiera de GSAO o GSAA 10 μ M. En la parte C, los medios se sustituyeron por DMEM que contenía BCS al 5% y GSAO o GSAA de 0 a 1 mM. Las células se cultivaron durante 72 horas en las partes A, B y C o durante tiempos separados de hasta 48 horas en la parte D y después se dispersaron y se contaron. La línea de puntos en las partes A, B y C indica el número de células en los pocillos de control que contenían DMEM y BCS al 5% que representaba una proliferación no limitada. La línea de puntos en la parte D representa que no hay cambio en el número de células durante 48 horas. Los puntos de datos y errores representan la media y el intervalo de pocillos por duplicado.

45 Figura 19. Efecto de GSAO sobre la proliferación de células no endoteliales. Se sembraron 15.000 células BxPC-3 (parte A), HT1080 (parte B), 3T3 (parte C) o BVSM (parte D) por pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos gelatinizados y se permitió que se fijaran durante 24 horas. Después, los medios se sustituyeron por DMEM que contenía GSAO o GSAA de 0 a 1 mM y cualquiera de BCS al 5% (parte D) o FCS al 5% (partes A, B y C). Las células se cultivaron durante 72 horas y después se dispersaron y contaron. Las líneas de puntos indican el número de células en los pocillos de control que contenían DMEM y BCS al 2% (parte D) o FCS al 2% (partes A, B y C) que representaban una proliferación no limitada. Los puntos de datos y errores representan la media y el intervalo de pocillos por duplicado.

55 Figura 20. Efecto de GSAO en la proliferación de células Progenitoras de médula ósea. Se incubaron células de médula ósea humana en agar semisólido que contenía BCS al 20%, 1 ng por ml de IL-3 y GSAA o GSAO de 0 a 100 μ M durante 12 días. Se contaron colonias de Granulocito/Macrófago de 40 o más células en un microscopio invertido. Los puntos de datos y errores representan la media y el ET (error típico) de los cultivos por cuadruplicado.

60 Figura 21. GSAO Altera la formación de tubos de células endoteliales en Matrigel. Se añadió Matrigel (100 μ l) a pocillos de placas de 96 pocillos y se dejó gelificar durante 60 minutos a 37 °C. Se sembraron células HDMVE (10.000 células por pocillo) en medio completo que contenía GSAA o GSAO 0,1, 1 o 100 μ M en el Matrigel y las placas se incubaron en CO₂ al 5%, 37 °C. Después de 18 horas de incubación, se tomaron micrografías de contraste de fase. GSAO alteró la formación de tubos de células HDMVE en Matrigel (panel inferior). Los

65

efectos fueron evidentes a una concentración de 0,1 μM y notables a 100 μM . A las mismas concentraciones GSAA no tuvo un efecto evidente sobre la formación de tubos (panel superior).

5 Figura 22. Inhibición de angiogénesis CAM por GSAO. Se cascaron huevos de liorna blancos de 3 días de edad fertilizados, los embriones se pusieron en placas de Petri y se incubaron durante 3 días. Discos de metilcelulosa que contenían 5, 10 o 50 μg de cada uno de GSAA o GSAO se aplicaron después al CAM de los embriones individuales y se incubaron durante 48 horas. Los CAM se puntuaron para determinar el efecto no evidente o la inhibición de angiogénesis como se define por zonas avasculares. En el panel izquierdo se muestran las fotografías de los CAM después de la incubación con discos que contenían 10 μg de cualquiera de GSAA (superior) o GSAO (inferior). El círculo de puntos indica la colocación del disco. El gráfico de barras en el panel derecho muestra el número de las 5 zonas positivas para inhibición de angiogénesis a 5, 10 o 50 μg de GSAO por sedimento. GSAA no inhibía angiogénesis CAM hasta 50 μg por sedimento.

15 Figura 23. Inhibición de crecimiento de tumor pancreático humano por GSAO. Se establecieron tumores BcPC-3 en la línea media proximal de ratones SCID hembra de 7 a 9 semanas de edad. Cuando los tumores tenían un volumen de $-0,1 \text{ cm}^3$ los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos y se trataron con cualquiera de GSAA o GSAO a dosis de 2 (parte A) o 10 (parte B) mg por kg por día en 0,2 ml de PBS que contenía glicina 100 mM. Los compuestos se administraron por vía subcutánea en un sitio lejos del tumor. El volumen del tumor y el peso del animal se midieron cada 3 días. La proporción de volumen de tumor GSAO/GSAA en el día 26 del tratamiento con 2 mg por kg por día fue de 0,34 (parte A). La proporción en volumen del tumor GSAO/GSAA en el día 31 del tratamiento con 10 mg por kg por día fue de 0,09 (parte B). Hubo 4 ratones por grupo en la parte A y cuatro ratones tratados con GSAA y 5 con GSAO en la parte B. Los ratones y tumores extirpados del experimento descrito en la parte B en el día 31 del tratamiento se muestran en la parte C. Los puntos de datos y errores representan la media y el ET de los volúmenes tumorales.

25 Figura 24. La administración sistémica de GSAO no tiene efecto sobre el peso de los ratones. Los puntos de datos y errores representan la media y el ET de los pesos de los animales para el experimento descrito en la Figura 23.

30 Figura 25. Inhibición de fibrosarcoma humano y del crecimiento de tumor de pulmón de Lewis murino después de administración sistémica de GSAO. Se establecieron tumores de pulmón HT1080 o de Lewis en la línea media proximal de ratones SCID o C57Bl6/J hembra de 7 a 9 semanas de edad, respectivamente. Cuando los tumores tenían un volumen de $-0,1 \text{ cm}^3$ los ratones se dividieron aleatoriamente en dos grupos ($n=5$) y se trataron con GSAA o GSAO a una dosis de 10 mg por kg por día en 0,2 ml de PBS que contenía glicina 100 mM. Los compuestos se administraron por vía subcutánea en un sitio lejos del tumor. El volumen del tumor y el peso del animal se midieron cada 3 días. La proporción de volumen de tumor GSAO/GSAA HT1080 en el día 17 del tratamiento fue de 0,29 (parte A). La proporción en volumen de tumor de Lewis GSAO/GSAA en el día 12 del tratamiento fue de 0,29 (parte B). Los puntos de datos y los errores representan la media y el ET de los volúmenes tumorales.

40 Figura 26. Inhibición de angiogénesis en tumores pancreáticos humanos por GSAO. Las secciones histológicas de los tumores BxPC-3 mostrados en la parte C de la Figura 23 a partir de ratones tratados con GSAA y GSAO se analizaron para angiogénesis (CD-31), proliferación (PCNA) y apoptosis (TUNEL). Hubo una notable supresión de la angiogénesis (parte A, $p < 0,001$) y un aumento en el índice apoptótico de células tumorales (parte C, $p = 0,05$) en los tumores tratados con GSAO. Por otro lado, no hubo una diferencia significativa en los índices proliferativos (parte B) de células tumorales tratadas con GSAA frente a GSAO.

50 Figura 27. Inhibición de crecimiento de tumor de carcinoma pancreático humano por administración intraperitoneal continua de GSAO. Se establecieron tumores BcPC-3 en la línea media proximal de ratones SCID hembra de 7 a 9 semanas de edad. Los ratones que portaban tumores de $\sim 0,1 \text{ g}$ se implantaron con bombas microosmóticas modelo alzet 1002 (ALZA Corporation, Palo Alto, CA) 14 días en la cavidad peritoneal. Las bombas contenían 45 mg por ml de GSAA o GSAO y administraban 10 mg por kg al día. Las bombas se reemplazaron después de 14 días. La duración del bombeo se indica en la barra sombreada. El volumen tumoral y el peso del animal se midieron cada 3 días.

60 Figura 28. Inhibición de carcinoma pancreático humano y crecimiento de tumor de pulmón de Lewis murino por administración oral de GSAO. Se establecieron tumores de pulmón BxPC-3 o de Lewis en la línea media proximal de ratones SCID o C57Bl6/J hembra respectivamente, de 7 a 9 semanas de edad. Los ratones SCID que portaban tumores de 0,5 g de BxPC-3 o ratones C57Bl6/J que portaban tumores de pulmón de Lewis de 0,1 g se dividieron aleatoriamente en dos grupos ($n = 2$ para BxPC-3 y $n = 3$ para pulmón de Lewis) y se trataron con cualquiera de GSAA o GSAO (0,05 mg por ml) en su agua. Los ratones bebieron 5 ml de agua por día y por lo tanto consumieron 10 mg de GSAO o GSAA por kg al día. El agua contenía glicina 100 mM para minimizar la oxidación de GSAO. El volumen tumoral y el peso del animal se midieron cada 3 días. Los puntos de datos y errores representan la media y el ET de los volúmenes tumorales.

65

Figura 29. Captación selectiva de GSAO-Cy5.5 por tumores sólidos. A Estructura de GSAO-Cy5.5 B Se inyectó GSAO-Cy5.5 (15 nmoles) por vía subcutánea en el costado de ratones C57Bl6/J portadores de un tumor pulmonar de Lewis subcutáneo de $\sim 1000 \text{ mm}^3$ en la línea media proximal. Se crearon imágenes del dorso de los ratones 24 horas después. El área de la imagen era de $\sim 0,7 \text{ cm}^2$ de la línea media proximal del dorso y abarcaba el dorso normal y el borde inferior del tumor subcutáneo. Había una ligera concentración de GSAA-Cy5.5 en el tumor pero era insignificante en comparación con la acumulación de GSAO-Cy5.5 (no mostrado).

Figura 30. Marcaje de la superficie celular CD4 con MPB. A Se marcaron células CEM-T4 se marcaron con cualquiera de SSB o MPB. Las proteínas marcadas con biotina se recogieron en perlas de estreptavidina-agarosa, se resolvieron en SDS-PAGE al 10% y se sometieron a transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal CD4, Leu3a. El carril 1 es el lisado de CEM-T4 (de 1×10^6 células), el carril 2 es CEM-T4 CD4 marcado con SSB, mientras que el carril 3 es CEM-T4 CD4 marcado con MPB. Las proteínas marcadas con biotina eran de 2×10^6 células. El carril 4 es un experimento de control en el que MPB estaba prebloqueado con GSH antes de la incubación con células CEM-T4 (de 2×10^6 células). Las posiciones de los marcadores M_r en kDa se muestran a la izquierda. B Se marcaron células CEM-T4 con MPB y se inmunoprecipitaron las CD4 con anticuerpo monoclonal de Leu3a e IgG de cabra anti-ratón revestido con Dynaperlas. El CD4 se resolvió en SDS-PAGE al 10% y se realizó la transferencia con estreptavidina peroxidasa para detectar el marcador de biotina. El carril 5 es CD4 marcado con MPB (de 2×10^6 células). El carril 6 es un experimento de control en el que MPB está prebloqueado con GSH antes de la incubación con células CEM-T4 (2×10^6 células). Las posiciones de los marcadores M_r en kDa se muestran a la izquierda.

Figura 31. Reducción de la superficie celular CD4 con tiorredoxina. A Se incubaron células CEM-T4 sin o con concentraciones en aumento de tiorredoxina durante 1 hora a 37°C y después se marcaron con MPB. Las proteínas marcadas con biotina se resolvieron en SDS-PAGE al 5-15% y se sometieron a transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal Leu3a. El carril 1 es el lisado de CEM-T4 y los carriles 2-5 son CD4 marcado con MPB en células CEM-T4 incubadas con Trx $0 \mu\text{M}$ (carril 2), $0,1 \mu\text{M}$ (carril 3), $1 \mu\text{M}$ (carril 4) o $5 \mu\text{M}$ (carril 5). Las posiciones de los marcadores M_r en kDa se muestran a la izquierda. B Se incubaron células CEM-T4 con cualquiera de tiorredoxina $1 \mu\text{M}$ o un mutante inactivo rédox de tiorredoxina durante 1 hora a 37°C . Las proteínas marcadas con biotina se resolvieron en SDS-PAGE al 5-15% y se sometieron a transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal Leu3a. El carril 1 son células CEM-T4 sin tratar, mientras que los carriles 2 y 3 son células incubadas con cualquiera de tiorredoxina activa o inactiva frente a rédox. Las posiciones de los marcadores M_r en kDa se muestran a la izquierda.

Figuras 32. Marcaje de la superficie celular CD4 con GSAO-B. Se marcaron CEM-T4 con cualquiera de MPB o GSAO-B. Las proteínas marcadas con biotina se recogieron en perlas de estreptavidina-agarosa, se resolvieron en SDS-PAGE al 5-15% y se sometieron a transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal Leu3a. El carril 1 es CEM-T4 CD4 marcado con MPB y el carril 2 es CEM-T4 CD4 marcado con GSAO-B. El carril 3 es un experimento de control en el que GSAO-B se incubó con células CEM-T4 en presencia de DMP $400 \mu\text{M}$. Las proteínas marcadas con biotina eran desde 2×10^6 células. Las posiciones de los marcadores M_r en kDa se muestran a la izquierda.

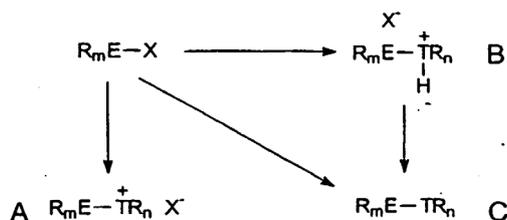
Figura 33. Inhibición de la entrada de VIH_{III} en células A3.01 por MPB y GSAO. A se incubaron células A3.01 (1×10^6 por ml) con GSAA, GSAO o MPB ($100 \mu\text{M}$) durante 30 minutos a 37°C y después con VIH_{III} (50 TCID₅₀ por 10^6 células) durante 2 horas a 37°C . Las células se lavaron y se incubaron en medio completo en CO₂ al 5% y a 37°C durante hasta 10 días. En los tiempos indicados el medio acondicionado se recogió y ensayó para el antígeno p24 y se determinó el número y viabilidad de las células. B Dependencia de la concentración de GSAO. Se incubaron células A3.01 (1×10^6 por ml) con GSAO (0-100 μM) durante 30 minutos a 37°C y después con VIH_{III} (50 TCID₅₀ por 10^6 células) durante 2 horas a 37°C . Las células se lavaron, se incubaron en medio completo con CO₂ al 5% y a 37°C durante 3 días y el medio acondicionado se recogió y se ensayó para el antígeno p24.

Figura 34. Inhibición de la infección por VIH_{III} de células A3.01 por GSAO. Se incubaron células A3.01 (1×10^6 por ml) con GSAA o GSAO ($10 \mu\text{M}$) durante 30 minutos a 37°C y después con VIH_{III} (50 TCID₅₀ por 10^6 células) durante 2 horas a 37°C . Las células se lavaron y se incubaron en medio completo que contenía GSAA o GSAO ($10 \mu\text{M}$) en CO₂ al 5% y 37°C durante hasta 10 días. En los momentos indicados el medio acondicionado se recogió y se ensayó para el antígeno p24 y se determinó el número y la viabilidad de las células.

Figura 35. Inhibición de la infección por VIH de PBMC por GSAO. Se incubaron células PBMC (1×10^6 por ml) con GSAA o GSAO ($10 \mu\text{M}$) durante 30 minutos a 37°C y después con aislados de VIH primarios (HN11, HN68 o HN70 a 50 TCID₅₀ por 10^6 células) durante 2 horas a 37°C . Las células se lavaron y se incubaron en medio completo que contenía GSAA o GSAO ($10 \mu\text{M}$) en CO₂ al 5% y a 37°C durante hasta 7 días. En los momentos indicados el medio acondicionado se recogió y se ensayó para el antígeno p24 y se determinó el número y la viabilidad de las células.

Mejor modo para realizar la invención**1. Derivados organoarsénicos trivalentes**

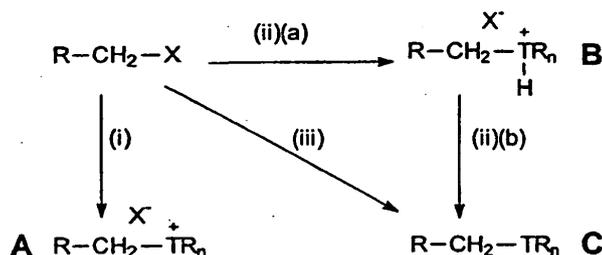
- 5 La presente invención proporciona compuestos en los que un resto arsenóxico está unido a un grupo colgante específico, sustancialmente impermeable a la membrana celular, como se ha definido anteriormente, siendo el grupo colgante sustancialmente impermeable a la membrana celular gracias a que está cargado al pH fisiológico, o que es de naturaleza hidrófila.
- 10 El compuesto de la presente invención es un compuesto reactivo con ditiol, porque contiene un arsénico trivalente como se ha indicado anteriormente. Las proteínas rédox activas a menudo están caracterizadas por uno o más pares de ditiolos próximos que experimentan ciclos de oxidación y reducción. Los arsénicos trivalentes tienen alta afinidad por ditiolos próximos, formando derivados ditioarsina (Adams et al., 1990). Los monotioles reaccionan muy pobremente con los arsénicos trivalentes porque se requieren dos monotioles para formar el derivado de ditioarsina.
- 15 El proceso está desfavorecido entrópicamente y la unión del segundo monotiol normalmente está restringida estéricamente. Como un ejemplo específico de un grupo A sustancialmente impermeable a la membrana celular como se ha definido anteriormente, el glutatión es un tripéptido que es secretado de forma constitutiva por células de mamífero, pero que no es captado por estas células. En una realización preferida, la presente invención capitaliza esta característica del glutatión de ser sustancialmente impermeable a la membrana celular para usar el glutatión como un soporte básicamente inerte de un grupo arsenóxico que tiene la capacidad de unirse a ditiolos próximos de proteínas rédox activas. De esta manera, el glutatión se usa en la presente invención para suministrar el grupo arsenóxico a la superficie de las células de mamífero, aunque inhibe sustancialmente la entrada pasiva de dicho resto a las células.
- 25 Los compuestos de fórmulas generales (I-VI) pueden prepararse por métodos conocidos de forma general en la técnica. Los métodos adecuados para la síntesis de los compuestos de fórmulas (I-VI) e intermedios de los mismos se describen, por ejemplo, en Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie; J. March, Advanced Organic Chemistry, 4ª Edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1992); D. C. Liotta y M. Volmer, eds, Organic Syntheses Reaction Guide (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1991); R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations (VCH, Nueva York, 1989), H. O. House, Modern Synthetic Reactions 2ª Edición (W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, 1972); N. S. Simpkins, ed., 100 Modern Reagents (The Royal Society of Chemistry, Londres, 1989); A. H. Hains Methods for the Oxidation of Organic Compounds (Academic Press, Londres, 1988) y B. J. Wakefield Organolithium Methods (Academic Press, Londres, 1988).
- 30 Los ejemplos de esquemas de reacción para ilustrar la formación genérica de enlaces de los compuestos de la presente invención se muestran en los siguientes esquemas.
- 35 Los ejemplos de esquemas de reacción para ilustrar la formación genérica de enlaces de los compuestos de la presente invención se muestran en los siguientes esquemas.



- 40 en la que E representa un sitio electrófilo; y m, n son números enteros mayores de o iguales a 0.

El esquema a continuación muestra una molécula de partida RCH_2X , en la que R representa el resto de la molécula al que está fijado el grupo $-CH_2X$. X representa un grupo saliente, por ejemplo, un halógeno o RSO_3^- , que está desplazado por el nucleófilo TR_n . Los nucleófilos atacan en los sitios electrófilos, dando como resultado la formación de un nuevo enlace covalente entre las especies nucleófilas y electrófilas. En el esquema a continuación, el átomo de carbono de metileno es el sitio electrófilo y la reacción global puede describirse como una sustitución nucleófila.

45

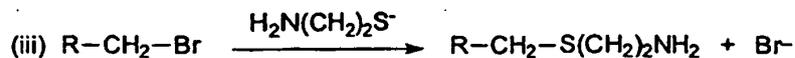
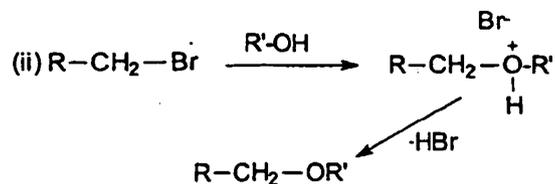


Hay tres variaciones sencillas del esquema anterior, como se ilustra por las reacciones (i) a (iii): en esta reacción, el nucleófilo que ataca está representado por la molécula descargada TR_n^- , que desplaza el grupo saliente X, dando el producto A que tiene una carga positiva localizada formalmente en T.

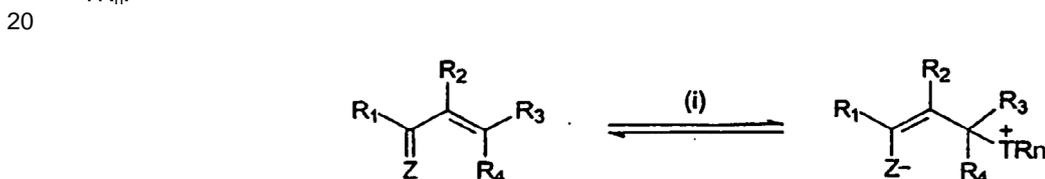
5 La primera etapa (a) de esta reacción implica el ataque del nucleófilo HTR_n^- , que desplaza el grupo saliente X, dando el producto iónico B inicialmente, seguido de pérdida de H^+ en la etapa (b) para dar un producto sin carga C.

10 En esta reacción, el producto C está formado directamente mediante el uso de TR_n^- como el nucleófilo.

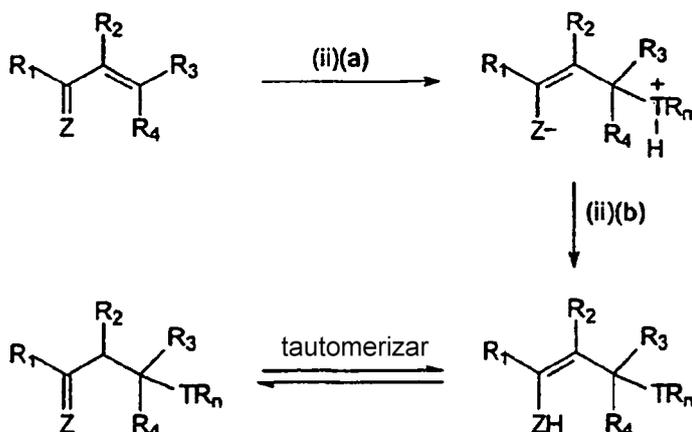
En las tres reacciones (i) a (iii), X se pierde como X^- y el átomo T debe tener un solo par de electrones. A continuación se muestran ejemplos generales de cada una de las reacciones (i) a (iii). Obsérvese que la reacción (iii) es análoga a la formación de GSAO a partir de BRAO y GSH.



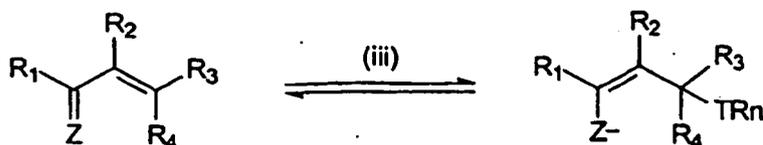
15 Como alternativa, la reacción puede ser entre un nucleófilo y, por ejemplo, una cetona α,β insaturada (cuando $Z=O$) (o aldehído cuando $Z=O$ y $R_1 = H$) como se ilustra en los siguientes esquemas. Por ejemplo, cuando el nucleófilo es TR_n^- :



donde el nucleófilo es HTR_n^-



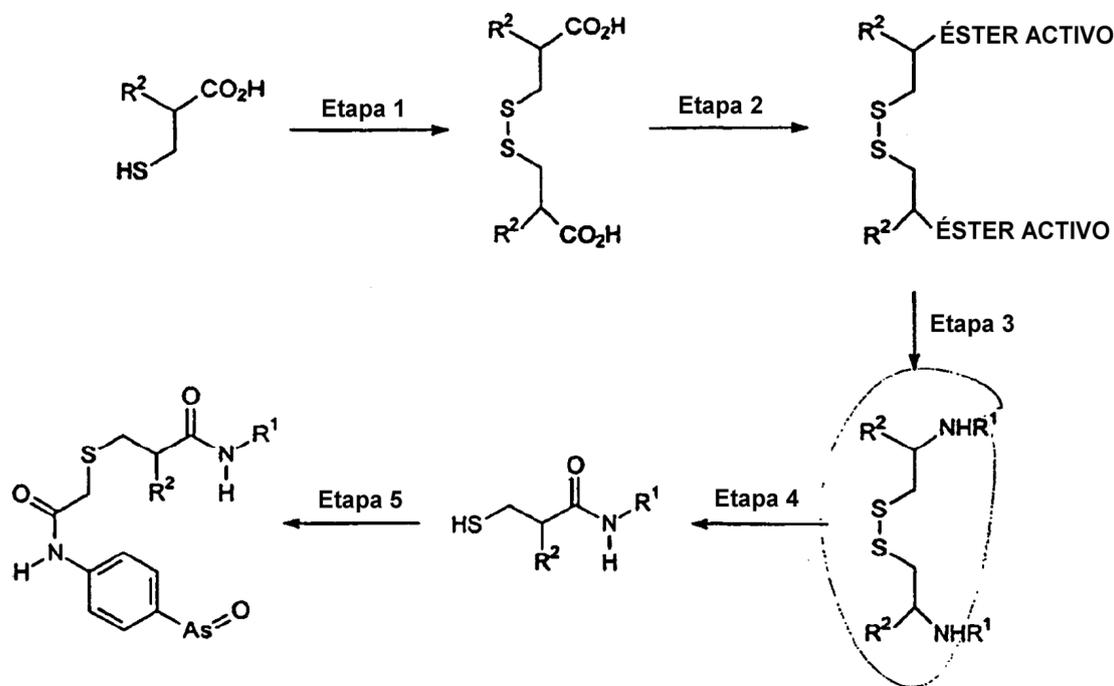
donde el nucleófilo es TR_n^-



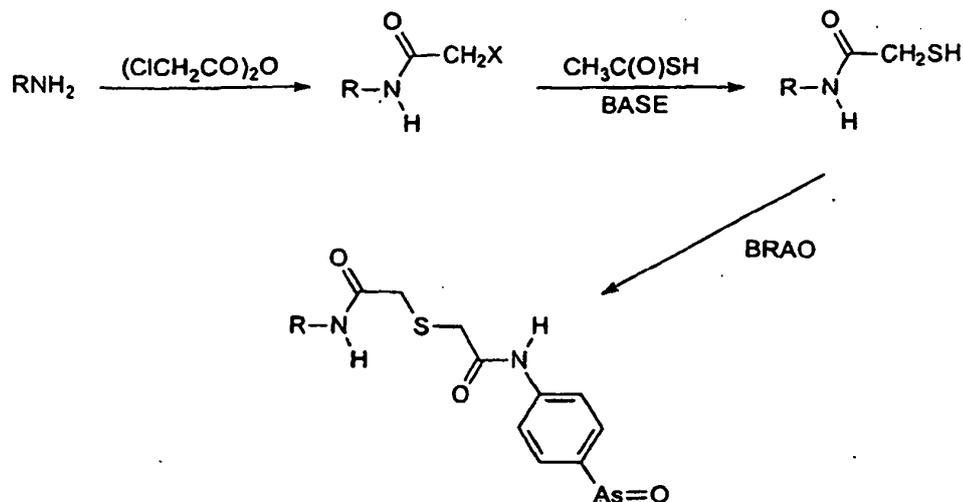
5

en la que Z se selecciona entre el grupo que consiste en O, S, NR o $+N(R)(R')$.

10 Un ejemplo típico de una ruta sintética general para preparar compuestos de amina hidrófilos de la invención está representado en el siguiente esquema, en el que el reactivo en la etapa 5 se ha simplificado como BRAO:



15 Aún más típicamente, los compuestos de amina hidrófilos de la invención pueden prepararse de acuerdo con el esquema general indicado a continuación, que se ha ejemplificado usando BRAO en la etapa final y en el X es un halógeno u otro grupo saliente adecuado.

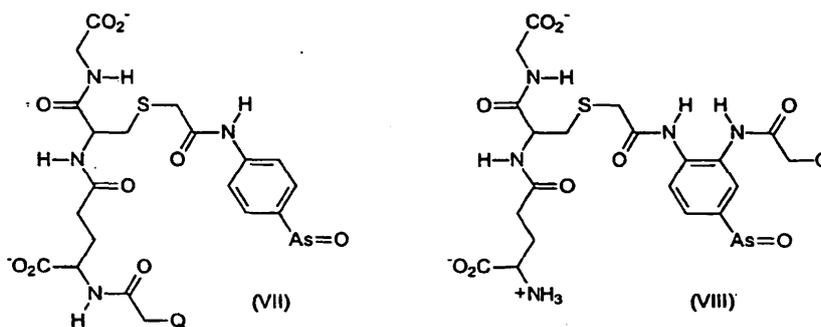


Con respecto a los esquemas anteriores, un experto en la materia reconocerá que los diversos reactivos y reactantes pueden modificarse de forma rutinaria para sintetizar cualquier compuesto dado de la invención. Los compuestos de la presente invención pueden liofilizarse para almacenamiento, y reconstitución antes de su uso.

En una síntesis típica de un compuesto preferido de la invención, el glutatión puede hacerse reaccionar con BRAO en condiciones favorables para la formación de un enlace covalente entre el tiol libre del glutatión y la entidad química a la que está fijado el arsenóxido. Las reacciones que implican ataque nucleófilo por el tiol del glutatión en general, requerirán condiciones alcalinas. Puede realizarse el ataque electrófilo de algunas especies reactivas del átomo de azufre del glutatión; en general esto requerirá probablemente condiciones ácidas. La estructura de GSAO y el compuesto de ácido arsénico correspondiente GSAA se muestran en la Figura 1.

Típicamente, los compuestos de la invención son inhibidores de proteínas redox activas gracias a su capacidad de unirse a ditiolos. Las proteínas redox activas pueden contener dos tioles próximos que pueden formar, de forma reversible, un enlace disulfuro. El modo propuesto mediante el cual los compuestos de la invención inhiben estas proteínas es mediante la unión de arsenóxido a la forma (ditiol) reducida de la proteína. Dicha unión puede ser básicamente irreversible o básicamente reversible en condiciones fisiológicas. Si la unión es básicamente irreversible en condiciones fisiológicas, la proteína se inhibe permanentemente del ciclo redox entre los estados ditiol y disulfuro (es decir, está inactivada o inhibida irreversiblemente).

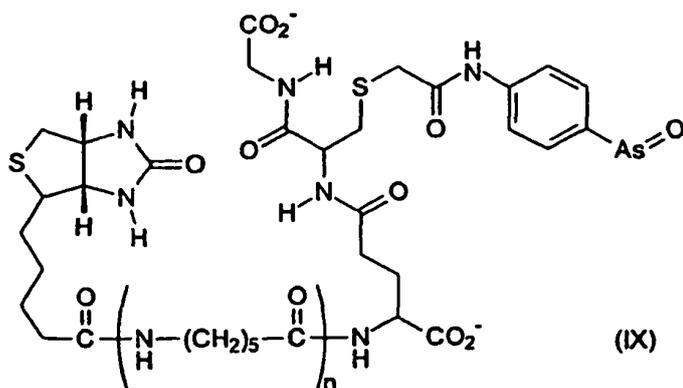
Como alternativa, si la unión del arsenóxido al ditiol de la proteína es básicamente reversible en condiciones fisiológicas, la inhibición no será permanente. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención pueden incluir tener un sustituyente que pueda actuar como un agente de alquilación, fijado al enlazador $(\text{XBX}')_n\text{B}'$ o el grupo sustancialmente impermeable a la membrana celular A. El grupo de alquilación puede llevarse a las proximidades de uno de los ditiolos de sitio activo de la proteína mediante la reacción del grupo arsénico con el ditiol de la proteína. El grupo de alquilación puede reaccionar después con el intermedio ditiarsina-proteína, inhibiendo de esta manera permanentemente la proteína y evitando el ciclo redox. Un ejemplo de este modo de inhibición reversible resultante de la alquilación está representado en la Figura 2. Los compuestos que tienen un agente de alquilación fijado al enlazador $(\text{XBX}')_n\text{B}'$ o un grupo A sustancialmente impermeable a la membrana celular, se ejemplifican mediante las fórmulas estructurales (VII) y (VIII) a continuación, en las que el grupo colgante A es glutatión:



en las que Q es un grupo saliente.

Las modificaciones adecuadas resultarán evidentes para los expertos en la materia. Una persona experta en esta materia reconocerá que la invención proporcionará también los compuestos de la invención en cualquier estado de ionización, por ejemplo, sal de ácido, zwitterión no cargado, anión zwitteriónico, dianión.

- 5 La presente invención proporciona también compuestos adicionales de la invención que se modifican mediante el nitrógeno del glutamyl α -amino del glutatión con un grupo detectable, tal como biotina, un fluoróforo o un grupo que comprende un elemento de transición. Por ejemplo, la invención proporciona GSAO-B, un derivado unido a biotina de GSAO, de acuerdo con la siguiente fórmula (IX):



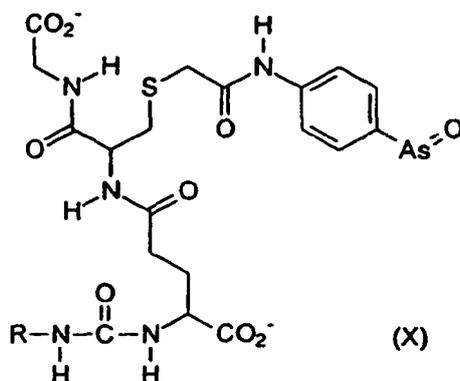
10

en la que $n = 1$ o 2 .

Se proporciona un método de síntesis de GSAO-B en el Ejemplo 1(c), como se ilustra en la Figura 6.

15

Un compuesto preferido alternativo de la invención, en el que un grupo de modificación deseado puede estar fijado a través del nitrógeno del glutamyl α -amino del glutatión, se representa en la siguiente fórmula (X):



20

en la que R es cualquier grupo de modificación deseado.

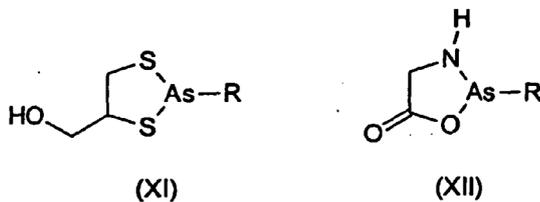
Típicamente, R puede seleccionarse entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi, alquilo y arilo.

25

1.1 Estabilidad de los arsenicos trivalentes frente a oxidación

Los arsenóxidos ($R\text{-As=O}$) han demostrado no poseer un doble enlace arsénico-oxígeno como se escribe normalmente, sino que es probable que existan como polímeros cíclicos (que contienen uniones As-O-As) o, más probablemente, como el hidrato $R\text{-As(OH)}_2$, un ácido organoarsenoso, en solución acuosa (Doak and Freedman, 1970; Knoch et al, 1995). Las soluciones de organoarsénicos, tales como GSAO y BRAO se desactivan con el tiempo por oxidación. Esta oxidación puede ralentizarse de tres maneras; retirada del O_2 disuelto de las soluciones que contienen los arsenóxidos, bajada del pH de estas soluciones o por adición de glicina a las soluciones. La glicina se usa rutinariamente para evitar la oxidación de las soluciones madre de los organoarsénicos trivalentes. Similar a la reacción entre 2,3-dimercaptopropanol un $R\text{-As(OH)}_2$ en el que se forma el ditioarsenito de 5 miembros (XI), se cree que la reacción de glicina con $R\text{As(OH)}_2$ da una 1,3,2-oxazarsolidin-5-ona (XII) cíclica de 5 miembros.

35



2. Tratamiento y/o prevención de enfermedad

5 Los compuestos de la invención, o la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención, son útiles en el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades de vertebrados.

10 Típicamente, el vertebrado se selecciona entre el grupo que consiste en seres humanos, primates no humanos, ratones, bovinos, ovinos, equinos, caprinos, leporinos, aves, felinos y caninos. Más típicamente, el vertebrado es un ser humano, un primate no humano un ratón. Aún más típicamente, el vertebrado es un ser humano.

15 De esta manera, los compuestos de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos que pueden agruparse en amplias categorías tales como las siguientes: enfermedades dependientes de angiogénesis, enfermedades proliferativas celulares, trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, enfermedades de los vasos sanguíneos, trombosis, infección vírica y cáncer.

2.1 Tratamiento y/o prevención de trastornos dependientes de angiogénesis

20 Típicamente, los compuestos de la invención pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades dependientes de angiogénesis tales como cáncer, hemangioma, malformaciones arteriovenosas, artritis, síndrome de Osler-Weber, placas ateroscleróticas complicadas, psoriasis, neovascularización de injerto corneano, granuloma pirógeno, retraso de curación de heridas, fibroplasia retrolental, retinopatía diabética, escleroderma, granulaciones, angiofibroma, glaucoma neovascular, tracoma, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas o úlceras gástricas.

25 Típicamente, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en tumores carcinógenos, tumores de origen epitelial, tales como cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón, tumores de cabeza y cuello, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer de cerebro, cáncer de vejiga, cáncer de próstata y cáncer del tracto urinario/genital; tumores mesenquimales, tales como sarcoma; y tumores hemopoyéticos tales como linfoma de células B.

Típicamente, el cáncer es un tumor hematológico. Más típicamente, el cáncer es un tumor sólido.

35 Como introducción, los vasos sanguíneos se desarrollan mediante dos procesos, vasculogénesis y angiogénesis (Risau, 1997). La vasculogénesis se produce durante la embriogénesis y el proceso mediante el cual las células endoteliales surgen a partir de tipos celulares progenitores. La aparición de nuevos capilares a partir de vasos existentes se denomina angiogénesis, y se produce durante la embriogénesis y en el adulto.

40 La angiogénesis también es un componente crítico de metástasis tumoral. Los vasos sanguíneos tumorales son inmaduros y altamente permeables con escasa membrana basal y menos uniones intercelulares complejas en comparación con vasos maduros normales. Estos nuevos vasos sanguíneos proporcionan una ruta de partida eficaz para que las células tumorales salgan del sitio primario y entren en el torrente circulatorio. El número de metástasis formadas es generalmente proporcional al número de células tumorales liberadas. Por lo tanto, una disminución en la angiogénesis en un tumor debería disminuir el número de células tumorales liberadas en la circulación y el número de metástasis que surge aguas abajo.

45 El proceso de angiogénesis tumoral es complejo. En respuesta a un estímulo apropiado, la membrana basal que rodea un tubo de células endoteliales está localmente degradada, lo que desencadena que las células endoteliales subyacentes a esta matriz dañada cambien de forma e invadan el estroma tumoral circundante. Las células endoteliales invasoras proliferan y se desarrollan en una columna de migración. Las células de la pared de la columna detienen la proliferación, cambian de forma y se adhieren entre sí para formar el lumen del nuevo capilar. Finalmente, los nuevos capilares se fusionan y forman bucles, dando como resultado un sistema circulatorio que facilita el intercambio de nutrientes y productos residuales en la región.

55 La inducción de angiogénesis tumoral está mediada por diversas moléculas angiogénicas liberadas tanto por células tumorales como por células hospedadoras (Hanahan and Folkman, 1996). Se sabe que diversas proteínas estimulan el crecimiento y el movimiento de las células endoteliales, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico, angiogenina, estrógeno, los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento endotelial

vascular (VEGF). Los factores anti-angiogénicos incluyen interferón, trombospondina, factor de plaqueta 4, inhibidores de tejido de metaloproteína 1 y 2, interleucina 12, angiostatina y endostatina.

En la superficie celular endotelial existen diez proteínas distintas con masas moleculares de entre 12 y 138 kDa que se unen a GSAO y esto se ilustra en el Ejemplo 3(a) y en la Figura 16. Este hallazgo sugiere que la superficie celular endotelial soporta acontecimientos redox en ciertas proteínas. La alteración de estos acontecimientos tiene consecuencias para la biología de la célula endotelial, efectos tales como sobre la proliferación de las células endoteliales, como se ha indicado en general en el Ejemplo 3. Más específicamente, los Ejemplos 3(c) y 3(d) y las Figuras 18-21 indican que GSAO era un inhibidor selectivo de la proliferación y formación de tubos de células endoteliales en un cultivo. GSAO inhibió también la formación de nuevos vasos sanguíneos en la membrana corioalantoidea de polluelo (Ejemplo 3(o) y Figura 22) y era un potente inhibidor de angiogénesis tumoral y crecimiento tumoral en ratones, como se indica en los Ejemplos 3(f) a 3(i) y en las Figuras 23-28.

2.2 Tratamiento y/o prevención de infección vírica

Los compuestos de la invención pueden encontrar uso también en el tratamiento o prevención de infecciones retrovíricas humanas (familia retroviridae) incluyendo, por ejemplo, infección oncovírica, tal como HTLV-I; infección lentivírica incluyendo VIH-1 y VIH-2; o para el tratamiento o prevención de infección por el virus Sindbis.

CD4 es una glucoproteína integral de membrana y un miembro de la superfamilia de receptores de inmunoglobulina (Ig) que median las interacciones célula-célula en el sistema inmune. CD4 se expresa en la mayoría de los timocitos y en el subconjunto de linfocitos T periféricos que incluyen células T auxiliares (Fleury et al., 1991). Se requiere CD4 para conformar el repertorio de células T durante el desarrollo tímico y permitir la activación apropiada de células T maduras y células B. El receptor de células T (TCR) de células CD4+T reconoce antígenos presentados por moléculas del MHC de clase II. CD4 se une al MHC de clase II para potenciar la respuesta de células T, como una molécula de adhesión (co-ligando) o como un complejo ternario con el TCR como una parte del proceso de reconocimiento de antígenos (co-receptor).

Otro ligando para CD4 es VIH-1. VIH-1 entra en las células CD4+ por fusión de la membrana lipídica de la partícula de virus con la membrana celular para permitir que el núcleo del virión acceda al citoplasma. La fusión de VIH-1 se desencadena mediante la interacción de la glucoproteína de cubierta de VIH-1, gp120, con CD4. Los co-receptores de quimiocina son también necesarios para la entrada de VIH-1 (Littman, 1998). VIH-1 compromete el sistema inmune confiriendo la respuesta de las células T auxiliares a CD4+.

La prueba de que CD4 contiene uno o más tioles redox activos la proporcionaron Nakashima et al. (1994). Estos observaron que $HgCl_2$, un compuesto que puede catalizar la formación de enlaces disulfuro entre tioles libres, agregaba CD4 sobre la superficie de las células T. Este resultado sugirió que $HgCl_2$ entrecruzaba CD4 a través del tiol (tioles) libre en CD4.

Como se indica en el Ejemplo 4 (en particular en el Ejemplo 4(d)), y en las Figuras 30-35, GSAO se une a la superficie celular de CD4 y actúa como un inhibidor eficaz de la infección de células CD4+ por VIH.

2.3 Tratamiento y/o prevención de otros trastornos

Los compuestos de la invención, o formulaciones farmacéuticas de los mismos, pueden usarse también en la prevención y/o tratamiento de trastornos inflamatorios y/o enfermedades autoinmunes, ejemplos de los cuales incluyen los siguientes: artritis reumatoide, artritis seronegativa y otras artritis inflamatorias, lupus eritematoso sistémico, poliartritis y síndromes relacionados, esclerosis sistémica, síndrome de Sjögren y otras enfermedades inflamatorias oculares, enfermedad mixta del tejido conectivo, polimiositis y dermatomiositis, polimialgia reumática y arteritis de células gigantes, enfermedad articular inflamatoria, artropatías no inflamatorias y reumatismo de tejidos blandos, algodistrofia.

Los ejemplos de enfermedad vascular y trombosis para los que puede usarse el compuesto de la invención de una manera preventiva o en el tratamiento de, incluyen los siguientes: progresión de aterosclerosis, accidentes cerebrovasculares tales como isquemia transitoria, ictus completo y después de cirugía de carótida; infarto de miocardio agudo (primario y secundario); angina; oclusión de injerto de derivación de la arteria coronaria; oclusión después de angioplastia coronaria transluminal percutánea; oclusión después de endoprótesis vascular coronaria; oclusión vascular en enfermedad arterial periférica; enfermedad tromboembólica venosa después de cirugía o durante el embarazo o durante inmovilización.

Los ejemplos de enfermedades de vasos pequeños para los que puede usarse el compuesto de la invención en prevención o tratamiento incluyen los siguientes: glomerulonefritis; púrpura trombocitopénica trombótica; el síndrome urémico hemolítico; insuficiencia placentaria y preeclampsia.

Los compuestos de la invención también pueden usarse para la prevención o tratamiento de síndromes vasculares y enfermedades mieloproliferativas.

Los compuestos de la invención también pueden encontrar uso en la prevención de formación de trombosis en las siguientes situaciones: derivaciones e injertos vasculares artificiales/protésicos; válvulas cardíacas protésicas; procedimientos de derivación cardiopulmonar; hemoperfusión y hemodiálisis.

2.4 Formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas

Típicamente, para uso médico, las sales de los compuestos de la presente invención serán sales farmacéuticamente aceptables; aunque pueden usarse otras sales en la preparación del compuesto de la invención o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por sal farmacéuticamente aceptable se entienden aquellas sales que, dentro del alcance del juicio médico, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y corresponden a una proporción beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención pueden prepararse mezclando un ácido farmacéuticamente aceptable, tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metanosulfónico, ácido succínico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido benzoico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido oxálico, ácido carbónico, ácido tartárico o ácido cítrico con los compuestos de la invención. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la presente invención, por lo tanto, incluyen sales de adición de ácidos.

Por ejemplo S. M. Berge et al. describen sales farmacéuticamente aceptables en detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66:1-19. Las sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación final de los compuestos de la invención, o por separadas haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácidos representativas incluyen sales acetato, adipato, alginato, ascorbato, asparato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentano propionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptanoato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, ciclato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales de metal alcalino o alcalinotérreo representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes no tóxicos de amonio, amonio cuaternario y amina, incluyendo aunque sin limitación amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares.

Los compuestos de la presente invención pueden usarse en forma de profármacos. Típicamente, los profármacos serán derivados funcionales de los compuestos de la presente invención que se convierten fácilmente *in vivo* en los compuestos requeridos de la presente invención, como se describe en este documento. Los procedimientos típicos para la selección y preparación de profármacos los conocen los expertos en la materia y se describen, por ejemplo, en H. Bundgaard (Ed), Design of Prodrugs, Elsevier, 1985.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones farmacéuticas pueden realizarse con niveles de dosis y patrones que selecciona el médico que lo está tratando. No obstante, la composición farmacéutica de la presente invención debería proporcionar una cantidad del compuesto suficiente para tratar eficazmente al paciente.

Un experto en la materia podría determinar, por experimentación rutinaria, una cantidad eficaz no tóxica de los compuestos de la invención que se requerirían para tratar o prevenir los trastornos y enfermedades a los que es aplicable el compuesto de la invención. En general, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; aproximadamente de 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más típicamente, se espera que un intervalo de dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por 24 horas.

Como alternativa, una dosificación eficaz puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m². Generalmente, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m², preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m², más preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m², aún más preferentemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m², aún más preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m² y

aún más preferentemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 mg/m².

En relación con GSAO, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 100 mg de GSAO por kg de peso corporal por 24 horas, preferentemente de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 100 mg de GSAO por kg de peso corporal por 24 horas, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 50 mg de GSAO por kg de peso corporal por 24 horas, aún más preferentemente de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg de GSAO por kg de peso corporal por 24 horas, todavía más preferentemente aún de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 10 mg de GSAO por kg de peso corporal por 24. Típicamente, el tratamiento sería para la duración de la afección.

Adicionalmente, será evidente para un experto en la materia que la cantidad óptima y el espaciado de las dosificaciones individuales de un compuesto de la presente invención estará determinado por la naturaleza y extensión de la afección a tratar, la forma, ruta y sitio de administración y la naturaleza del vertebrado particular que se está tratando. También, dichas condiciones óptimas pueden determinarse por técnicas convencionales.

Resultará evidente también para el experto en la materia que el transcurso óptimo de tratamiento, tal como el número de dosis del compuesto de la presente invención dado por día para un número de días definido, puede evaluarse por los expertos en la materia usando el transcurso convencional de ensayos de determinación del tratamiento.

Cuando se usan en el tratamiento de enfermedades, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en solitario. Sin embargo, generalmente es preferible que el compuesto se administre como una formulación farmacéutica. En general, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden prepararse de acuerdo con métodos que conocen los expertos en la materia y, por consiguiente, pueden incluir un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos, diluyentes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación, y no perjudiciales para el receptor de la misma.

Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéutica y veterinariamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina, aceites de base vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceites de sésamo tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de cacahuete o aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tales como metilpolisiloxano, fenilpolisiloxano y metilfenilpolisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales, tales como parafina líquida, parafina blanda o escualeno; derivados de celulosa, tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; alcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácido graso, tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirridona; agar, carragenina; goma de tragacanto o goma arábiga; y vaselina líquida. Típicamente, el vehículo o vehículos pueden ser del 10% al 99,9% en peso de las composiciones.

En una forma preferida, la composición farmacéutica de la invención comprende una cantidad típica de un compuesto de la invención, tal como GSAO, junto con un vehículo, diluyente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable como se muestra en el Ejemplo 5.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse por rutas convencionales. En general, las composiciones pueden administrarse por vía tópica, transdérmica, intraperitoneal, intracraneal, intracerebroventricular, intracerebral, intravaginal, intrauterina, oral, rectal o parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular). Aún generalmente, las composiciones de la invención pueden estar en forma de una cápsula adecuada para ingestión oral en forma de una pomada, crema o loción, adecuada para administración tópica, en una forma adecuada para suministro como una gota para los ojos, en una forma de aerosol adecuada para administración por inhalación, tal como inhalación intranasal o inhalación oral.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también en forma de liposomas. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas y están formados por cristales líquidos hidratados, mono- o multilaminares, que están dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las formulaciones de la presente invención en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticas. Los métodos para formar liposomas se conocen en la técnica, y en relación con esto se hace referencia específica a: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), p. 33 et seq., cuyos contenidos se incorporan en este documento por referencia.

Para administración como una solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos pueden incluir solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con

fosfato, etanol y 1,2-propilenglicol.

5 Algunos ejemplos de vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes adecuados para uso oral incluyen aceite de cacahuete, parafina líquida, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, alginato sódico, goma arábiga, goma de tragacanto, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, gelatina y lecitina. Además, estas formulaciones orales pueden contener agentes aromatizantes y colorantes adecuados. Cuando se usan en forma de cápsula, las cápsulas pueden estar recubiertas con compuestos tales como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, que retrasan la disgregación de la cápsula.

10 Los adyuvantes típicamente incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes tamponantes.

15 Las formas sólidas para administración oral pueden contener aglutinantes aceptables en la práctica farmacéutica humana y veterinaria, edulcorantes, agentes disgregantes, diluyentes, aromatizantes, agentes de recubrimiento, conservantes, lubricantes y/o de retraso temporal. Los aglutinantes adecuados incluyen goma arábiga, gelatina, almidón de maíz, goma de tragacanto, alginato sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes disgregantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma guar, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Los diluyentes adecuados incluyen lactosa, sorbitol, manitol, dextrosa, caolín, celulosa, carbonato cálcico, silicato cálcico o fosfato dicálcico. Los agentes aromatizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaultheria, aroma de cereza, naranja o frambuesa. Los agentes de recubrimiento adecuados incluyen polímeros o copolímeros de ácido acrílico y/o ácido metacrílico y/o sus ésteres, ceras de alcoholes grasos, zeína, laca o gluten. Los conservantes adecuados incluyen benzoato sódico, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metil parabeno, propil parabeno o bisulfito sódico. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato sódico, cloruro sódico o talco. Los agentes de retraso temporal adecuados incluyen monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Las formas líquidas para administración oral pueden contener, además de los agentes anteriores, un vehículo líquido. Los vehículos líquidos adecuados incluyen agua, aceites tales como aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, aceite de girasol o aceite de cártamo, aceite de cacahuete, aceite de coco, parafina líquida, metilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, etanol, propanol, isopropanol, glicerol, alcoholes grasos, triglicéridos o mezclas de los mismos.

20

25

30

35 Las suspensiones para administración oral pueden comprender, adicionalmente, agentes dispersantes y/o agentes de suspensión. Los agentes de suspensión adecuados incluyen carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, alginato sódico o alcohol acetílico. Los agentes dispersantes adecuados incluyen lecitina, ésteres de polioxietileno de ácidos grasos, tales como ácido esteárico, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polioxietilensorbitol, mono- o di-oleato, -estearato o -laurato de polietilensorbitano y similares

40 Las emulsiones para administración oral pueden comprender, adicionalmente, uno o más agentes emulsionantes. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen agentes de dispersión como se ha ejemplificado anteriormente o gomas naturales, tales como goma guar, goma arábiga o goma de tragacanto.

45 Las formulaciones tópicas de la presente invención comprenden un agente activo junto con uno o más vehículos aceptables y, opcionalmente, cualquier otro ingrediente terapéutico.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semi-líquidas adecuadas para penetración a través de la piel al sitio o donde se requiera el tratamiento, tal como linimentos, lociones, cremas, pomadas o pastas y gotas adecuadas para administración al ojo, oído o nariz.

50 Las gotas de acuerdo con la presente invención pueden comprender soluciones o suspensiones estériles acuosas u oleosas. Estas pueden prepararse disolviendo el ingrediente activo en una solución acuosa de un agente bactericida y/o fungicida, y/o cualquier otro conservante adecuado y opcionalmente incluyendo un agente superficialmente activo. La solución resultante puede aclararse después por filtración; transferirse a un recipiente adecuado y esterilizarse. La esterilización puede conseguirse por: autoclave o mantenimiento a 90°-100°C durante media hora, o por filtración, seguido de transferencia a un recipiente mediante una técnica aséptica. Los ejemplos de agentes bactericidas y fungicidas adecuados para inclusión en las gotas son nitrato o acetato fenilmercúrico (0,002%), cloruro de benzalconio (0,01%) y acetato de clorhexidina (0,01%). Los disolventes adecuados para la preparación de una solución oleosa incluyen glicerol, alcohol diluido y propilenglicol.

55

60 Las lociones de acuerdo con la presente invención incluyen aquellas adecuadas para aplicación a la piel o al ojo. Una loción para el ojo puede comprender una solución acuosa estéril que opcionalmente contiene un bactericida y puede prepararse por métodos similares a los descritos anteriormente con respecto a la preparación de gotas. Las lociones o linimentos para aplicación en la piel pueden incluir también un agente para precipitar el secado y refrigerar la piel, tal como un alcohol o acetona y/o un humectante, tal como glicerol o aceite, tal como aceite de ricino o aceite de cacahuete.

65

Las cremas, pomadas o pastas de acuerdo con la presente invención son formulaciones semisólidas del ingrediente activo para aplicación externa. Pueden prepararse mezclando el ingrediente activo en forma finamente dividida de polvo, solo o en solución o suspensión en un fluido acuoso o no acuoso, con una base grasa o no grasa. La base puede comprender hidrocarburos, tales como parafina líquida dura o blanda, glicerol, cera de abejas, un jabón metálico; un mucílago; o un aceite de origen natural, tal como aceite de almendra, de almidón, de cacahuete, de ricino o de oliva; grasas de lana o sus derivados o un ácido graso, tal como ácido esteárico u oleico junto con un alcohol, tal como propilenglicol o macrogoles.

La formulación puede incorporar cualquier agente superficialmente activo adecuado, tal como un agente superficial aniónico, catiónico o no iónico, tal como ésteres de sorbitano o derivados de polioxietileno de los mismos. Pueden incluirse también agentes de suspensión tales como gomas naturales, derivados de celulosa o materiales inorgánicos, tales como sílices silíceas y otros ingredientes tales como lanolina.

Las composiciones para administración parenteral normalmente comprenderán una solución en un compuesto de la presente invención, o un cóctel de los mismos disuelto en un vehículo aceptable, tal como agua, agua tamponada, solución salina al 0,4% y glicina al 0,3%, etc., en el que dichas soluciones son estériles y están relativamente libres de materia particulada.

Los métodos para preparar composiciones administrables por vía parenteral son evidentes para los expertos en la materia se describen con más detalle por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa, que se incorpora en este documento por referencia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse también en forma de liposomas. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos mono- o multilaminares, que están dispersados en un medio acuoso. Puede usarse cualquier lípido no tóxico fisiológicamente aceptable y metabolizable, capaz de formar un liposoma. Las formulaciones de la presente invención en forma de liposoma pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, estabilizadores, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas) tanto naturales como sintéticas. Los procedimientos para formar liposomas son nuevos en la técnica, y en relación con esto se hace referencia específica a: Prescott, Ed., Methods in Cell Biology, Volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 et seq., cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia. Dependiendo del resultado pretendido, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En una aplicación terapéutica las composiciones se administran a un paciente que ya está sufriendo una enfermedad, en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen el compuesto, o un cóctel del mismo, se administran a un paciente que no está aún en un estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente.

Típicamente, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con otros tratamientos conocidos, tales como cirugía y/o agentes terapéuticos, incluyendo quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Más típicamente, cuando se usa en el tratamiento de tumores sólidos, los compuestos de la presente invención pueden administrarse con agentes quimioterapéuticos tales como: adriamicina, taxol, fluoruracilo, melfalan, cisplatino, interferón alfa, COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona), PROMACE/MOPP (prednisona, metotrexato, (con un resto leucovina), doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona), vincristina, vinblastina, angioinhibinas, TNP-470, polisulfato de pentosano, factor plaquetario 4, angioestatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PG y similares. Otros agentes quimioterapéuticos que incluyen agentes alquilantes, tales como mostazas de nitrógeno, incluyen mecloetamina, melfan, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida; nitrosureas incluyendo carmustina, lomustina, semustina y estreptocina; sulfonatos de alquilo incluyendo busulfano; triacinas incluyendo dicarbacina; etieniminas incluyendo tiotepa y hexametilmelamina; análogos de ácido fólico, incluyendo metotrexato; análogos de pirimidina, incluyendo 5-fluoruracilo, citosina arabinósido; análogos de purina, incluyendo 5-mercaptopurina y 6-tioguanina; antibióticos antitumorales, incluyendo actinomicina D; las antraciclina, incluyendo doxorubicina, bleomicina, mitomicina C y metramicina; hormonas y antagonistas de hormonas, incluyendo tamoxifeno y corticoesteroides y agentes varios, incluyendo cisplatino y brequinar.

3. Ensayo general para determinar la concentración activa de As en solución.

La concentración activa de arsénicos trivalentes puede determinarse mediante el siguiente método general, que comprende las etapas de:

- (i) preparar soluciones arsénicas que comprenden concentraciones en aumento de un arsénico trivalente; valorar dichas soluciones arsénicas con una segunda solución que comprende una concentración conocida de un ditiol;
- añadir a cada solución una cantidad suficiente de un reactivo de detección de ditiol;
- medir espectroscópicamente cada solución arsénica para determinar la cantidad de ditiol en exceso; y calcular la concentración activa de dicho arsénico trivalente en dicha solución.

Típicamente, el ensayo para arsénicos trivalentes depende de la capacidad de los arsénicos trivalentes para unirse fuertemente a ditioles próximos, por ejemplo, 2,3-dimercaptopropanol (DMP) y para detectar fotométricamente tioles libres usando un reactivo y un detector adecuados. La concentración activa de arsénico trivalente se encuentra por valoración del arsénico con un ditiol, determinando después la cantidad de tiol libre que queda en solución (es decir, ditiol en exceso) con un reactivo adecuado. Se preparan soluciones con concentraciones en aumento de arsénico y cada una se añade a una cantidad constante de un ditiol, de manera que haya más ditiol que la menor cantidad de arsénico pero menos ditiol que la mayor. Estas soluciones con un exceso de ditiol darán un cambio de color medible fotométricamente tras la adición de un reactivo adecuado, y la concentración real de ditiol puede determinarse midiendo la absorbancia a una longitud de onda adecuada. Aquellas soluciones con exceso de arsénico no cambiarán de color, puesto que todo el tiol estará unido a As. La representación de los resultados da el punto de equivalencia (donde concentración de ditiol = concentración de As) y, como la concentración inicial de ditiol añadido a todas las soluciones es conocida, puede determinarse la concentración activa de As.

La invención se describirá ahora con mayor detalle por referencia a Ejemplos específicos.

Ejemplo 1

Síntesis de los compuestos de la invención

Los siguientes compuestos químicos se adquirieron y se usaron sin purificación adicional: fenilarsenóxido, bromuro de bromoacetilo, dióxido de azufre, d_6 -dimetilsulfóxido, óxido de deuterio, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, clorhidrato de D-glucosamina (Aldrich, Castle Hill, NSW); metanol, ácido sulfúrico al 98%, ácido bromhídrico al 48%, ácido clorhídrico al 37% (Ajax, Auburn, NSW); diclorometano, hidróxido de potasio, hidrogenocarbonato sódico, hidróxido sódico (BDH, Kilsyth, VIC); Gel P-2 extrafino con PM de corte de 1.800 (Bio-Rad, Hercules, CA); 2,3-dimercaptopropanol (DMP), ácido L-cisteico (Fluka, 15 Castle Hill, NSW); cloruro de tionilo (Merck, Darmstadt, Alemania); ácido 6,8-tióctico, ditiotreitolo, dimetilsulfóxido, ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico), ácido etilendiaminatetraacético, ácido *N*-(2-hidroxiethyl)piperazin-*N'*-(2-etanosulfónico), glutatión, carbonato sódico, cloruro sódico, yoduro sódico (Sigma, Castle Hill, NSW); ácido p-arsanílico (Tokyo Kasei Kogyo, Tokyo, Japón); glicina (ICN, Aurora, Ohio), ácido 3-(fluorescein-5-carbamoylmetiltio)propanoico, succinimidil éster (fluoresceína-5-EX, SE), ácido 6-(fluorescein-x-carboxamido)hexanoico (isómeros mixtos: x = 5 o 6), succinimidil éster (5(6)-SFX), y ácido 6-((6-(biotinoyl)amino)hexanoyl)amino)hexanoico, succinimidil éster (biotina-XX, SE) se obtuvieron de Molecular Probes, Eugene, Oregón. El colorante monofuncional CyTM5.5 se obtuvo de Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU. Todos los demás reactivos eran de calidad analítica.

Instrumentación - Los espectros de RMN 1D y 2D se obtuvieron usando un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker DPX300 con ¹H y ¹³C detectados a 300,17 MHz y 75,48 MHz, respectivamente. Las absorbancias UV-visible se registraron en un lector de microplacas Molecular Devices Thermomax Plus (Palo Alto, CA).

Preparación de óxido de deuterio acidificado - Se añadió con precaución cloruro de tionilo fresco a un exceso de óxido de deuterio. Una vez que el desprendimiento de SO₂ hubo cesado, la solución resultante (0,6 ml) se añadió a GSAO (aprox. 50 mg) en un tubo de RMN de 5 mm. Esta muestra se usó para obtener los espectros de RMN.

Ejemplo 1(a)

Síntesis de 4-(*N*-(*S*-glutacionilacetil)amino)fenilarsenóxido (GSAO)

La síntesis total de GSAO se representa esquemáticamente en la Figura 3.

Síntesis de ácido 4-(*N*-(bromoacetil)amino)fenilarsónico (BRAA)

Se añadió carbonato sódico (40,14 g, 378,7 mmol) a agua (200 ml) y se agitó a temperatura ambiente hasta que todos los sólidos se hubieron disueltos. A la solución de carbonato agitada se le añadió ácido p-arsanílico (29,99 g, 138,2 mmol), en porciones, y el volumen de la solución se llevó hasta 300 ml con adición de más agua. Se permitió que la solución (pH 10 a 11) se agitara durante 30 minutos y, si fuera necesario, se filtró para retirar cualquier sólido sin disolver antes de refrigerarla durante 2 a 3 horas. La solución se transfirió a un embudo de separación, y se añadieron lascas de hielo. El bromuro de bromoacetilo (15 ml, 34,76 g, 172,1 mmol) se diluyó en diclorometano (50 ml) y aproximadamente la mitad de la solución del diclorometano se añadió cuidadosamente a la solución acuosa fría. La mezcla se agitó cuidadosamente, con ventilación frecuente, para evitar la acumulación excesiva de presión. Después de 1 a 2 minutos, el desprendimiento de dióxido de carbono había terminado, y se realizó una agitación más vigorosa. La porción restante de bromuro de bromoacetilo se añadió cuidadosamente y el procedimiento se repitió. Cuando la reacción hubo terminado, se encontró que la solución tenía un pH de 7. La fase de diclorometano inferior se descargó y la fase acuosa se transfirió a un matraz de 1 l y se acidificó cuidadosamente por adición gota a gota de ácido sulfúrico al 98%. La precipitación completa del producto blanco requería la adición de ácido hasta que la solución tenía un pH de aproximadamente 1. El producto bruto se recogió y se secó en la bomba, típicamente con rendimientos del 50% al 75%. ¹H-RMN (d_6 -DMSO): δ 4,09 (s, 2H), 7,73 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 7,83 (d, *J* = 9 Hz, 2H),

10,87 (s, 1H). ¹³C-RMN (*d*₆-DMSO): δ30,53, 119,97, 127,34, 131,56, 143,08, 166,00 ppm.

Síntesis de 4-(*N*-bromoacetil)amino)fenilarsenóxido hidrato (BRAO.xH₂O)

5 En un matraz de fondo redondo, de 500 ml, de tres bocas, se puso BRAA (12,15 g, 36 mmol). El sólido se disolvió con agitación en una mezcla de metanol (75 ml) y ácido bromhídrico (48%, 75 ml), dando una solución amarilla transparente. La solución se filtró para retirar los sólidos residuales. Se añadió yoduro sódico (0,20 g, 1,3 mmol) como catalizador, con lo que el color de la solución se oscureció a naranja-pardo; después se hizo pasar lentamente dióxido de azufre gaseoso (aproximadamente 2 burbujas por segundo) a través de la solución agitada durante
10 aproximadamente 2,5 horas. El precipitado blanco resultante se recogió usando un embudo Büchner, dando el producto (17,32 g) como un sólido blanco apagado. Se determinó que la actividad de una solución preparada disolviendo una porción del sólido (40,7 mg) en DMSO desoxigenado (800 μl) era de 56 mM (véase más adelante). De esta manera, el peso molecular de BRAO.xH₂O es 908,5, es decir, 35% p/p de BRAO y 65% p/p de H₂O. Por lo tanto, el peso "anhidro" del producto de BRAO era el 35% de 17,43 g, es decir, 6,10 g (19 mmol, rendimiento del
15 53%). ¹H-RMN (*d*₆-DMSO): δ 4,85 (s, 2H), 7,78 (d, *J*= 9 Hz, 2H), 7,86 (d, *J*= 9 Hz, 2H), 11,36 (s, 1H). ¹³C-RMN (*d*₆-DMSO): δ 30,55, 119,22, 130,52, 140,04, 145,04, 165,52 ppm.

Síntesis de 4-(*N*-(*S*-glutathionilacetil)amino)fenilarsenóxido (GSAO)

20 Se desoxigenó DMSO (10 ml) haciendo pasar una corriente de nitrógeno gaseoso a través del mismo durante unos pocos minutos, y se usó para disolver BRAO.xH₂O (1,00 g, 2,48 mmol de arsenóxido activo). El glutatión (1,15 g, 3,74 mmol, 1,5 equivalentes) se disolvió en tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9,6 (35 ml) y se añadió a la solución de BRAO.xH₂O en DMSO. El volumen total se llevó a 50 ml de tampón bicarbonato 0,5 M, y la solución se agitó suavemente a temperatura ambiente durante una noche. La neutralización cuidadosa con ácido clorhídrico al 37%,
25 seguido de liofilización dio un producto en polvo blanco, que podía disolverse en agua sin dejar un residuo sólido. Se encontró que la concentración de arsenóxido activo de la solución resultante era de 49,6 mM, determinada usando el ensayo de DMP/DTNB (véase más adelante).

El producto se purificó usando filtración en gel (gel P-2 extrafino, corte 1,8 kDa, 50 g) en una columna de 130 ml, usando Hepes 20 mM, NaCl 0,14 M, EDTA 1 mM, tampón pH 7,4 como eluyente a un caudal de 0,10 ml/min. Se recogió un total de 144 ml (72 fracciones de 2 ml) y se controló por UV (λ 214 nm). Se resolvieron cuatro picos A, B, C y D. Los picos B y C mostraron actividad en el ensayo de DTNB/DMP (véase más abajo) y se asignaron como GSAO y BRAO sin reaccionar, respectivamente. Los picos A y B se asignaron provisionalmente como los productos de oxidación GSAA y BRAA (el producto de oxidación de BRAO), respectivamente (véase más adelante). El GSH
35 sin reaccionar también se detectó (usando DTNB) en las fracciones correspondientes al pico A. Las fracciones correspondientes al pico B se combinaron y desoxigenaron con nitrógeno gaseoso para dar una solución de GSAO (15 mM, aproximadamente 12 ml). ¹H-RMN (D₂O): δ 1,93 (q, *J*= 7 Hz, 2H), 2,35 (t, *J*= 8 Hz, 2H), 2,84 (dd, *J*= 14 Hz, *J*= 9 Hz, 1H), 3,05 (dd, *J*= 14 Hz, *J*= 5 Hz, 1H), 3,35 (s, 2H), 3,58 (t, *J*= 6 Hz, 1H), 3,64 (d, *J*= 2 Hz, 2H), 4,48 (dd, *J*= 9 Hz, *J*= 5 Hz, 1H), 7,44 (d, *J*= 8 Hz, 2H), 7,58 (d, *J*= 8 Hz, 2H). ¹³C-RMN (D₂O): δ 25,93, 31,16, 33,53,
40 36,01, 42,97, 52,83, 53,89, 121,29, 129,97, 138,77, 144,09, 170,90, 171,73, 173,75, 174,68, 175,76 ppm.

La espectroscopía RMN 2D se usó también para confirmar la estructura de GSAO. Se descubrió que una serie de espectros de RMN de ¹H y ¹³C, ¹H, ¹³C, ¹H-¹³C COSY, ¹H-¹³C HMQC y ¹H-¹³C HMBC, eran todos consistentes con la estructura propuesta en la Figura 3. Considerados juntos, todos los espectros permitían la asignación no ambigua de todos los átomos de carbono e hidrógeno no intercambiables. En la Figura 4, se muestra una expansión del espectro ¹H-¹³C HMBC de GSAO, que muestra la región alifática. La técnica HMBC ¹H-¹³C está correlacionada con el acoplamiento de los núcleos ¹H y ¹³C, aunque filtra directamente los núcleos unidos. Esto significa que los núcleos de ¹H y ¹³C están separados por dos, tres o (en ocasiones) cuatro enlaces, aparecen como picos cruzados en el espectro. La Figura 4 muestra que C11 está solo acoplado fuertemente a H7 (referido a los protones adjuntos a C7),
50 mientras que C7 está acoplado fuertemente a H11 además de a H6. Esto confirma que el azufre de GSH se había alquilado exitosamente con BRAO.

Ejemplo 1(b)

Síntesis de ácido 4-(*N*-(*S*-glutathionilacetil)amino)fenilarsónico (GSAA)

La síntesis de GSAA se representa esquemáticamente en la Figura 5.

Se disolvieron BRAA (1,00 g, 2,96 mmol) y glutatión (1,36 g, 4,44 mmol, 1,5 equivalentes) en tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9,6 (50 ml) y la solución se agitó suavemente a temperatura ambiente durante una noche. La liofilización dio un producto en polvo blanco que era libremente soluble en agua, que no dejaba un residuo sólido. El producto se purificó por filtración en gel en una columna de 570 ml (2,5 x 117 cm) de Bio-Gel P-2 extra fino (BioRad, Hercules, CA), usando agua desionizada como eluyente a un caudal de 0,1 ml por minuto. El producto (GSAA) se eluyó de la columna en una posición correspondiente al Pico A en la purificación de GSAO.
65

Ejemplo 1(c)**Síntesis de 4-(N-(S-(N-(6-((biotinoil)amino)hexanoil)amino)hexanoil)glutacionil)acetil)-amino)fenil-arsenóxido (GSAO-B)**

5

La síntesis de GSAO-B se representa esquemáticamente en la Figura 6.

El GSAO (0,13 g) se disolvió en tampón bicarbonato sódico 0,5 M (5 ml, pH 8,5) y la concentración de arsénico activo en la solución resultante se determinó que era 35 mM. La solución de arsénico tamponada (4,2 ml, que contenía 165 mmol de arsénico activo) se añadió a una solución de biotina-XX, SE (100 mg, 176 μ mol) en DMSO (1 ml), la mezcla se invirtió unas cuantas veces y después se incubó a 4°C durante 4 horas. Se añadió glicina (17,5 mg, 233 μ mol) y la mezcla se mantuvo a 4°C durante una noche. La concentración de arsénico equivalente en el producto de GSAO-B se determinó que era 31 mM y la solución se usó sin modificación adicional.

Ejemplo 1(d)**Síntesis de 4-(N-(S-(N-(3-fluorescein-5-carbamoilmetiltio)propanoil)glutacionil)acetil)-amino)fenil-arsenóxido (GSAO-F)**

La síntesis de GSAO-F se representa esquemáticamente en la Figura 7.

Una solución de fluorescein-5-EX succinimidil éster (2,4 mg, 4,1 μ mol) en DMSO (240 μ l) se añadió a GSAO (33,8 mM) en tampón Mes, pH 5,5 (5 mM, 473 μ l), y la mezcla se diluyó con tampón bicarbonato, pH 9 (0,5 M, 3,287 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 80 minutos. La solución amarilla se diluyó después con glicina (100 mM) en PBS (4 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La solución final contenía arsénico trivalente (2,00 mM) y glicina (50 mM).

Ejemplo 1(e)**Síntesis de GSAO-CyTM5.5**

La síntesis de GSAO-CyTM5.5 se representa esquemáticamente en la Figura 8.

Una solución de CyTM5.5 (266 nmol) en tampón bicarbonato, pH 9 (0,5 M, 968 μ l) se mezcló con una solución de GSAO (33,8 mM) en tampón Mes, pH 5,5 (5 mM, 32 μ l), y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 80 minutos. La solución azul se diluyó después con glicina (100 mM) en PBS (1 ml) y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La solución final contenía arsénico trivalente (0,54 mM) y glicina (50 mM).

Ejemplo 1(f)

40

Síntesis de 4-aminofenilarsenóxido (pAPAO)

La síntesis de pAPAO se representa esquemáticamente en la Figura 9.

Se añadió ácido bromhídrico (48%, 35 ml) a una suspensión de ácido p-arsanílico (7,76 g, 35,8 mmol) en metanol (35 ml) con agitación. Se añadió yoduro sódico (aprox. 0,05 g, 0,33 mmol) después la solución se puso en un baño de agua (temperatura ambiente). Se burbujeó dióxido de azufre a través de la solución agitada a una velocidad de aproximadamente 2 burbujas por segundo. Después de 2 horas, se había formado un precipitado blanco. Se dejó que la reacción transcurriera durante una noche, tiempo durante el cual la mayor parte del sólido se había redissuelto. El sólido restante se recogió y se secó en la bomba, produciendo 3,89 g. Se preparó una solución de pAPAO (24 mg) en DMSO (1 ml) y se determinó la concentración activa de arsénico trivalente (véase la determinación de GSAO). A partir de esto, se descubrió que el producto consistía en 3,57 mmol de arsénico activo (rendimiento del 10%).

Ejemplo 1(g)**Síntesis de una mezcla de 4-(N(6(fluorescein-5-carboxamido)hexanoil)aminofenilarsenóxido y 4-(N-(6-(fluorescein-6-carboxamido)heanoil)amino)-fenilarsenóxido (FXAO)**

La síntesis de FXAO se representa esquemáticamente en la Figura 9.

Una solución de una mezcla de succinimidil éster del ácido 6-(fluorescein-5-carboxamido)hexanoico y succinimidil éster del ácido 6-(fluorescein-6-carboxamido)hexanoico (4,9 mg, 8,29 μ mol) en DMSO (107 μ l) se añadió a pAPAO (22 mM) en DMSO (193 μ l). La mezcla se diluyó con tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (700 μ l) y después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 80 minutos. La solución amarilla se diluyó con glicina (100 mM) en PBS (1

ml), y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La solución final contenía arsénico trivalente (2,12 mM) y glicina (50 mM).

Ejemplo 1(h)

Síntesis de ácido 3,3'-ditiobis(propanoico)

Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

Se añadió carbonato sódico (64,0 g, 604 mmol) a agua (300 ml) y la solución se agitó a temperatura ambiente hasta que todos los sólidos se hubieron disueltos. Se añadió gota a gota ácido 3-mercaptopropanoico (50 ml, 60,9 g, 574 mmol) a una solución de carbonato agitada a una velocidad tal que el desprendimiento de dióxido de carbono no se hizo excesivamente vigoroso. Se añadió diclorometano (50 ml) a la suspensión resultante, seguido de adición en porciones de yodo (71,44 g, 281 mmol, 0,49 equivalentes). Durante la adición de yodo, se observó desprendimiento vigoroso de dióxido de carbono. La mezcla se transfirió a un embudo de separación de 500 ml y la fase orgánica inferior se descartó. La fase acuosa se filtró y se acidificó con precaución hasta pH 1 con ácido sulfúrico al 98%. El precipitado se recogió y se secó en la bomba para dar el producto (43,4 g, rendimiento del 72%). ¹H-RMN (*d*₆-DMSO): δ 2,59 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2,86 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 12,25 (s, 1H). ¹³C-RMN (*d*₆-DMSO): δ 33,4, 34,0, 173,0 ppm.

Ejemplo 1(i)

Síntesis de succinimidil éster del ácido 3,3'-ditiobis(propanoico)

Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

Se disolvió ácido 3,3'-ditiobis(propanoico) (9,5 g, 45,2 mmol) en una mezcla de acetona (600 ml) y diclorometano (600 ml) con agitación a temperatura ambiente. Se disolvió N-hidroxisuccinimida (12,68 g, 110,2 mmol, 2,44 eq) en la solución, después se añadió cuidadosamente 1,3-diciclohexilcarbodiimida (25,9 g, 125,5 mmol, 2,78 eq). La mezcla se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 horas, después de este tiempo la solución se filtró al vacío y el sólido residual se descartó. El disolvente se retiró del filtrado al vacío y el residuo oleoso se redisolvió en diclorometano (aprox. 200 ml). La solución se redujo de volumen (aprox. 50 ml) y se enfrió, dando el producto como un sólido cristalino incoloro (8,90 g, rendimiento del 49%). ¹H-RMN (*d*₆-DMSO): δ 2,80 (s, 8H), 3,05 (m, 8H). ¹³C-RMN (*d*₆-DMSO): δ 25,8, 30,7, 32,3, 167,9, 170,4 ppm.

Ejemplo 1(j)

Síntesis de disulfuro de N-(3-mercaptopropanoil)-L-aspartato disódico

Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

Se mezcló ácido L-aspartico (0,42 g, 3,16 mmol) con hidrogenocarbonato sódico (0,50 g, 5,95 mmol, 1,9 eq), después se añadió agua (1 ml). El hidrogenocarbonato sódico se añadió para inactivar los hidrógenos ácidos presentes en el ácido L-aspartico. Cuando el desprendimiento del dióxido de carbono hubo terminado, la mezcla se diluyó con tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (19 ml, 9,5 mmol): Todos los sólidos se disolvieron con agitación y se encontró que la solución tenía un pH de 9. Se añadió gota a gota succinimidil éster del ácido 3,3'-ditiobis(propanoico) (0,247 M en DMSO, 5 ml, 1,24 mmol) a la solución de carbonato acuosa con agitación. Inmediatamente, apareció un precipitado blanco, pero tras la agitación vigorosa se redisolvió. Después de 24 horas, tiempo durante el cual la mezcla se agitó periódicamente, se añadió diclorometano (1 ml) y la mezcla se dejó reposar de nuevo durante 24 horas con agitación periódica. La solución (pH 9) se acidificó hasta pH 7 mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico al 32%. El producto se precipitó mediante la adición lenta, gota a gota, de la solución a un vaso de precipitados agitado de etanol anhidro (300 ml) a temperatura ambiente, dando un precipitado blanco esponjoso que se recogió por filtración y se secó al vacío, dando el producto en forma de un sólido blanco (0,37 g, rendimiento del 53%). ¹³C-RMN (D₂O): δ 33,2, 34,8, 37,2, 50,9, 175,6, 176,0, 176,4 ppm.

Ejemplo 1(k)

Síntesis de disulfuro de N-(3-mercaptopropanoil)-L-glutamato disódico

Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

El procedimiento usado era el mismo que para el disulfuro de N-(3-mercaptopropanoil)-L-aspartato disódico, pero usando ácido L-glutámico (0,44 g, 2,99 mmol) e hidrogenocarbonato sódico (0,55 g, 6,55 mmol, 2,2 eq). El producto se obtuvo como un sólido blanco (0,61 g, rendimiento del 87%). ¹³C-RMN (D₂O): δ 28,5, 33,2, 34,1, 35,0, 55,2, 173,6, 179,2, 181,2 ppm.

Ejemplo 1 (l)**Síntesis de disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-L-cisteato disódico**

5 Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

El procedimiento usado fue el mismo que para el disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-L-aspartato disódico, pero usando ácido L-cisteico (0,59 g, 3,15 mmol) e hidrogenocarbonato sódico (0,56 g, 6,67 mmol, 2,1 eq). El producto se obtuvo como un sólido blanco (0,68 g, rendimiento del 79%). ¹³C-RNM (D₂O): δ 33,5, 35,7, 50,8, 52,3, 174,1, 178,9 ppm.

Ejemplo 1(m)**Síntesis de disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-D-glucosamina disódica**

15 Un esquema que describe la síntesis se proporciona en la Figura 10.

El procedimiento siguió el de los derivados de aminoácido descritos anteriormente, usando clorhidrato de D-glucosamina (0,67 g, 3,11 mmol), excepto que no se añadió hidrogenocarbonato sódico adicional inicialmente, y el producto se precipitó con acetona AR (300 ml) en lugar de etanol. El producto se obtuvo en forma de un sólido blanco (0,67 g, rendimiento del 81%). ¹³C-RMN (D₂O): δ 33,8, 35,4, 35,7, 39,3, 54,6, 57,2, 61,1, 61,2, 70,4, 70,6, 71,1, 72,0, 74,3, 76,4, 91,3, 95,4 ppm.

Ejemplo 1(n)**Síntesis de ácido *N*-3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)-L-aspartico (AspAO)**

Una solución de BRAO 70,0 mM en DMSO (1,68 ml, 118 μmol) se mezcló con una solución de disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-L-aspartato disódico (0,37 g) disuelto en tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (6,72 ml, 3,4 mmol). A la solución se le añadió trifenilfosfina 0,69 M en DMSO (1,1 ml, 760 μmol). Hubo una precipitación inmediata de lo que se supone que era trifenilfosfina insoluble, por lo que se añadió DMSO (1 ml) y la mezcla se agitó minuciosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla se filtró y se acidificó a pH 4 con la adición gota a gota de ácido clorhídrico al 32%, dando 7,5 ml de solución. Se encontró que la concentración activa de arsénico trivalente era de 17,5 mM (usando el mismo método que el usado para determinar las concentraciones activas de BRAO y GSAO).

Ejemplo 1(o)**Síntesis de ácido *N*-3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-L-glutámico (GluAO)**

El procedimiento usado fue el mismo que para el ácido *N*-(3-(4-arsenoxofenilcarbamoilmetiltio)-propanoil)-L-aspartico, usando 2,63 ml (184 μmol) de BRAO 70,0 mM en DMSO, disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-L-glutamato disódico (0,61 g), tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (10,52 ml, 5,3 mmol) y trifenilfosfina 0,69 M en DMSO (1,7 ml, 1,2 mmol). En este caso, se añadió DMSO (2 ml) a la mezcla precipitada antes de dejarla durante una noche. La concentración activa de arsénico trivalente se encontró que era de 15,4 mmol (10,3 ml de solución).

Ejemplo 1(p)**Síntesis de ácido *N*-3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-L-cisteico (Cys*AO)**

El procedimiento usado fue el mismo que para el ácido *N*-(3-(4-arsenoxofenilcarbamoilmetiltio)-propanoil)-L-glutámico, usando 2,70 ml (189 μmol) de BRAO 70,0 mM en DMSO, el disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-L-cisteato disódico (0,68 g), tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (10,80 ml, 5,4 mmol) y trifenilfosfina 0,69 M en DMSO (1,8 ml, 1,2 mmol). Se encontró que la concentración activa de arsénico trivalente era de 17,5 mM (12,3 ml de solución).

Ejemplo 1(q)**Síntesis de *N*-3-(4-arsenosofenilcarbamoilmetiltio)propanoil)-D-glucosamina (GlcAO)**

El procedimiento usado fue el mismo que para el ácido *N*-(3-(4-arsenoxofenilcarbamoilmetiltio)-propanoil)-L-glutámico, usando 3,00 ml (210 μmol) de BRAO 70,0 mM en DMSO, disulfuro de *N*-(3-mercaptopropanoil)-D-glucosamina disódica (0,67 g), tampón bicarbonato 0,5 M, pH 9 (11,96 ml, 6,0 mmol) y trifenilfosfina 0,69 M en DMSO (1,9 ml, 1,3 mmol). Se encontró que la concentración activa de arsénico trivalente era de 13,5 mM (11,0 ml de solución).

Ejemplo 2**Ensayo y Reactividad de GSAO****Ejemplo 2(a)****Ensayo de BRAO, GSAO y GSAO-B**

Se disolvió una solución madre de DMP (5 μ l, 50 μ mol) en DMSO (995 μ l), proporcionando una concentración de DMP de 50 mM. Una segunda dilución de la solución madre de DMP 50 mM (10 μ l) en tampón a pH 7,0 (HEPES 0,1 M, NaCl 0,3 M, EDTA 1 mM) (990 μ l) proporcionó una solución de trabajo de DMP 500 mM. Después, la actividad del arsénico podría determinarse valorando diversas cantidades de arsénico frente a la solución de trabajo de DMP (10 μ l) en una placa de microvaloración de 96 pocillos, constituyendo un volumen total de 195 μ l por adición de tampón. Después de una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, tiempo durante el cual las soluciones se agitaron en un agitador de placa, se añadieron 5 μ l de una solución madre de DTNB 37,9 mM (15 mg) en DMSO (1 ml) y la placa se incubó con agitación durante 10 minutos más. La absorbancia a 412 nm debido a la formación del dianión TNB se midió usando un lector de microplacas Thermomax Plus de Molecular Devices (Palo Alto, CA). El coeficiente de extinción para el dianión TNB a pH 7,0 es 14,150 M⁻¹ cm⁻¹ a 412 nm (Riddles et al., 1983).

El GSAO se unió a DMP y se evitó la interacción del ditiol con DTNB mientras que cualquier interacción de GSAO con cisteína se desplazó por DTNB (Figura 11). Este resultado confirmó la selectividad de GSAO por ditiol.

Ejemplo 2(b)**Interacción de GSAO con ditiolos sintéticos, peptídicos y proteicos**

La tioredoxina humana recombinante producida en *E. coli* procedía de American Diagnostica, Greenwich, CT. Los hexapéptidos TrpCysGlyProCysLys y TrpCysGlyHisCysLys procedían de Auspep, Parkville, Australia.

La unión de GSAO a ditiolos se midió a partir de la pérdida de tioles usando el ensayo de DTNB descrito anteriormente. La constante disociación K_d para la unión de GSAO a ditiolos se determinó incubando concentraciones en aumento de GSAO, I con una concentración de ditiol fija $[S]_T$ y midiendo el ditiol restante usando DTNB. Obsérvese que la concentración de ditiol es igual a la mitad de la concentración de TNB. La concentración de complejo ditiol.GSAO, SI, como una función de la concentración de GSAO total, $[I]_T$, se describe mediante la Ecuación 1 (Hogg y Jackson, 1990),

$$[SI] = 0,5 \cdot \{([S]_T + x \cdot [I]_T + K_D) - \sqrt{([S]_T + x \cdot [I]_T + K_D)^2 - 4 \cdot [S]_T \cdot x \cdot [I]_T}\}^{0,5} \quad (1)$$

en la que x es un factor que, cuando se multiplica junto con $[I]_T$, producirá la concentración activa de GSAO. Los datos se ajustaron a la ecuación 1 por regresión de mínimos cuadrados no lineal siendo K_d y x los parámetros desconocidos (Scientist software, Micromath. Salt Lake City, Utah). x era $1 \pm 0,2$ para todos los ditiolos ensayados.

La tioredoxina contiene 5 tioles accesibles que reaccionan con DTNB (Holmgren, 1989). La valoración de tioredoxina con GSAO dio como resultado una disminución de 3 a 5 tioles tras la formación del complejo. La constante de disociación, K_d , para GSAO que se une a tioredoxina se determinó incubando concentraciones en aumento de GSAO, I, con una concentración de tioredoxina tiol fija, $[S]_T$, y midiendo los grupos tiol restantes usando DTNB. Obsérvese que la concentración de grupos tiol es igual a la concentración de TNB. La concentración del complejo tioredoxina tiol.GSAO, SI, como una función de la concentración de GSAO total $[I]_T$ se describe mediante la Ecuación 2,

$$[S]_T = 2 \cdot [S]_T + 2 \cdot [S]_D + [S]_M \quad (2a)$$

$$[SI] = 0,5 \cdot \{([S]_D + x \cdot [I]_D + K_D) - \sqrt{([S]_D + x \cdot [I]_D + K_D)^2 - 4 \cdot [S]_D \cdot x \cdot [I]_D}\}^{0,5} \quad (2b)$$

en la que $[S]_D$ es la concentración de tioredoxina ditiol que forma complejo con GSAO y $[S]_M$ es la concentración de los grupos tiol restantes. Los datos se ajustaron a la ecuación 2 por regresión de mínimos cuadrados no lineal siendo K_d y x los parámetros desconocidos (Scientist software, Micromath. Salt Lake City, Utah). x era $1,5 \pm 0,2$ para tioredoxina.

Los pequeños ditiolos sintéticos, DMP, ácido 6,8-tióctico y ditiotreitól, formaron complejos de alta afinidad con GSAO (Figuras 12A, B y C, Tabla 1). La afinidad por GSAO disminuía a medida que el tamaño de la estructura de anillo con el arsénico de GSAO aumentaba. Por ejemplo, los dos tioles de DMP están en átomos de carbono adyacentes que forman un anillo de cinco miembros con el arsénico de GSAO. La afinidad de GSAO por los ditiolos disminuyó desde una constante de disociación de 130 nM, para un anillo de cinco miembros con DMP, a 420 nM, para un anillo de

siete miembros con ditiotreitól.

El GSAO también se une con alta afinidad tanto a ditioles peptídicos como proteicos. Los dos péptidos TrpCysGlyProCysLys (Holmgren, 1989) y TrpCysGlyHisCysLys (Gilbert, 1997), corresponden a las secuencias de sitio activas de tiorredoxina y PDI, respectivamente. Ambos péptidos se unían a GSAO con constantes de disociación de aproximadamente 1 μ M (Figuras 12D y E, Tabla 1). Había 15 átomos en la estructura de anillo de los péptidos con el arsénico de GSAO. A pesar de esta gran estructura de anillo la constante de disociación para la unión de GSAO era solo el doble que para la unión de GSAO a ditiotreitól. Este resultado implicaba que la estructura secundaria de los péptidos llevaba los dos tioles de Cys contiguos lo que los permitía formar el complejo con el arsénico trivalente. El GSAO se unió al ditiol de sitio activo de tiorredoxina con una constante de disociación de 37,0 \pm 180 nM (Figura 12F, Tabla 1), que era una afinidad ~4 veces mayor que la de GSAO que se unía al sitio activo de tiorredoxina hexapéptido, 1.420 \pm 450 nM. Este resultado implicaba que la distancia entre los tioles del sitio activo en la tiorredoxina era más próxima que su distancia en el hexapéptido.

Considerados en conjunto, estos resultados indicaban que GSAO se une selectivamente a proteínas que contienen tioles próximos entre sí. Para identificar estas proteínas sobre la superficie celular, se fijó un resto biotina mediante un brazo espaciador al grupo amino primario del resto γ -glutamilo de GSAO. La incorporación de GSAO-B en proteínas podría evaluarse midiendo la biotina usando estreptavidina-peroxidasa.

20 **Tabla 1.** Constantes de disociación para unir GSAO a ditioles sintéticos y proteicos.

Ditiol	Tamaño de Anillo ^a	Constante de disociación, nM
2,3-Dimercapto-1-propanol	5	130 \pm 40 ^b
ácido 6,8-tióctico	6	200 \pm 50
Ditiotreitól	7	420 \pm 80
TrpCysGlyProCysLys	15	1.420 \pm 450
TrpCysGlyHisOysLys	15	870 \pm 270
Tiorredoxina	15	370 \pm 180

a número de átomos en la estructura de anillo con el arsénico de GSAO

b los errores son 1 DT

Ejemplo 2(c)

25 **Inhibición de la actividad de tiorredoxina por GSAO**

Se observó que la tiorredoxina reducía uno o más enlaces disulfuro de proteína en el fragmento N-terminal de 70 kDa de fibronectina. La incubación de GSAO 1 μ M con tiorredoxina 1 μ M durante 10 minutos en solución salina tamponada con Hepes dio como resultado una inhibición de ~50% de reducción mediada por tiorredoxina del fragmento de fibronectina, mientras que la incubación con GSAO 10 μ M inhibió completamente la actividad de tiorredoxina (Figura 13).

Ejemplo 2(d)

35 **Interacción de GSAO.B con PDI y tiorredoxina**

PDI recombinante humano y tiorredoxina se unieron a GSAO-B (Figura 14). La proteína humana recombinante disulfuro isomerasa (PDI), se produjo en *E. coli* y se purificó de acuerdo con Jiang et al. (1999). Como control negativo, en el experimento, se incubaron, PDI, tiorredoxina o albúmina purificadas, con un exceso molar doble de ditiotreitól durante 60 minutos para garantizar que los disulfuros del sitio activo de PDI y tiorredoxina estaban en el estado de ditiol reducido. Las proteínas se incubaron después con GSAO-B o GSAO-B y un exceso molar cuádruple de DMP durante 30 minutos. Los moles equivalentes de las proteínas marcadas se resolvieron en SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF, y se realizó una transferencia con estreptavidina - peroxidasa para detectar el marcador GSAO-B. Las muestras se resolvieron en SDS-PAGE al 4-15% en condiciones no reductoras (Laemmli, 1970) y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas se detectaron por transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal murino anti-PDI (Jiang et al., 1999) (usado a 2 μ g por ml). Se usaron anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados de peroxidasa de rábano rusticano (Dako Corporation, Carpinteria, CA) a una dilución 1:2000. Las proteínas marcadas con GSAO-B se transfirieron con estreptavidina peroxidasa (Amersham, Sydney, NSW) usada a una dilución 1:1000. Las proteínas se visualizaron usando quimioluminiscencia (DuPont NEN, Boston, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las películas de quimioluminiscencia se analizaron usando un Densitómetro de formación de imágenes GS-700 y un programa informático Multi-Analyst (Bio-Rad, Hércules, CA).

Tanto la PDI como la tiorredoxina incorporaron GSAO-B pero la albúmina no. Cuanto mayor era la banda M_r en el carril 1 de la Figura 14B menor era la cantidad de PDI agregada en la preparación (Jiang et al., 1999). Es notable que la densidad de marcaje de PDI era de aproximadamente dos veces el de tiorredoxina lo que concuerda con dos los ditioles de sitio activo de PDI frente a uno de la tiorredoxina.

Ejemplo 2(e)

Comparación de los efectos de arsénicos trivalentes hidrófobos, hidrófilos o cargados, sobre la viabilidad de las células endoteliales

Se sembraron células endoteliales aórticas bovinas (BAE) (Hotchkiss et al., 1998) en pocillos de placas de 96 pocillos durante una noche, se lavaron y después se incubaron con medio completo que contenía concentraciones en aumento de cualquiera de la membrana permeable PAO o las GSAO, AspAO, GluAO, Cys*AO, GlcAO o FXAO sustancialmente impermeables a membrana. Después de 24 horas de incubación se realizó el recuento de las células adherentes.

PAO era muy tóxico para células BAE con un valor CI_{50} para viabilidad de $< 0,1 \mu\text{M}$ (Figura 15). La viabilidad de los valores de CI_{50} para GSAO, AspAO, GluAO, Cys*AO, GlcAO y FXAO eran $< 100 \mu\text{M}$, $< 1 \mu\text{M}$, $< 10 \mu\text{M}$, $< 10 \mu\text{M}$, $< 1 \mu\text{M}$ y $> 200 \mu\text{M}$ respectivamente (Figura 15). GSAA no tenía efecto significativo sobre la viabilidad de BAE hasta una concentración de 10 mM (no mostrada). Este resultado demostró que limitando la entrada de arsénico trivalente en la célula fijándola a grupos colgantes cargados (GSH, Asp, Glu, ácido cisteico) o hidrófilos (glucosamina, fluoresceína-X) se reducía la toxicidad de 10 a >2.000 veces.

Ejemplo 2(f)

GSAO es sustancialmente impermeable a membrana

GSAO no atraviesa la membrana plasmática en ningún grado significativo. Se incubaron células T humanas (A3.01) o células BAE adherentes con medio completo que contenía GSAO $50 \mu\text{M}$ y ~ 100.000 recuentos por minuto de GSAO marcado con tritio durante 1 ó 72 horas. El GSAO marcado con tritio se preparó exactamente como se describe para GSAO excepto que se usó glicina- $2\text{-}^3\text{H}$ -glutación (NEN, Boston, MA) en lugar de glutación frío. Las células se lavaron y se lisaron mediante dos ciclos de congelación y descongelación. Los constituyentes citosólicos se recogieron por centrifugación diferencial (Ausbel et al., 2000) y se midió el GSAO marcado con tritio. Después de 1 hora se encontró solo el 0,5% del GSAO marcado con tritio en el citosol de las células T y el 0,04% en el citosol de las células BAE. Además, después de 72 horas de cultivo sólo el 4,5% de GSAO penetró en la membrana de células T.

Ejemplo 3

Efecto de GSAO sobre la angiogénesis

Ejemplo 3(a)

Identificación de proteínas de la superficie celular endotelial que contienen ditioles próximos entre sí

Se recogieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) (Wall et al., 1978) y de la línea celular endotelial microvascular dérmica humana, HMEC-1 (Ades et al., 1992) y cultivaron como se indica. Las células endoteliales (5×10^6) se separaron de los matraces de cultivo usando EDTA 5 mM en PBS a 37°C , se lavaron 3 veces con PBS, se resuspendieron en PBS que contenía $100 \mu\text{M}$ de GSAO-B en ausencia o presencia de DMP $400 \mu\text{M}$ y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron 3 veces con 1 ml de PBS, se resuspendieron en 0,2 ml de Tris/HCl 50 mM enfriado con hielo, tampón a pH 8 que contenía NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 1%, leupeptina $10 \mu\text{M}$, PMSF 2 mM (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO), EDTA 5 mM y aprotinina $10 \mu\text{M}$ (Bayer Australia Ltd., Sydney, NSW) y se sometió a ultrasonidos sobre hielo. En algunas ocasiones los lisados celulares se incubaron con perlas de estreptavidina-agarosa (Sigma, Castle Hill, NSW) ($25 \mu\text{l}$ de perlas empaquetadas en un volumen total de 1 ml) durante 60 minutos a 4°C con una mezcla rotatoria. Las proteínas unidas se lavaron 5 veces con Tris/HCl 50 mM, tampón a pH 8 que contenía NaCl 0,15 M y Triton X-100 al 0,05%, se resolvieron sobre SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF, y las proteínas marcadas con GSAO-B se detectaron por transferencia de Western.

Hubo aproximadamente 10 proteínas sobre la superficie de las células endoteliales que incorporaban GSAO-B (Figura 16A). Las masas moleculares de estas proteínas variaban de 12 a 138 kDa (Figura 16B). La intensidad del marcaje de las proteínas varió considerablemente lo que probablemente reflejaba su abundancia sobre la superficie celular, aunque esto también puede haber reflejado diferencias en la afinidad de GSAO para los ditioles proteicos. El marcaje fue específico puesto que en efecto no hubo incorporación de GSAO-B en presencia de DMP.

Ejemplo 3(b)**PDI era una de las proteínas marcadas con GSAO-B en la superficie de las células endoteliales**

Se marcaron células BAE con GSAO-B en ausencia o presencia de DMP, se lisaron e incubaron con perlas de estreptavidina-agarosa para recoger las proteínas marcadas con biotina. Las proteínas marcadas se eluyeron de las perlas, se resolvieron sobre SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se transfirieron con anticuerpos policlonales anti-PDI.

Los resultados mostrados en la Figura 17 indican que PDI era una de las proteínas de la superficie de la célula endotelial que incorporaba GSAO-B. No hubo marcaje de PDI en presencia de DMP lo que se confirma por los resultados de la Figura 14. La banda M_r más grande en el carril 1 de la Figura 17 era algo de PDI agregado (véase la Figura 14B).

Ejemplo 3(c)**Inhibición por GSAO de la proliferación de células endoteliales**

Se recogieron células BCE (Folkman et al. 1979), BAE, BxPC-3 (ATCC, Bethesda, MD), HT1080 (Jiang et al., 1999), 3T3 (ATCC, Bethesda, MD) y BVSM (Hogg et al., 1997) se recogieron y se cultivaron como se indica. Las células (0,5 ml de 30.000- o 100.000 células por ml) se sembraron en placas de cultivo de 24 pocillos gelatinizadas (Coming Costar, Coming, NY) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, JHR Bioscience, Lenexa, KS) que contenía suero de ternera fetal al 10% (FCS, Intergen Comp., Purchase, NY) y Glutamina Pen-Strep (GPS, Irvine Scientific, Santa Ana, VA) al 1% y se dejó fijar durante 24 horas en CO₂ al 10% a 37°C. Después, el medio se reemplazó por DMEM y GPS al 1% que contenía GSAO o GSAA de 0 a 1 mM y cualquiera de suero de ternera bovino al 5% (BCS, HyClone, Logan, UT) y 1 ng por ml de FGF-2 (Genzyme, Cambridge, MA) o BCS al 5% y 10 ng por ml de VEGF (Genzyme, Cambridge, MA) para células BCE, BCS al 5% o 10% para células BAE, BCS al 5% para células BVSM, y FCS al 5% para células BxPC-3, HT1080 y 3T3. Las células se cultivaron durante 0 a 72 horas en CO₂ al 10% a 37°C y después se dispersaron en tripsina/EDTA (GibcoBRL, Grand Island, NY), se resuspendieron en solución electrolítica equilibrada de Coulter y se contaron con un contador Coulter Z1 (Coulter Corp., Miami, FL). En todos los experimentos hubo dos pocillos de control que contenían DMEM con GPS al 1% y cualquiera de BCS al 5% para células BCE, BCS al 2% para células BAE y BVSM o FCS al 2% para células BxPC-3, HT1080 y 3T3. Estos pocillos no representaban proliferación limitada.

GSAO inhibió la proliferación y redujo la viabilidad de células BCE en cultivo (Figura 18). En cambio, GSAA solo tuvo un efecto marginal sobre la proliferación a la mayor concentración usada, 1 mM, y no tuvo efecto significativo sobre la viabilidad. La inhibición de la proliferación por GSAO era independiente de si las células se estimulaban con el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Figura 18A) o el factor de crecimiento celular endotelial vascular (VEGF) (Figura 18B). La CI_{50} para inhibición de proliferación en respuesta a FGF-2 o VEGF era $\sim 0,1 \mu M$ y $\sim 0,05 \mu M$, respectivamente (Tabla 2). GSAO también redujo la viabilidad de las células BCE con valores CI_{50} de $\sim 10 \mu M$ y $\sim 3 \mu M$ en presencia de FGF-2 o VEGF, respectivamente (Tabla 2). Los efectos antiproliferativos frente a viabilidad de GSAO se separaron midiendo la viabilidad de los cultivos confluentes de las células. Por ejemplo, la Figura 18 muestra los efectos de GSAO sobre la viabilidad de un cultivo casi confluyente de células BCE. En este experimento hubo $< 10\%$ de aumento en el número de células después de 72 horas de cultivo. La dependencia del tiempo del efecto de GSAO sobre la proliferación y viabilidad de células BCE se muestra en la Figura 18D. Se seleccionó una concentración de GSAO $10 \mu M$ puesto que esta era el valor CI_{50} para disminuir la viabilidad (Tabla 2). No hubo disminución en la viabilidad después de 8 horas. El número de células disminuyó posteriormente.

GSAO inhibió también la proliferación y redujo la viabilidad de las células BAE (no mostrado). GSAA no influyó en la proliferación o en la viabilidad. Los valores de CI_{50} para la inhibición de la proliferación y reducción de viabilidad por GSAO estaban en el mismo intervalo que para las células BCE (Tabla 2). Cabe destacar que el valor CI_{50} para la inhibición de proliferación de células BAE fue de $\sim 0,02 \mu M$ cuando FCS al 5% era el mitógeno frente a $\sim 0,2 \mu M$ cuando se usó FCS al 10%.

GSAO no afectó en la proliferación de las líneas celulares de cáncer humanas, BxPC-3 o HT1080, ni en fibroblastos murinos 3T3 o células del músculo liso vascular bovino (BVSM) (Figura 19). GSAO influyó en la viabilidad de todas estas células con un valor CI_{50} de $\sim 40 \mu M$ (Tabla 2). Este valor fue 4-13 veces mayor que los valores de CI_{50} para la reducción de viabilidad de células endoteliales. GSAA no tuvo efecto significativo sobre la proliferación o viabilidad de estas células hasta una concentración 1 mM.

Tabla 2. Efectos de GSAO sobre la proliferación y viabilidad de células cultivadas

Célula	Mitógeno	CI ₅₀ de proliferación, μM^a	CI ₅₀ de viabilidad, μM^b
BCE	BCS al 5% + 1 ng/ml de FGF-2	~0,1	~10
BCE	BCS al 5% + 10 ng/ml de VEGF	~0,05	~3
BAE	BCS al 5%	~0,02	~8
BAE	BCS al 10%	~*0,2	~10
BxPc3	FCS al 5%	Sin efecto	~40
HT1080	FCS al 5%	Sin efecto	~40
BVSM	FCS al 5%	Sin efecto	~40
3T3	FCS al 5%	Sin efecto	~40

a. El valor CI₅₀ para la inhibición de proliferación de células BCE y BAE se calculó como la concentración de GSAO que redujo el grado de proliferación a la mitad del número de células en ausencia de GSAO en relación con el número de células de los pocillos que contenían BCS al 5% para células BAE y BCS al 2% para células BAE en una incubación de 72 horas (líneas de puntos en la Figura 18).

b. El valor CI₅₀ para la reducción de viabilidad de células BCE y BAE se calculó como la concentración de GSAO que redujo el número de células a la mitad en ensayos en los que las células tenían una confluencia >90% al comienzo de la incubación de 72 horas (véase, por ejemplo, la Figura 18C). El valor de CI₅₀ para reducción en la viabilidad del resto de células se calculó como la concentración de GSAO que redujo el número de células a la mitad en una incubación de 72 horas.

GSAO redujo el número de colonias de granulocitos/macrófagos en un ensayo de cultivo de médula ósea humana de 12 días con una CI₅₀ de ~30 μM (Figura 20). GSAA no tuvo efecto sobre el número de colonias hasta una concentración de 100 μM . Se añadieron células de médula ósea humana (~5 x 10⁵ células por ml) a agar semisólido en DMEM que contenía BCS al 20%, 5 ng por ml de IL-3 y GSAA o GSAO de 0 a 100 μM . Los cultivos se incubaron durante 12 días a 37 °C y CO₂ al 5% y se contaron grupos de 40 células o más usando un microscopio invertido de acuerdo con Metcalf (1977).

Estos hallazgos indicaron que GSAO era un inhibidor selectivo de la proliferación de células endoteliales microvasculares y macrovasculares. Los efectos inhibitorios eran independientes de si el mitógeno era FGF-2 o VEGF. GSAO también redujo la viabilidad de las células endoteliales en cultivo de una manera dependiente del tiempo. Los efectos parcialmente máximos sobre la viabilidad fueron al menos 4 veces más pequeños que los efectos sobre la viabilidad de otras células primarias o transformadas.

Ejemplo 3(d)

Inhibición por GSAO de la formación de tubos en células endoteliales

Las células endoteliales se disponen en estructuras tubulares cuando se siembran sobre matrices tridimensionales tales como la preparación de matriz extracelular, Matrigel o colágeno. Puede considerarse que los tubos representan vasos sanguíneos inmaduros. Se añadió Matrigel (100 μl , Becton Dickinson, Bedford, MA), a pocillos de placas de 96 pocillos (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y se permitió que se gelificasen durante 60 minutos a 37 °C. Se recogieron células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMVE) y se cultivaron como se describe en Stathakis et al. (1997). Sobre el Matrigel se sembraron células HDMVE (8.000 células por pocillo) en 150 μl de medio M199 (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) que contenía suero humano combinado al 30%, 50 μg por ml de Heparina (Sigma, St. Louis, MO), 100 μg por ml de complemento de crecimiento celular endotelial (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) y GSAA o GSAO 0,1, 1 ó 100 μM y las placas se incubaron durante 18 horas en CO₂ al 5% a 37 °C. Se recogieron micrografías de contraste de fase de los pocillos.

GSAO alteró la formación de tubos por células HDMVE en Matrigel (Figura 21). Los efectos fueron evidentes a una concentración 0,1 μM y notables a 100 μM . En las mismas concentraciones GSAA no tuvo efecto evidente sobre la formación de tubos.

Ejemplo 3(e)

Inhibición por GSAO de angiogénesis en membrana corioalantoidea (CAM) de polluelo

El ensayo de CAM de polluelo se ha usado para la detección y análisis de inhibición de angiogénesis (Nguyen et al., 1994). Se cascaron huevos de Legorno blancos de 3 días de edad fertilizados (Spafas, Norwich, CT), los embriones con yemas intactas se pusieron en placas de Petri de 20 x 100 mm y se incubaron durante 3 días a 37 °C y CO₂ al

3% (Folkman, 1995). Después se aplicaron discos de metilcelulosa (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) que contenían 5, 10 o 50 µg de cualquiera de GSAA o GSAO a la CAM de embriones individuales y se incubaron durante 48 horas a 37 °C y CO₂ al 3%. Los discos se prepararon por desecación de GSAA o GSAO en 10 µl de metilcelulosa al 0,45% sobre barras de teflón. Las CAM se observaron usando un estereomicroscopio y se puntuaron para determinar un efecto o inhibición no evidente de angiogénesis en CAM como se define por zonas avasculares. En algunas ocasiones, se inyectó tinta India a los vasos sanguíneos de la CAM y se fotografiaron.

GSAO inhibió la angiogénesis en la CAM de una manera dependiente de la concentración (Figura 22). La inhibición de la angiogénesis se definió como zonas avasculares 48 horas después del implante de gránulos de metilcelulosa que contenían GSAO en el día 6 de CAM (véase el panel izquierdo de la Figura 22). Hasta 50 µg por gránulo GSAA no tuvo efecto sobre la angiogénesis de CAM. Ni GSAA ni GSAO tuvieron ningún efecto negativo evidente sobre el bienestar de los embriones de polluelo.

Ejemplo 3(f)

Inhibición por GSAO del crecimiento tumoral en ratones

Se usaron ratones hembra SCID o C57Bl6/J de 7 a 9 semanas de edad (Massachusetts General Hospital, Boston, MA). Los ratones se mantuvieron en grupos de 3 a 5 en un ciclo de día y noche de 12 horas y se alimentaron con pienso para animales y agua a discreción. Los ratones SCID se anestesiaron por inhalación de isoflurano, la piel del lomo se rasuró y se limpió con etanol y se inyectó una suspensión de $2,5 \times 10^6$ células BxPC-3 o HT1080 en 0,2 ml de DMEM por vía subcutánea en la línea media proximal. Se sacrificaron ratones C57Bl6/J con carcinomas de pulmón de Lewis de volúmenes de 0,6 - 1,2 cm³ y la piel de recubrimiento del tumor se limpió con betadine y etanol. El tejido tumoral se extirpó en condiciones asépticas y se realizó una suspensión de células tumorales en solución salina del 0,9% haciendo pasar el tejido tumoral a través de un tamiz y de una serie de agujas hipodérmicas secuencialmente más pequeñas de calibre 22 a 30. Los ratones C57Bl6/J se anestesiaron y se prepararon como se ha indicado para los ratones SCID y se inyectó una suspensión de células de carcinoma de pulmón de Lewis en 0,2 ml de solución salina por vía subcutánea en la línea media proximal. Se permitió la estabilización de los tumores y que crecieran hasta un tamaño de ~0,1 cm³ después de lo cual se dividieron aleatoriamente en dos grupos. Los tumores se midieron en dos diámetros y se calculó el volumen de tumor usando la relación volumen tumoral = $a \times b^2 \times 0,52$, en la que a es el diámetro más largo y b el diámetro más corto en cm. Los animales se trataron con cualquiera de GSAA o GSAO a dosis de 2 ó 10 mg por kg por día en 0,2 ml de PBS que contenía glicina 100 mM. Los compuestos se administraron por vía subcutánea en un sitio lejos del tumor. El volumen de tumor y el peso del animal se midieron cada 3 días. Los tumores se extirparon y se pesaron cuando los animales se sacrificaron.

El crecimiento de tumores primarios pancreáticos humanos en ratones inmunocomprometidos se suprimió notablemente por administración sistémica de GSAO. La administración subcutánea de 2 mg de GSAO por kg por día provocó una inhibición de ~70% de la velocidad de crecimiento tumoral de BxPC-3 (Figura 23A) mientras la administración de 10 mg de GSAO por kg por día provocaba un >90% de inhibición de la velocidad de crecimiento de tumor (Figura 23B y C). La administración de 2 mg por kg por día de GSAA no tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento tumoral de BxPC-3 mientras que la administración de 10 mg de GSAA por kg por día dio como resultado una pequeña inhibición en la velocidad de crecimiento tumoral (< 20%) cuando se comparó con la administración de vehículo solo (no mostrado).

No hubo efectos secundarios adversos evidentes de la administración de cualquiera de GSAO o GSAA a los ratones. Los pesos promedio de los ratones de los grupos de tratamientos con GSAA y GSAO durante el transcurso de los experimentos fueron los mismos a ambas dosis (Figura 24). Al terminar el experimento descrito en la Figura 23B, se examinaron los ratones de ambos grupos de tratamiento. No había diferencias macroscópicas evidentes entre los ratones tratados con GSAA o GSAO y los no tratados. El corazón, pulmones, hígado, riñones y bazo de los ratones tratados con GSAA o GSAO y no tratados se fijaron en formaldehído, se incluyeron en parafina, se seccionaron, se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron por microscopía óptica. No hubo cambios morfológicos evidentes en ninguno de los órganos de los ratones tratados cuando se comparó con los órganos de los ratones no tratados (no mostrados).

La administración sistémica de GSAO también suprimió el crecimiento de tumores primarios de fibrosarcoma humano en ratones inmunocomprometidos y tumores primarios de pulmón de Lewis murino en ratones inmunocompetentes. La administración subcutánea de 10 mg de GSAO por kg por día provocó una inhibición de ~70% de la velocidad de crecimiento de fibrosarcoma (Figura 25A) y pulmón de Lewis (Figura 25B). La administración de 10 mg de GSAA por kg por día no tuvo efecto sobre la velocidad de crecimiento de tumor de pulmón de Lewis en ratones C57Bl6/J cuando se comparó con la administración de vehículo en solitario (no mostrado).

Ejemplo 3(g)**Inhibición por GSAO de angiogénesis en tumores pancreáticos humanos**

5 Los tumores mostrados en la Figura 23C se fijaron en formaldehído tamponado recién preparado (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), se incluyeron en parafina, se cortaron secciones de 5 µm de espesor y se colocaron en portaobjetos de vidrio. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina o para CD31, PCNA o ADN fragmentado (TUNEL). Los cortes se incubaron durante una noche a 4°C con una dilución 1:250 de anticuerpo anti-CD-31 de ratón (PharMingen, San Diego, CA) seguido de una dilución 1:200 de anticuerpo secundario de anti-rata biotinilado (Vestor, Burlingame, CA). La tinción se potenció por amplificación con tiramida (New England Nuclear, Boston, MA). La tinción para PCNA se realizó como describen Holmgren et al. (1995) mientras que el marcaje de ADN fragmentado mediante ensayo TUNEL se realizó de acuerdo con Gavrielli et al. (1992).

15 La densidad vascular se determinó seleccionando 3 tumores, incluyendo el más pequeño y el más grande, de los grupos de control y tratamiento. Los microvasos se contaron y su densidad se graduó en las áreas de neovascularización más activas (Weidner et al., 1991). Los cortes se examinaron con un aumento de 100x para encontrar las áreas de neovascularización más activas y se contaron tres campos diferentes con un aumento de 400x para el número de microvasos. El mayor de los tres recuentos era el valor tomado y se examinaron dos cortes de cada tumor. El índice proliferativo se calculó por el porcentaje de células clasificadas con un aumento de 400x (Holmgren et al., 1995). En dos cortes distintos, se contó un mínimo de 1000 células. El índice apoptótico se calculó mediante el porcentaje de células puntuadas con un aumento de 400x. En dos cortes distintos, se contó un mínimo de 1500 células (Holmgren et al., 1995).

25 No hubo indicios macroscópicos ni microscópicos de necrosis de ninguno de los tumores tratados con GSAA o GSAO (no mostrado). El análisis inmunohistoquímico de los tumores indicó una reducción marcada en angiogénesis en los tumores tratados con GSAO ($p < 0,001$) (Figura 26A) y un aumento en el índice apoptótico de las células tumorales ($p = 0,05$) (Figura 26C). Los índices proliferativos de los tumores tratados con GSAA y GSAO fueron iguales (Figura 26B).

Ejemplo 3(h)**Inhibición del crecimiento tumoral de carcinoma pancreático humano por administración intraperitoneal continua de GSAO**

35 A ratones SCID que llevaban tumores humanos subcutáneos de carcinoma pancreático BcPC-3 se les implantaron bombas microosmóticas durante 14 días en la cavidad peritoneal. Las bombas administraban 10 mg por kg por día de GSAA o GSAO y se sustituyeron después de 14 días por bombas nuevas. La velocidad de crecimiento de los tumores de BxPC-3 se inhibió en los ratones que recibieron GSAO (Figura 27). El crecimiento tumoral disminuyó en un ratón en un 50% y se detuvo completamente en otros dos ratones. Cuando la segunda bomba se agotó uno de los tumores detenidos comenzó a crecer aproximadamente a la misma velocidad que el tumor tratado con GSAA mientras que el otro tumor se había resuelto completamente. No hubo ningún efecto significativo sobre la velocidad de crecimiento tumoral de BxPC-3 en ratones que recibían GSAA.

Ejemplo 3(i)**Inhibición del crecimiento de carcinoma pancreático humano y de tumor de pulmón de Lewis murino por administración oral de GSAO**

50 Ratones SCID que llevaban tumores humanos subcutáneos de carcinoma pancreático o ratones C57Bl6/J que llevaban tumores subcutáneos de pulmón de Lewis murino, se alimentaron con ~10 mg por kg por día de GSAO o GSAA en su agua. El crecimiento de los tumores pancreáticos se detuvo cuando los ratones comenzaron a beber el agua con GSAO, mientras que la velocidad de crecimiento del tumor de pulmón de Lewis se redujo en ~50% (Figura 28). GSAA en el agua no tenía un efecto significativo sobre el crecimiento de ningún tumor.

Ejemplo 3(j)**Uso de GSAO como un agente de formación de imágenes de tumores**

60 En ratones con tumores, se midió la distribución *in vivo* de GSAO marcada de manera fluorescente (Figura 29A). Se estabilizaron carcinomas de pulmón de Lewis por vía subcutánea en la línea media proximal de ratones C57Bl6/J hembra de 7 a 9 semanas de edad como se ha descrito anteriormente. Se inyectó GSAO-Cy5.5 (0,1 ml; 15 nmoles por ratón) por vía subcutánea en un sitio lejano del tumor. Se formaron imágenes de los ratones 24 horas después por excitación con luz a 610-650 nm y midiendo la emisión de fluorescencia a 700 nm (Weissleder et al., 1999).

65 Hubo una acumulación notable de GSAO-Cy5.5 en el tumor (Figura 29B). Cabe destacar, que no hubo acumulación

evidente de GSAO-Cy5.5 en ningún otro lugar en el ratón (no mostrado).

Ejemplo 4

5 Efecto de GSAO sobre la infección por VIH

Ejemplo 4(a)

10 Marcaje de la superficie de células CD4 con MPB

10 Se incubaron células CEM-T4 obtenidas del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MA. CEM-T4 (1 ml de 5×10^6 por ml en solución salina equilibrada de Hanks) con cualquiera de sulfosuccinimidobiotina (SSB), 3-(N-maleimidilpropionil)biotina (MPB) o GSAO-B (100 μ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente. SSB procedía de Pierce, Rockford, IL mientras que MPB procedía de Molecular Probes, Eugene, OR. El SSB que no reaccionó se inactivó con glicina (200 μ M), mientras que el MPB que no reaccionó se inactivó con glutatión reducido (GSH, 200 μ M) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se lavaron dos veces con PBS y se sometieron a ultrasonidos en 1 ml de Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 1% (v/v), leupeptina 10 μ M, aprotinina 10 μ M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, EDTA 5 mM, tampón a pH 8,0 a 4°C. Se incubaron perlas de estreptavidina-agarosa (25 μ l de perlas empaquetadas) con los lisados celulares durante 1 hora a 4°C en una rueda rotatoria para aislar las proteínas marcadas con biotina. Las perlas de estreptavidina-agarosa se lavaron 5 veces con Tris HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, Triton X-100 0,05%, tampón pH 8,0. Las proteínas marcadas con biotina se eliminaron de las perlas por ebullición en 50 μ l de tampón SDS-Laemmli durante 2 minutos, se resolvieron en SDS-PAGE al 10%, se transfirieron a una membrana PVDF y se realizó transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal CD4, Leu3a (Becton, Dickinson, Bedford, MA). En una ocasión el MPB se pre-bloqueó con GSH antes de la incubación con las células. En otra ocasión las células se marcaron con GSAO-B en presencia de DMP (400 μ M).

Se supuso que CD4 en la superficie de las células T contiene un enlace disulfuro rédox activo que es importante para la función CD4. Para ensayar esta hipótesis, la línea celular CD4⁺T, se marcó con cualquiera de sulfosuccinimidobiotina (SSB) o 3-(N-maleimidilpropionil)biotina (MPB). SSB marca aminas primarias mientras que MPB marca tioles libres, y ambos reactivos son impermeables a membrana. Las proteínas marcadas se recogieron sobre estreptavidina-agarosa, se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. CD4 marcado se detectó por transferencia con el anticuerpo monoclonal de CD4, Leu3a (Figura 30A). CD4 marcado con SSB es una medida de la superficie total de célula CD4, mientras que CD4 marcado con MPB es una medida de la superficie de célula CD4 reducida. El marcaje con MPB era específico para tior ya que el prebloqueo de MPB con glutatión reducido (GSH) eliminaba el marcaje. También se marcó CD4 en células T de sangre humana con MPB y se encontró que esta activación mitogénica de las células T aumentaba la fracción de la superficie de células CD4 que contenía un tior libre (no mostrado). Estas observaciones indican que la activación de células T cambia el estado rédox de CD4.

Del mismo modo, otro receptor de plegamiento de Ig, Thy-1, no estaba marcado con MPB en la línea celular TIB-47 (no mostrado). Adicionalmente, la albúmina de suero marcada con MPB, que contiene un tior libre, pero no las proteínas plasmáticas, plasminógeno y protrombina, que no contienen tioles libres (no mostrado).

45 Para demostrar la incorporación específica de MPB en CD4, se marcaron células T con MPB y el inmunoprecipitado CD4 con Leu3a. Las células CEM-T4 se marcaron con MPB como se ha descrito anteriormente, se incubaron con el anticuerpo monoclonal Leu3a (5 μ g/ml) durante 30 minutos, se lavaron tres veces y se sometieron a ultrasonidos en 1 ml de Tris HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, Triton X-100 al 1% (v/v), leupeptina 10 μ M, aprotinina 10 μ M, fluoruro de metilfenilsulfonilo 2 mM, EDTA 5 mM, tampón pH 8,0. El material insoluble en detergente se eliminó por centrifugación a 12000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se incubó con 1×10^7 Dynaperlas recubiertas con anti-IgG de ratón de cabra (Dyna, Carlton South, VIC) durante 60 minutos. Todas las incubaciones fueron a 4°C. Las perlas se lavaron y el CD4 unido se liberó llevando a ebullición las perlas en 50 μ l de tampón SDS-Laemmli durante 2 minutos. El CD4 se resolvió en SDS-PAGE al 10%, se transfirió a una membrana de PVDF y se transfirió con estreptavidina peroxidasa para detectar el marcador de biotina. El CD4 purificado se resolvió en SDS-PAGE, se transfirió a una membrana de PVDF y se transfirió con estreptavidina peroxidasa para detectar el marcador MPB (Figura 30B).

Ejemplo 4(b)

60 Reducción de la superficie de células CD4 con tiorredoxina

Los experimentos de marcaje mostrados en la Figura 30 demuestran que uno o más de los tres enlaces disulfuro en las superficie celular CD4 son rédox activos. La reducción/oxidación del enlace disulfuro en una proteína es normalmente muy específica y bastante lenta, a menos que esté catalizada. Se supuso que el estado de oxidación del enlace (o enlaces) disulfuro CD4 estaría controlado por una enzima secretada por células CD4+. La tiorredoxina

se secreta por linfocitos CD4+ T (Rosén et al., 1995). La incubación de células CEM-T4 con concentraciones en aumento de tiorredoxina dio como resultado el aumento del marcaje de CD4 con MPB (Figura 31A). Como un control, la incubación con un mutante de tiorredoxina inactivo no provocó el aumento del marcaje de MPB (Figura 31B). La incubación de células CEM-T4 con otra disulfuro reductasa, PDI, no dio como resultado un aumento del marcaje de CD4 con MPB (no mostrado).

Ejemplo 4(c)

Marcaje de la superficie de células CD4 con GSAO-B

La superficie de células T CD4 también incorporaba GSAO-B. Las células CEM-T4 se marcaron con GSAO-B, las proteínas marcadas se recogieron en estreptavidina agarosa, se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF. El CD4 marcado se detectó por transferencia con el anticuerpo monoclonal Leu3a (Figura 32). Este resultado indicaba que los dos tioles de la forma reducida CD4 estaban lo suficientemente próximos para formar complejo con el arsénico trivalente de GSAO.

Ejemplo 4(d)

Inhibición por GSAO de infección por VIH de células CD4+

Se expusieron células T humanas A3.01 a GSAO durante 30 minutos y después al virus HTLV_{III}B durante 2 horas después de lo cual las células se lavaron y después se cultivaron hasta durante 10 días. Las células HTLV_{III}B y A3.01 se obtuvieron del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MA. Las reservas de virus se prepararon y su título de infectividad se determinó usando células A3.01 y el ensayo de antígeno p24 (Coulter, Miami, FL). Las células A3.01 se cultivaron en medio RPMI que contenía suero de ternera fetal al 10%. Las células A3.01 se incubaron con GSAO (0-100 μ M), GSAA (100 μ M) o MPB (100 μ M) durante 30 minutos a 37°C en medio asérico. Los virus se añadieron a 50 TCID₅₀ por 10⁶ células durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron tres veces, se resuspendieron en 0,25 ml de medio completo sin o con GSAO o GSAO (10 μ M) y se incubaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las muestras se retiraron a diferentes puntos temporales y se ensayaron para el antígeno p24 usando el ensayo de antígeno Coulter VIH-1 p24 (Coulter, Miami, FL). Se añadió medio nuevo con o sin GSAO o GSAA (10 μ M) a los pocillos en los días de muestreo. Los números de células y viabilidad celular se determinaron a los tiempos especificados por tinción de células con azul de tripano y se contaron usando un hemacitómetro de Neubauer. La viabilidad celular se midió como un porcentaje de células vivas respecto a células totales.

GSAO inhibía la entrada de VIH_{III}B en la línea celular T, A3.01 (Figura 33A). El efecto semi-máximo de GSAO era -1 μ M (Figura 33B). GSAO no tuvo efecto sobre la proliferación celular o la viabilidad celular hasta una concentración de 100 μ M (Figura 33A). Además, GSAO a 10 μ M bloqueaba eficazmente la infección por VIH_{III}B de células A3.01 durante 11 días (Figura 34). GSAO tenía un pequeño efecto inhibitor sobre la proliferación celular y ningún efecto sobre la viabilidad celular (Figura 34).

GSAO inhibió también la infección de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por aislados de VIH primarios. Los aislados de VIH primarios, HN11, HN68 y HN70, procedían del Dr. Hassan Naif, Centre for Virus Research, Westmead Millennium Institute, NSW, Australia. Las PBMC se prepararon a partir de 400 ml de sangre citrada reciente por separación Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Upsalla, Suecia). La sangre se diluyó 1:2 con PBS, se dividió en fases en el Ficoll-Hypaque (35 ml de sangre sobre 15 ml de Ficoll-Hypaque) en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó a 400 g durante 20 minutos a 20°C. Las PBMC se recogieron y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos para eliminar las plaquetas, se resuspendieron a 2 x 10⁶ células por ml en RPMI que contenía suero de caballo al 20% (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 10 μ g por ml de fitohemaglutinina-M (PHA- M, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Alemania) y 50 U por ml de interleucina-2 (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó durante 2 días a CO₂ al 5% y 37°C. Se incubaron PBMC (1 x 10⁶ por ml) con GSAO o GSAA (10 μ M) durante 30 minutos a 37°C en medio asérico. El virus se añadió a 50 TCID₅₀ por 10⁶ células durante 2 horas a 37 °C. La células se lavaron tres veces, se resuspendieron en 0,25 ml de medio completo con GSAO o GSAA (10 μ M) y se incubaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos. Las muestras se retiraron en puntos temporales distintos y se ensayaron para el antígeno p24. Se añadió medio reciente con GSAO o GSAA (10 μ M) a los pocillos en los días de muestreo. GSAO bloqueó la infección de las PBMC por tres aislados diferentes de VIH primario durante 7 días (Figura 35). GSAO inhibió la proliferación de las PBMC después de 3 días de cultivo pero no tuvo efecto sobre la viabilidad celular después de 7 días (Figura 35).

Ejemplo 5 - Formulaciones Farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención pueden administrarse solos, aunque es preferible que se administren como una formulación farmacéutica. El ingrediente activo puede comprender, para administración tópica, del 0,001% al 10% y, más típicamente, del 1% al 5% en peso de la formulación, aunque comprende como mucho el 10% en peso.

De acuerdo con el mejor modo de realización de la invención proporcionado en este documento, las composiciones farmacéuticas preferidas específicas de la presente invención se describen a continuación. Lo siguiente debe considerarse como ejemplos meramente ilustrativos de formulaciones, y no como una limitación del alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 5(a) - Composición de crema tópica

Una composición típica, para administrar como una crema tópica, se describe a continuación:

10 GSAO 1,0 g
 Polawax GP 200 25,0 g
 Lanolina Anhidra 3,0 g
 Cera de abejas blanca 4,5 g
 15 Hidroxibenzoato de metilo 0,1 g
 Agua desionizada y esterilizada hasta 100,0 g

El polawax, la cera de abejas y la lanolina se calentaron juntos a 60°C, se añade una solución de hidroxibenzoato de metilo y la homogeneización se consigue usando agitación a alta velocidad. Se permite entonces que la temperatura caiga a 50°C. El compuesto de la presente invención, que en este ejemplo es GSAO, se añade después y se dispersa minuciosamente, y se permite que la composición se enfríe con agitación a baja velocidad.

Ejemplo 5(b) - Composición de loción tópica

25 Una composición típica, para administración como una loción tópica, se describe a continuación:

GSAO 1,2 g
 Monolaurato de sorbitano 0,8 g
 Polisorbato 20 0,7 g
 30 Alcohol cetosteárico 1,5 g
 Glicerina 7,0 g
 Hidroxibenzoato de metilo 0,4 g
 Agua Esterilizada aproximadamente hasta 100,00 ml

35 El hidroxibenzoato de metilo y la glicerina se disuelven en 70 ml de agua a 75°C. El monolaurato de sorbitano, polisorbato 20 y alcohol cetosteárico se funden juntos a 75°C y se añaden a la solución acuosa. La emulsión resultante se homogeneiza, se deja enfriar con agitación continua y el GSAO se añade como una suspensión en el agua restante. Toda la suspensión se agita hasta que se homogeneiza.

Ejemplo 5(c) - Composición de gotas para los ojos

Una composición típica, para administrar como una gota para los ojos, se describe a continuación:

45 GSAO 0,3 g
 Hidroxibenzoato de metilo 0,005 g
 Hidroxibenzoato de propilo 0,06 g
 Agua purificada aproximadamente hasta 100,00 ml.

50 Los hidroxibenzoatos de metilo y propilo se disuelven en 70 ml de agua purificada a 75°C y la solución resultante se deja enfriar. Después, se añade GSAO y la solución se esteriliza por filtración a través de un filtro de membrana (tamaño de poro 0,22 µm) y se empaqueta asépticamente en recipientes estériles.

Ejemplo 5(d) - Composición para administración por inhalación

55 Para un recipiente de tipo aerosol, con una capacidad de 20-30 ml: una mezcla de 10 mg de GSAO con 0,5-0,8% en peso de un agente lubricante, tal como polisorbato 85 o ácido oleico, se dispersa en un propulsor, tal como freón, y se pone en un recipiente de tipo aerosol apropiado para administración por inhalación intranasal u oral.

Ejemplo 5(e) - Composición para administración parenteral

60 Una composición farmacéutica de la presente invención para inyección intramuscular podía prepararse para que contuviera 1 ml de agua tamponada estéril y 1 mg de GSAO.

65 Análogamente, una composición farmacéutica para infusión intravenosa puede comprender 250 ml de solución de Ringer y 5 mg de GSAO.

Ejemplo 5(f) - Composición de cápsulas

5 Una composición farmacéutica de GSAO en forma de una cápsula puede prepararse llenando una cápsula de gelatina dura de dos piezas convencional con 50 mg de GSAO, en forma de polvo, 100 mg de lactosa, 35 mg de talco y 10 mg de estearato de magnesio.

Ejemplo 5(g) - Composición parenteral inyectable

10 Una composición farmacéutica de esta invención en una forma adecuada para administración por inyección puede prepararse mezclando un 1% en peso de GSAO en un 10% en volumen de propilenglicol y agua. La solución se esteriliza por filtración.

Ejemplo 5(h) - Composición de pomada

15 Una composición típica para administrar como una pomada incluye 1,0 g de GSAO, junto con parafina blanda blanca hasta 100,0 g, dispersada para producir un producto homogéneo suave.

Aplicabilidad industrial

20 La presente invención se refiere a compuestos sustancialmente impermeables a la membrana celular, que tienen la capacidad de inhibir las proteínas redox activas y a métodos para su síntesis. En particular, la invención se refiere a compuestos de organoarsénico trivalentes, sustancialmente impermeables a la membrana celular, y a métodos para su síntesis. La invención se refiere también a composiciones farmacéuticas y a métodos de tratamiento de trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, enfermedades de los vasos sanguíneos, trombosis, infecciones víricas y tumores hematológicos y sólidos.

25

Referencias

30 Adams E, Jeter D, Cordes AW, Kolis JW. 1990. Chemistry of organometalloid complexes with potential antidotes: structure of an organoarsenic(III) dithiolate ring. *Inorg Chem* 29:1500-1503. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalised human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683-690.

35 Ausbel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, D. "Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 29-Overview of Genetic Reporter Systems" John Wiley and Sons Inc., Nueva York, 2000

40 Doak GO, Freedman LD. 1970. In: Seyferth D, ed. *Organometallic compounds of Arsenic, Antimony, and Bismuth*. Nueva York, Nueva York: Wiley-Interscience.

45 Fleury SG, Croteau G, Sekaly RP. 1991. CD4 and CD8 recognition of class II and class I molecules of the major histocompatibility complex. *Semin Immunol* 3:177-185.

Folkman J. 1985. Angiogenesis and its inhibitors, in *Important Advances in Oncology*, eds: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S. 42-62 (J.B. Lippincott Company, Philadelphia).

Folkman J. 1995. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med* 1:27-30.

50 Folkman J, Haundenschild CC, Zetter BR. 1979. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:5217-5221.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119:493-501.

55 Gilbert HF. 1997. Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J Biol Chem* 272:29399-29402.

Hogg PJ, Stathakis P, Jiménez BM, Chesterman can. 1997. Interaction of platelet-derived growth factor with thrombospondin 1: Dependence on the disulfide-bond arrangement in thrombospondin 1. *Biochem J* 326:709-716.

60 Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-364.

Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264:13963-13966. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. 1995. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med* 1:149-153.

65

- Hotchkiss KA, Matthias LJ, Hogg PJ. 1998: Exposure of the cryptic Arg-Gly-Asp sequence in thrombospondin 1 by protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1388:478-488.
- 5 Huppa JB, Ploegh HL. 1998. The eS-Sence of-SH in the ER. *Cell* 92:145-148.
- Jauhiainen M, Stevenson KJ, Dolphin PJ. 1988. Human plasma lecithin-cholesterol acyltransferase. The vicinal nature of cysteine 31 and cysteine 184 in the catalytic site. *J Biol Chem* 263:6525-6533.
- 10 Jiang X-M, Fitzgerald M, Grant CM, Hogg PJ. 1999. Redox control of exofacial protein thiols/disulfides by protein disulfide isomerase. *J Biol Chem* 274:2416-2423.
- Knoch F, Schmachtel T, Ullrich V. 1995. Crystal structure of 4-amino-1-arsenoso-benzene dihydrate, H₂NC₆H₄As(OH)₂(H₂O). *Z Krist* 210:642. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- 15 Littman DR. 1998. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93:677-680.
- Metcalf D. 1977. Hemopoietic colonies: in vitro cloning of -normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res* 61:12-31.
- 20 Nakashima I, Pu M-Y, Nishizaki A, Rosila I, Ma L, Katano Y, Ohkusu K, Rahman SMJ, Isobe K-I, Hamaguchi M, Saga K. 1994. Redox mechanism as alternative to ligand binding for receptor activation delivering deregulated cellular signals. *J Immunol* 152:1064-1071.
- 25 Nguyen M, Shing Y, Folkman J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Res* 47:31-40.
- Oliver MH, Harrison NK, Bishop JE, Cole PJ, Laurent GJ. 1989. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J Cell Sci* 92:513-518.
- 30 Riddles PW, Blakeley RL, Zemer B. 1983. Reassessment of Ellman's reagent. *Methods Enzymol* 91:49-60.
- Risau W. 1997. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671 -674.
- 35 Rosén A, Lundman P, Carisson M, Bhavani K, Srinivasa BR, Kjellström G, Nilsson K, Holmgren A. 1995. A CD4+Tcell line-secreted factor, growth promoting for normal and leukemic B cells, identified as thioredoxin. *Int Immunol* 7:625-33.
- Stathakis P, Fitzgerald M, Matthias LJ, Chesterman CN, Hogg PJ. 1997. Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin: catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells. *J Biol Chem* 272: 20641-20645.
- 40 Stocken -LA., Thompson RHS. 1946. British Anti-Lewisite 2. Dithiol compounds as antidotes for arsenic. *Biochem J* 40:535-548.
- 45 Täger M, Kroning H, Thiel U, Ansofrage S. 1997. Membrane-bound protein disulfide isomerase (PDI) is involved in regulation of surface expression of thiols and drug sensitivity of B-CLL cells. *Exp Hematol* 25:601-607.
- Wall RT, Marker LA, Quadracci LJ, Striker GE. 1978. Factors influencing endothelial cell proliferation in vitro. *J Cell Physiol* 96: 203-213.
- 50 Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. 1991. Tumour angiogenesis and metastasis: correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324:1-8.
- Weissleder R, Tung C-H, Mahmood U, Bogdanov A Jr. 1999. In vivo imaging of tumours with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nature Biotech* 17:375-378.
- 55

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (I) o una sal del mismo:

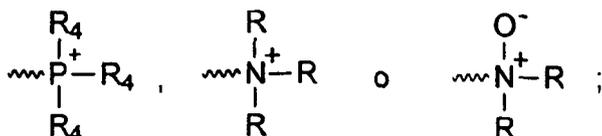


5

en la que

- 10 A se selecciona entre glutatión, glucosamina, cisteinilglicina, ácido cisteico, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina, y en la que el átomo de azufre de cada compuesto que contiene azufre puede estar opcionalmente oxidado para formar un sulfóxido o sulfona;
- Y comprende al menos un grupo arsenóxido representado por $-As=O$;
- p es un número entero seleccionado de 1 a 10;
- B se selecciona entre alquileo C_1-C_5 , arileno C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;
- 15 X' se selecciona entre $-O-$, $-S-$, $-NR-$, $-C(O)-$ y $-C(O)O-$, o está ausente;
- B' es alquileo C_1-C_5 , arileno C_6-C_{12} o está ausente; y
- R se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

20 en el que para cada caso de que B y/o B' sea arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido) pueden estar en una relación para, meta u orto, y en el que cada alquileo, arileno y acilo pueden estar sustituidos independientemente con hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , alquínilo C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquénilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a} , SR_6 , nitro, arsenóxido, $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)R_4R_4$, $-N(R'')_2$, $-NRC(O)(CH_2)_mQ$, $-C(O)R_5$,



- 25 en las que cada R se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} o acilo C_2-C_5 ;
- R_{2a} se selecciona entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)(R_4)_2$ o $-C(O)R_5$;
- 30 cada R_3 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 o ariltio C_6-C_{12} ;
- cada R_4 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , halo o $N(R)_2$;
- 35 cada R_5 se selecciona independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , OH, SH o $N(R)_2$;
- R_6 se selecciona entre alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , ariltio C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$ o $-C(O)R_5$;
- R'' es igual que R anterior;
- Q se selecciona entre halógeno y $-OS(O)_2Q_1$; en la que Q_1 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , perfluoralquilo C_1-C_4 , fenilo, p-metilfenilo; y
- m es de 1 a 5,

40 en el que la suma total de átomos de carbono en A y $[(XBX')_nB']$ juntos es mayor de 6.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A es glutatión.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

45

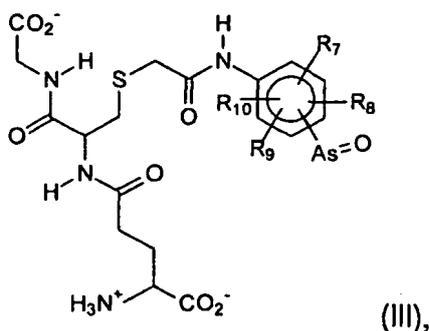
- B es acilo C_2-C_5 ;
- X' es NR;
- B' es fenileno; y
- R es H;

50

en el que los sustituyentes fijados directamente al anillo de arileno (incluyendo arsenóxido), están en una relación para-, meta- u orto-.

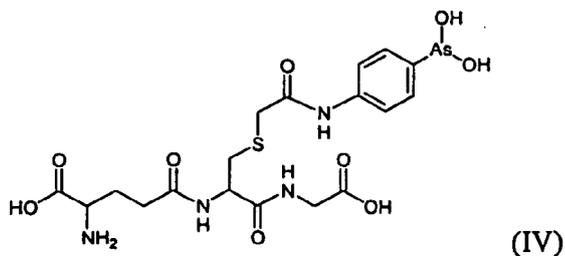
4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, representado por la Fórmula III:

55

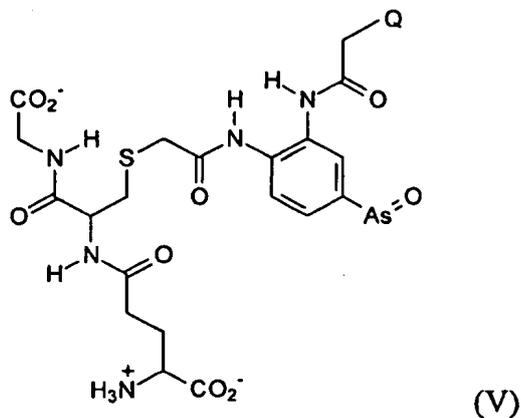


5 en la que R_7 a R_{10} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo C_1 - C_5 , arilo C_6 - C_{12} , halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C_1 - C_5 , $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}_3$ y $-\text{NHC}(\text{O})\text{CH}_2\text{Q}$ en la que Q es halógeno, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{CH}_3$, $-\text{OS}(\text{O})_2\text{C}_6\text{H}_5$ o $-\text{OS}(\text{O})_2$ -*p* toliolo.

5. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto es 4-(N-(S-glutathionilacetil)amino) fenilarsenóxido (GSAO) y está representado por la Fórmula IV:

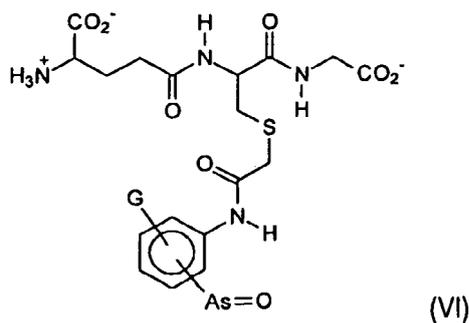


10 6. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicación 1 a 3, en el que el compuesto está representado por la Fórmula V:



15 en la que Q es cualquier halógeno.

20 7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto está representado por la Fórmula VI:



en la que G se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, alquilo C₁-C₅ y arilo C₆-C₁₂ y -NHC(O)CH₂Q, en la que Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ o -OS(O)₂-p toliolo.

- 5
8. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está unido a un grupo detector.
9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho grupo detector se selecciona entre un fluoróforo, biotina, un radionúclido, fluoresceína y un grupo que comprende un elemento de transición.
- 10
10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el radionúclido se selecciona entre ³H, ¹⁴C, ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁰⁵Rh, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re y ^{99m}Tc.
- 15
11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o sal, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un vehículo, adyuvante y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
12. Un compuesto, o sal, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicación 1 a 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular.
- 20
13. Un compuesto, o sal, para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en el que la enfermedad se selecciona entre enfermedades dependientes de angiogénesis, trastornos inflamatorios y/o enfermedades autoinmunes, enfermedad vascular y trombosis, infección vírica y cáncer.
- 25
14. Un compuesto, o sal, como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en la inhibición de la angiogénesis.
- 30
15. Uso de un compuesto o sal como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular, o para el uso en la inhibición de la angiogénesis.

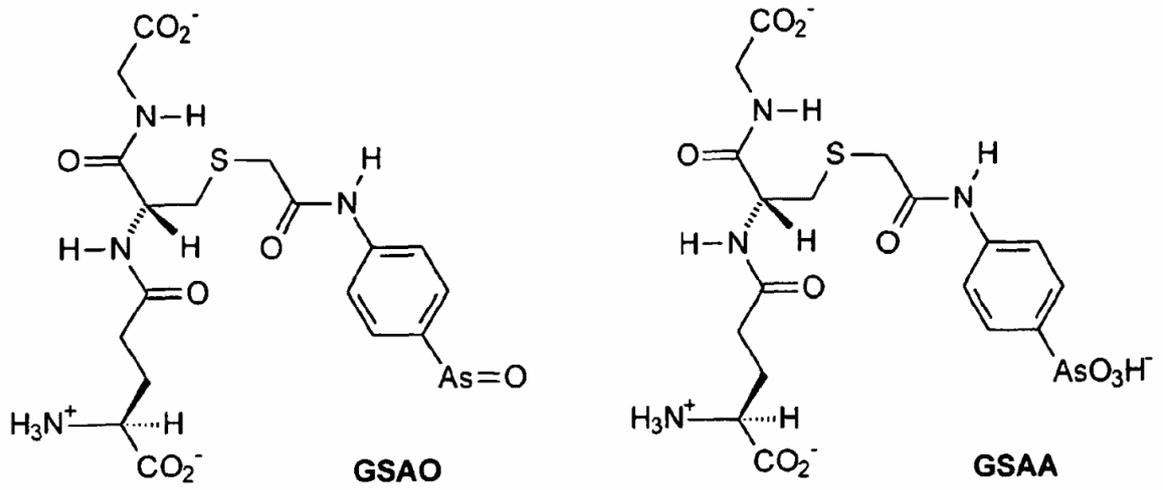


FIGURA 1

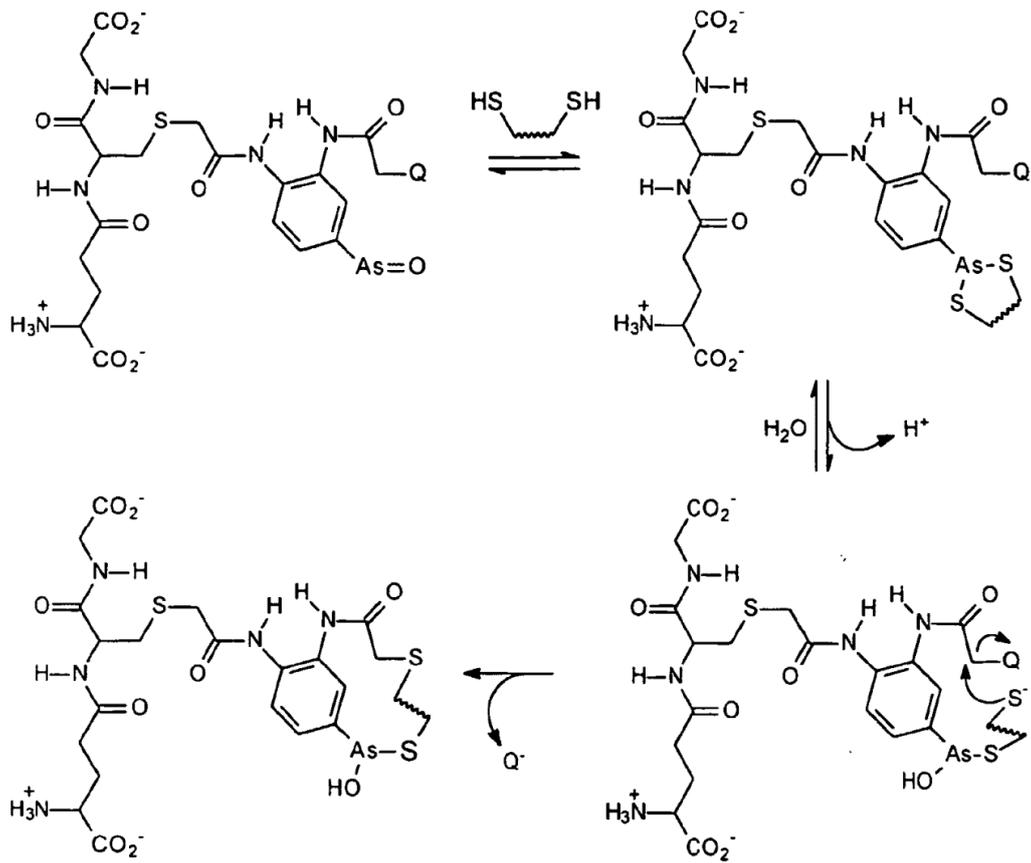


FIGURA 2

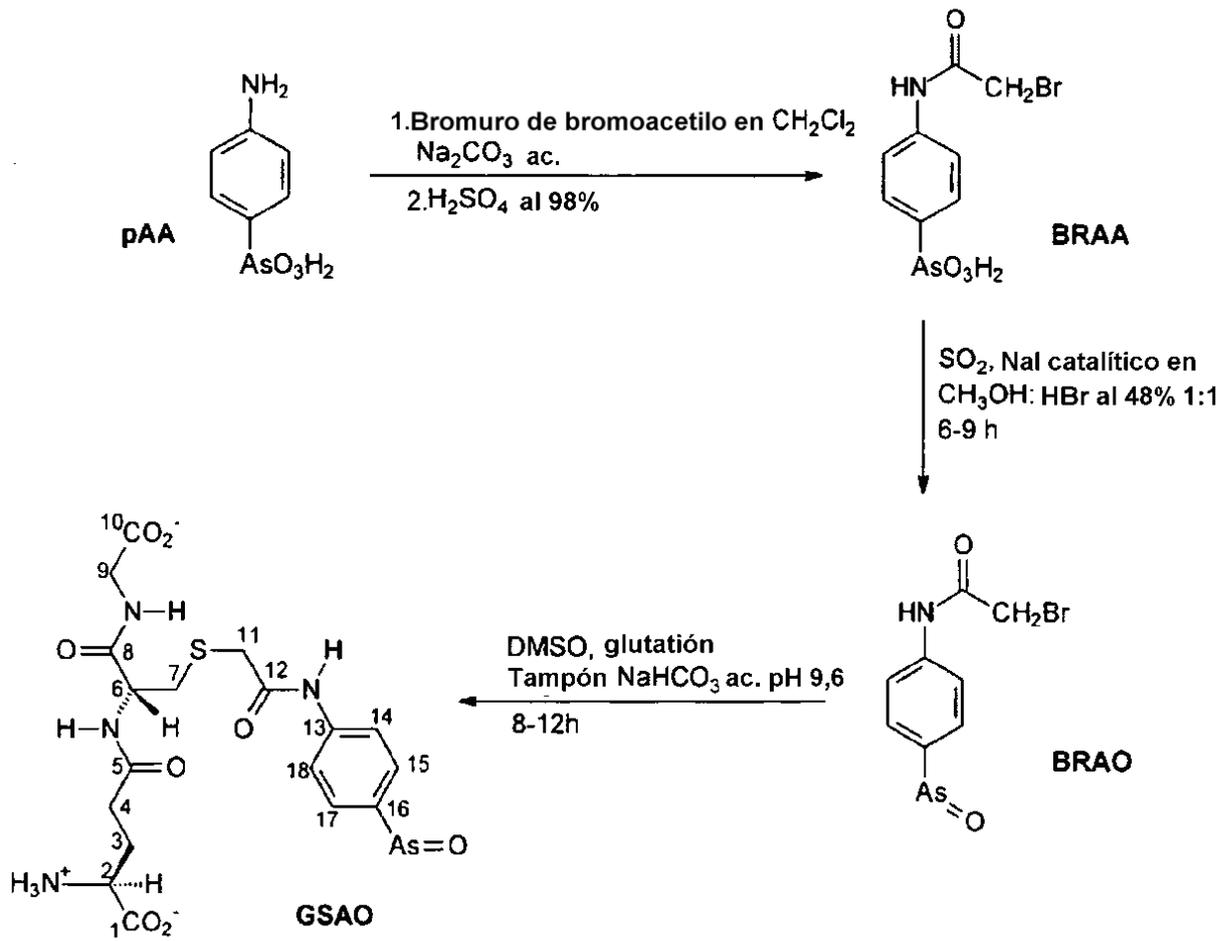


FIGURA 3

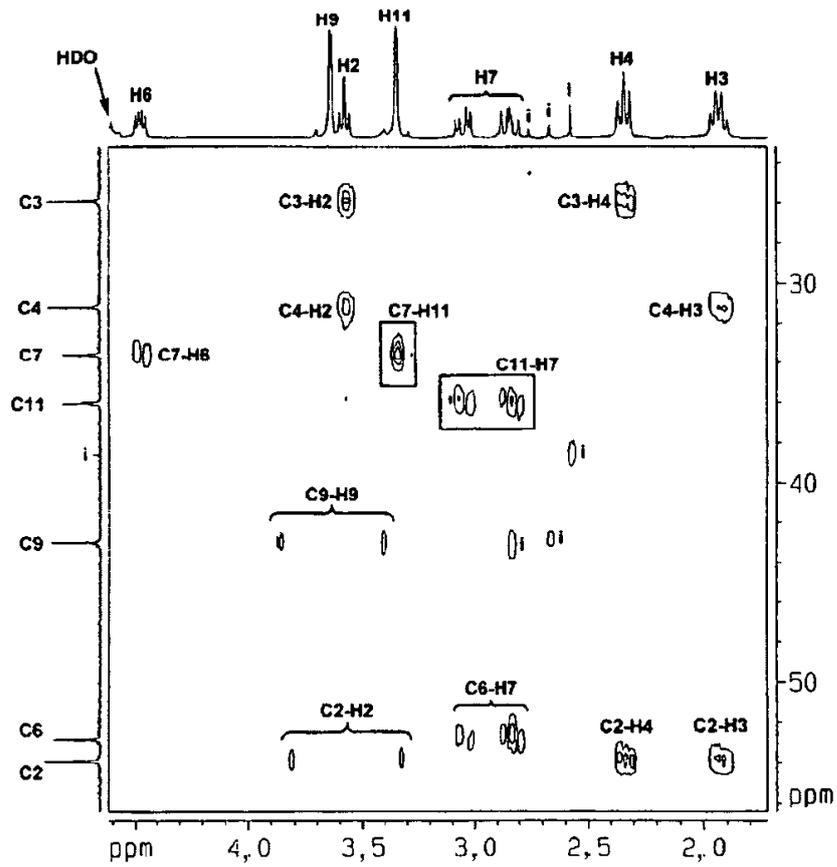


FIGURA 4

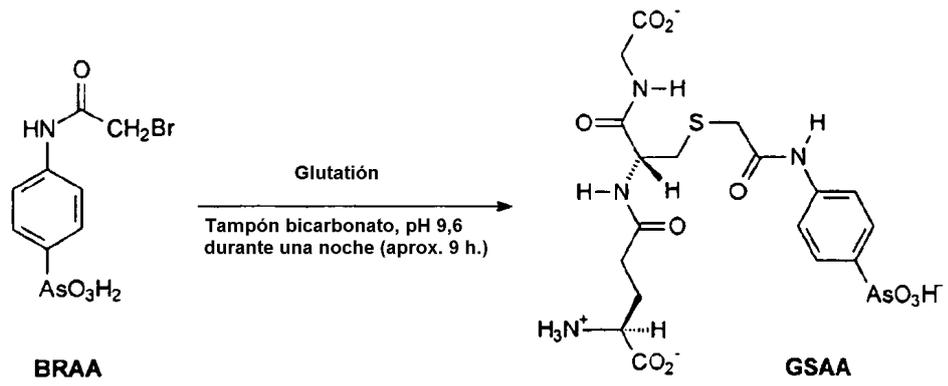


FIGURA 5

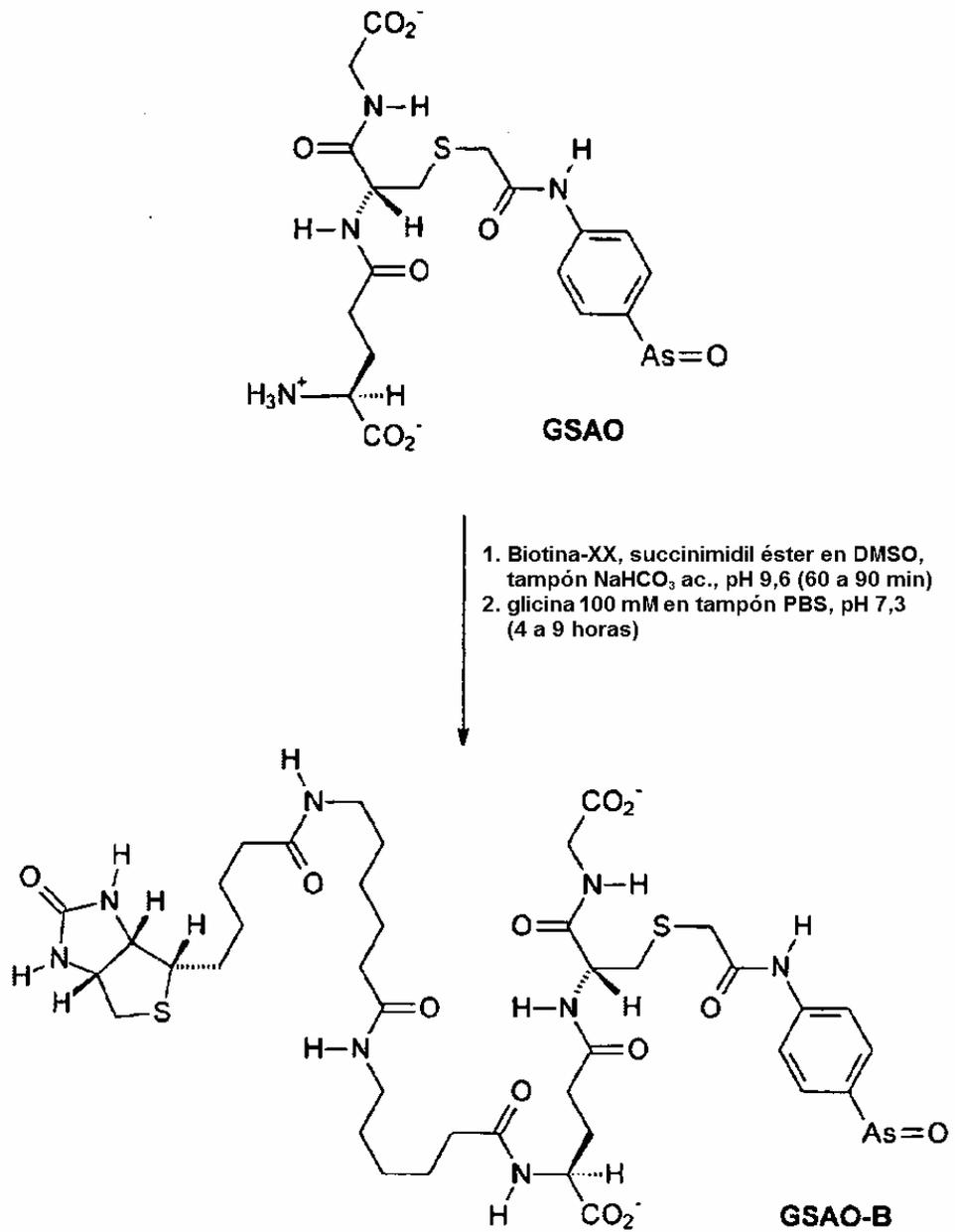
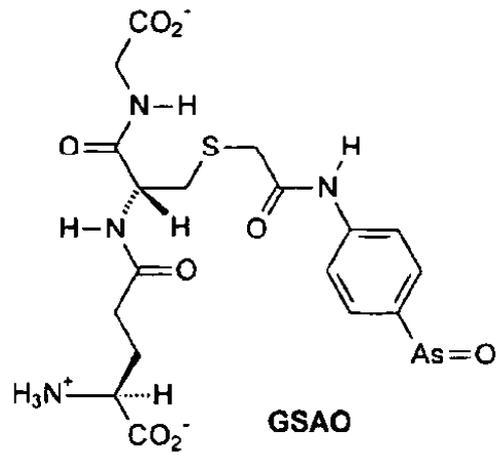


FIGURA 6



1. Fluoresceína-EX, succinimidil éster en DMSO, tampón NaHCO₃ ac., pH 9,6 (60 a 90 min)
2. glicina 100 mM en tampón PBS, pH 7,3 (4 a 9 horas)

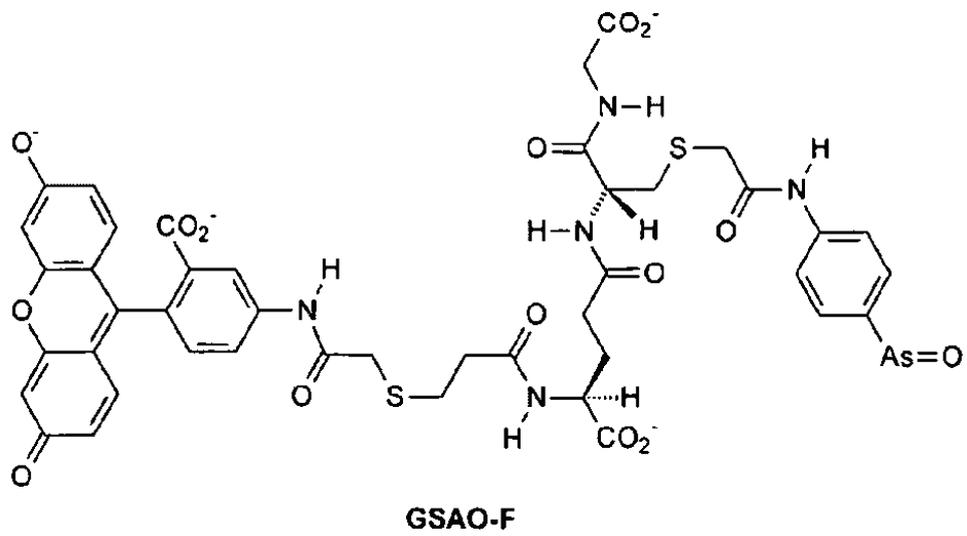


FIGURA 7

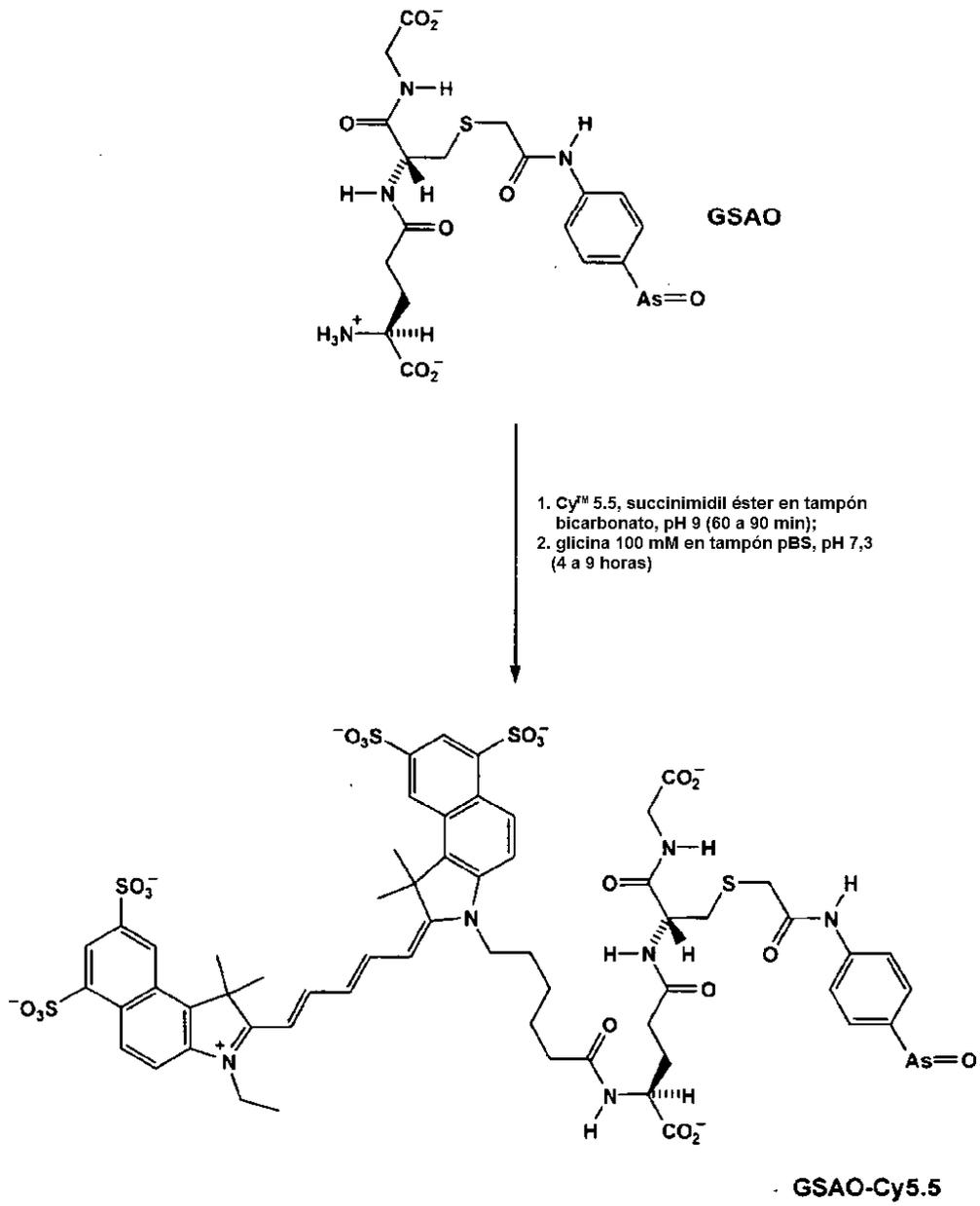


FIGURA 8

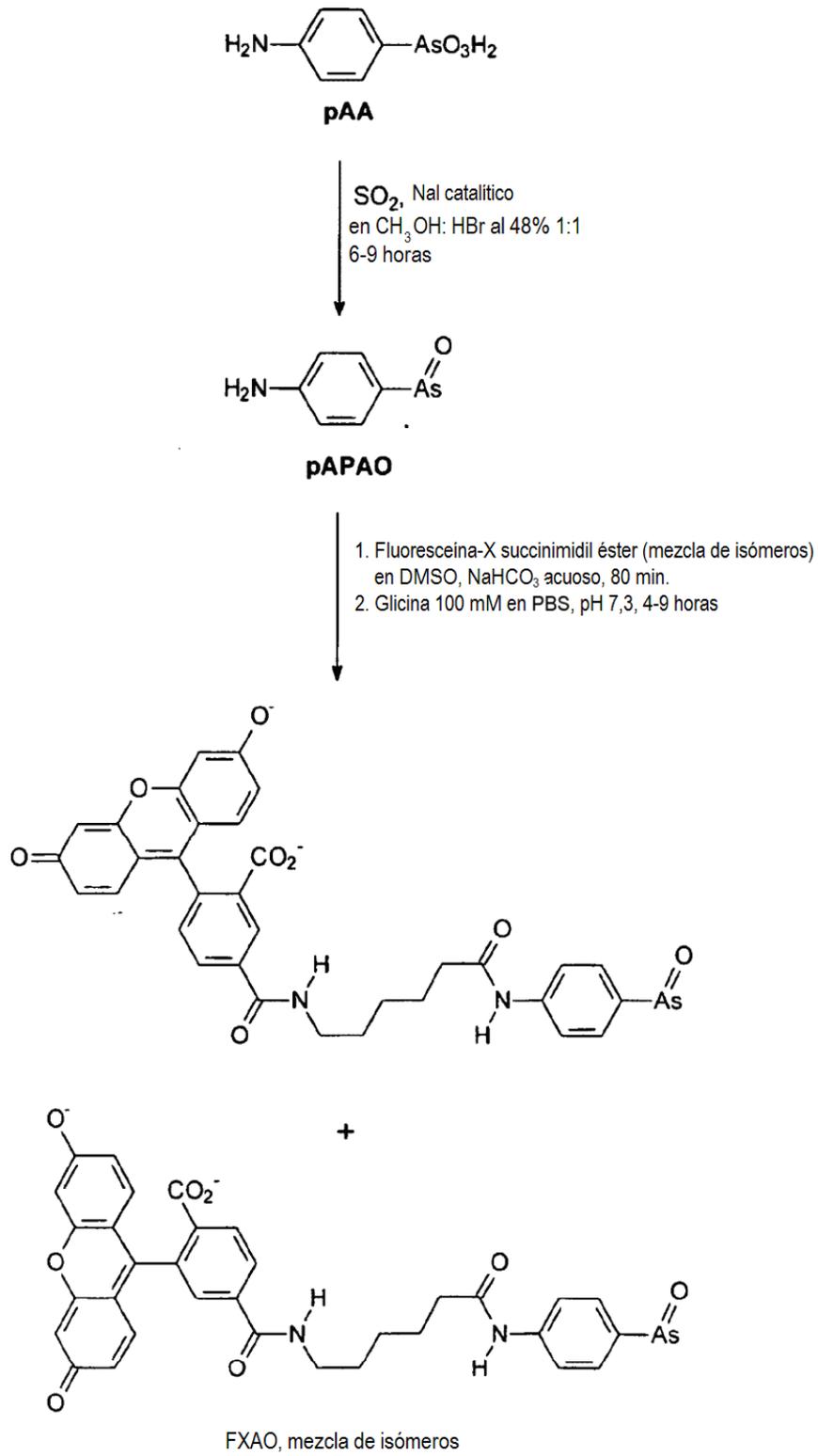


FIGURA 9

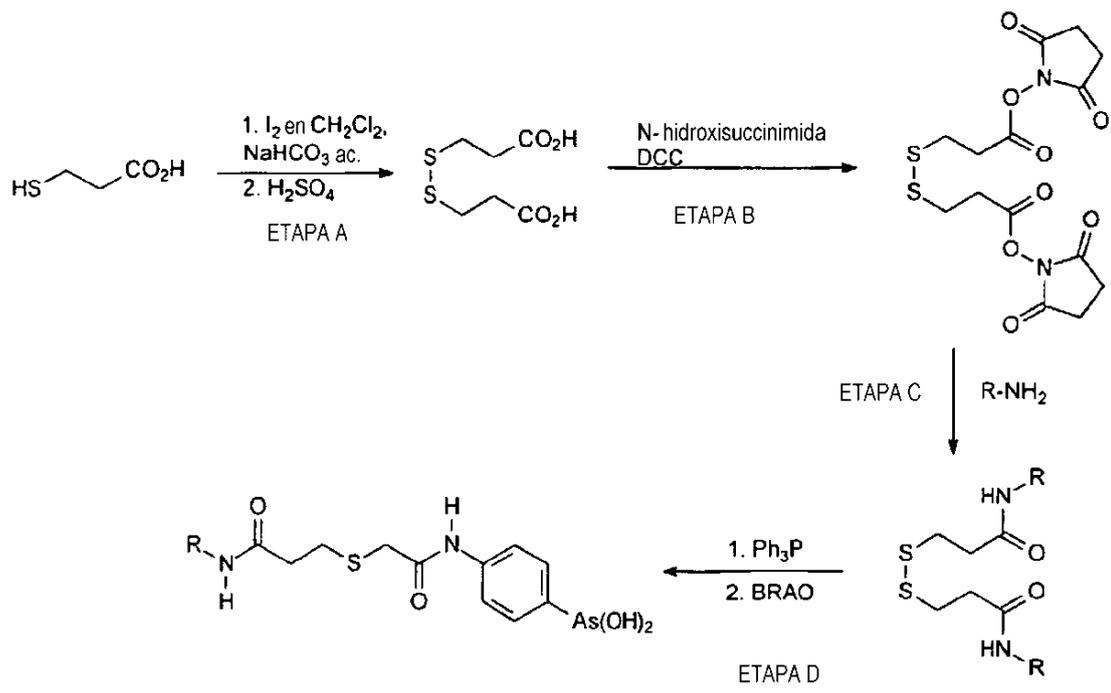


FIGURA 10

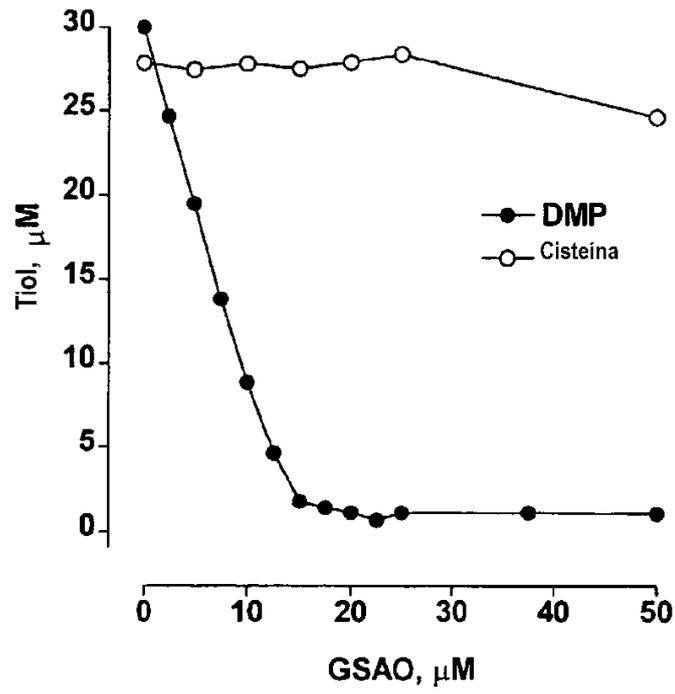


FIGURA 11

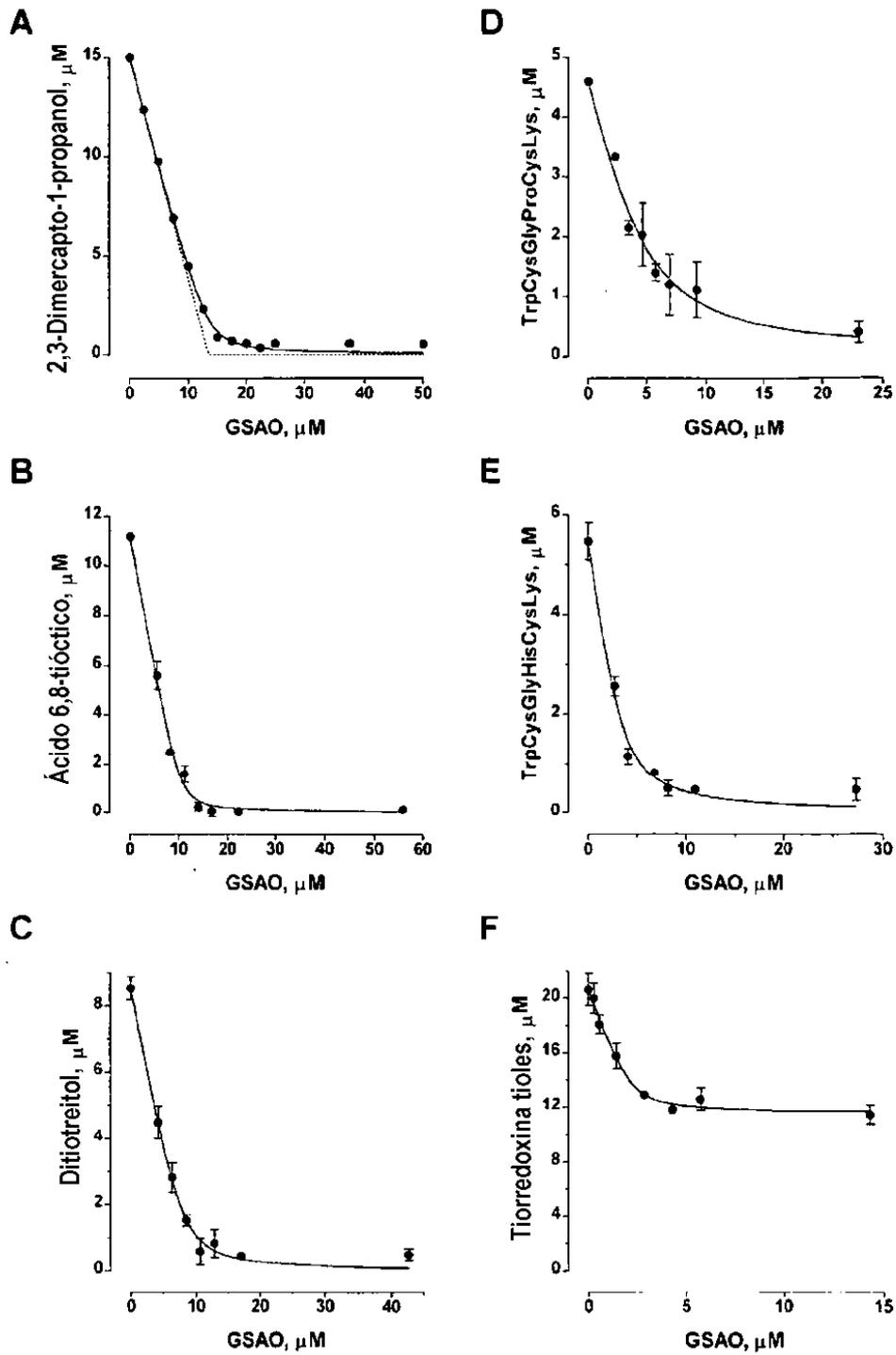


FIGURA 12

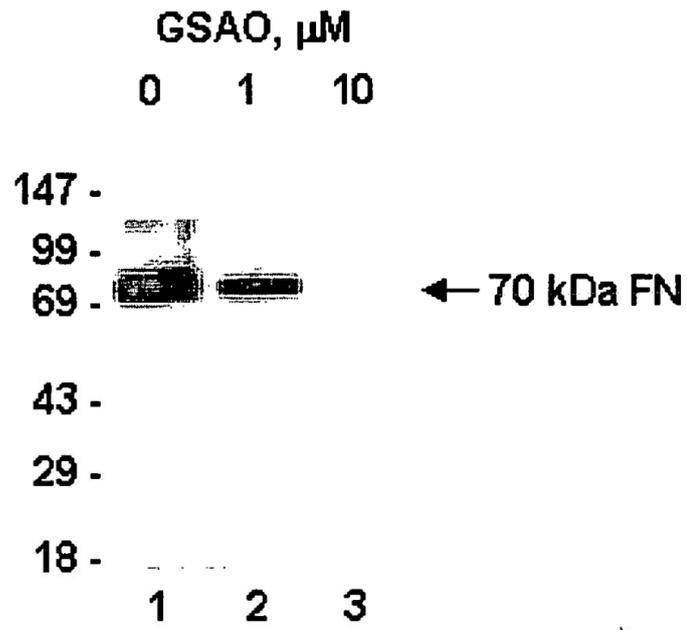


FIGURA 13

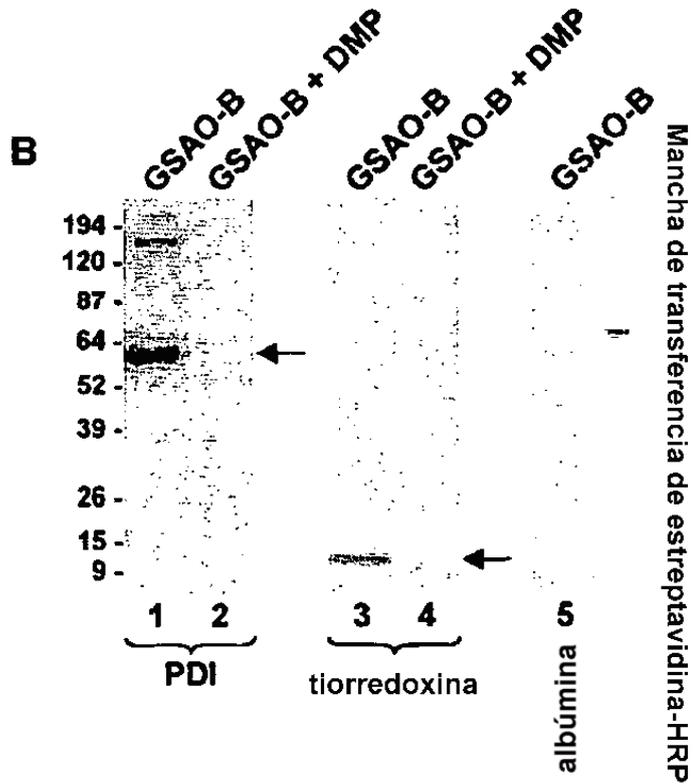
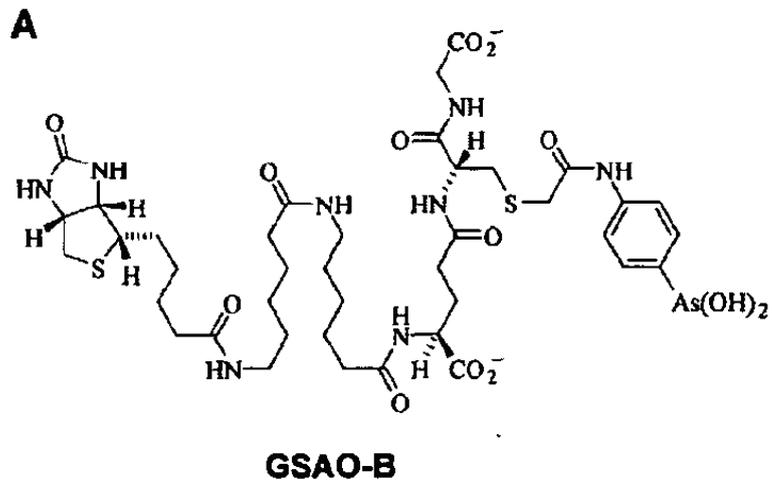


FIGURA 14

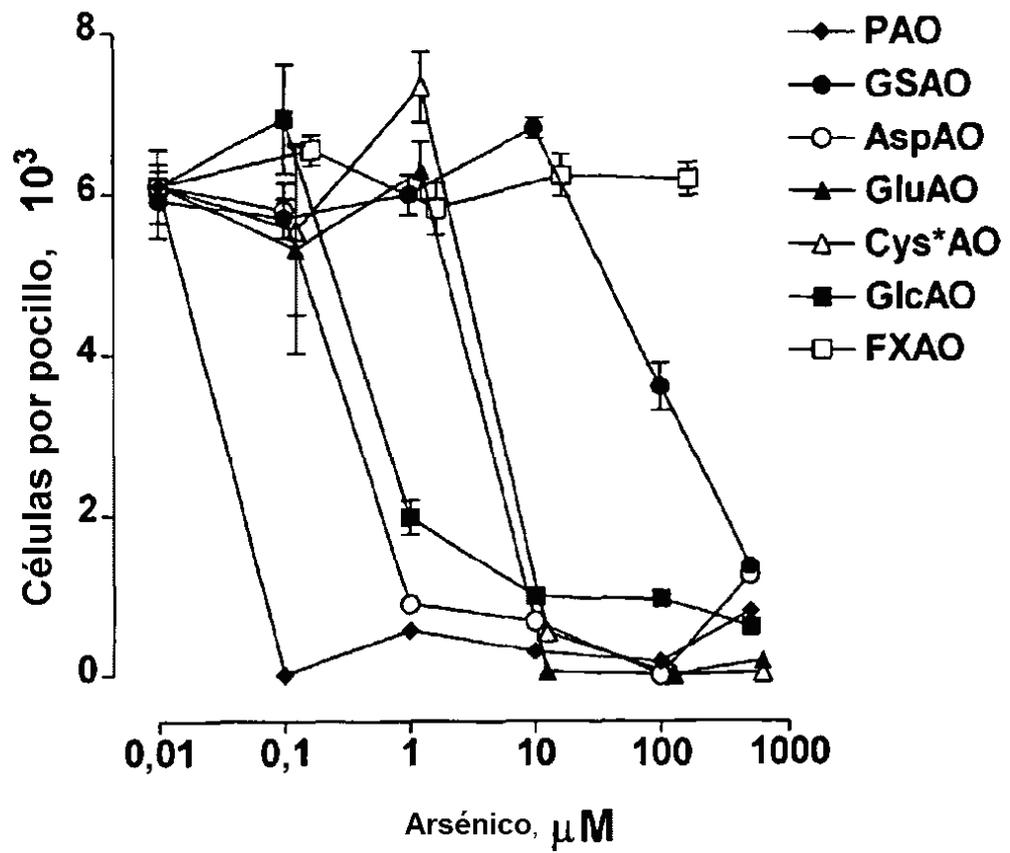


FIGURA 15

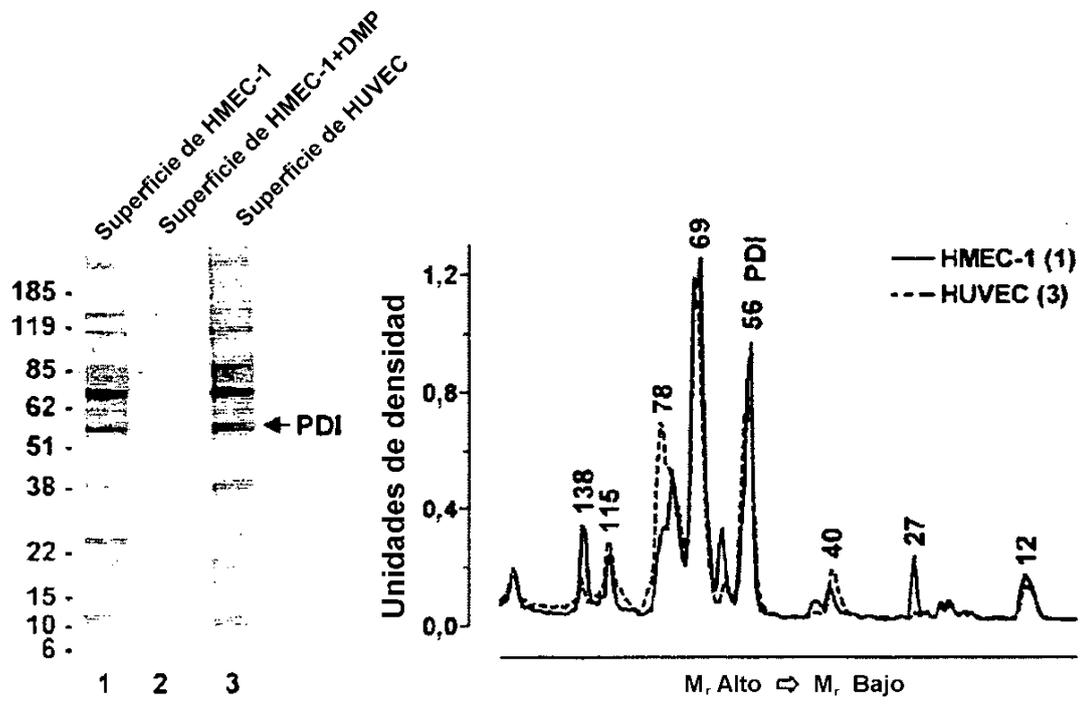


FIGURA 16

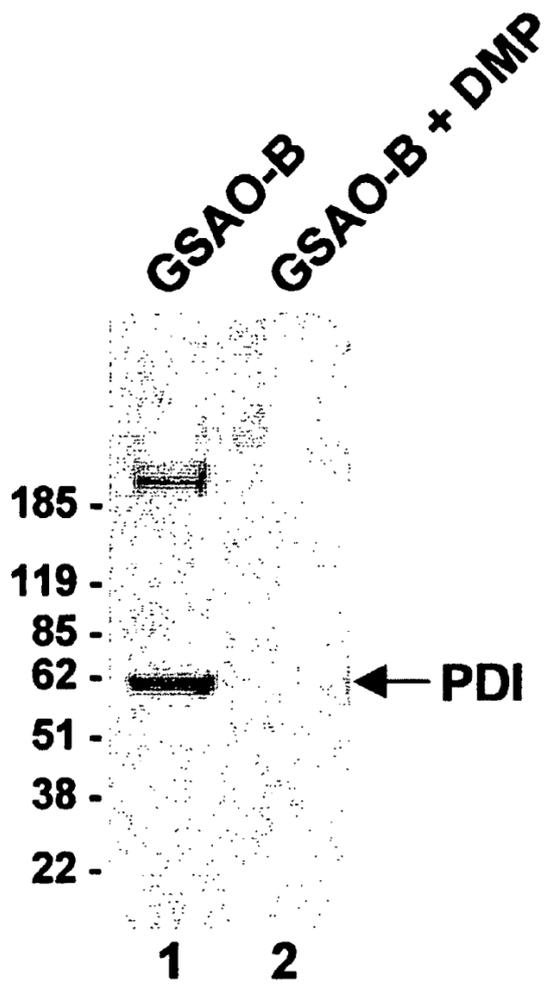


FIGURA 17

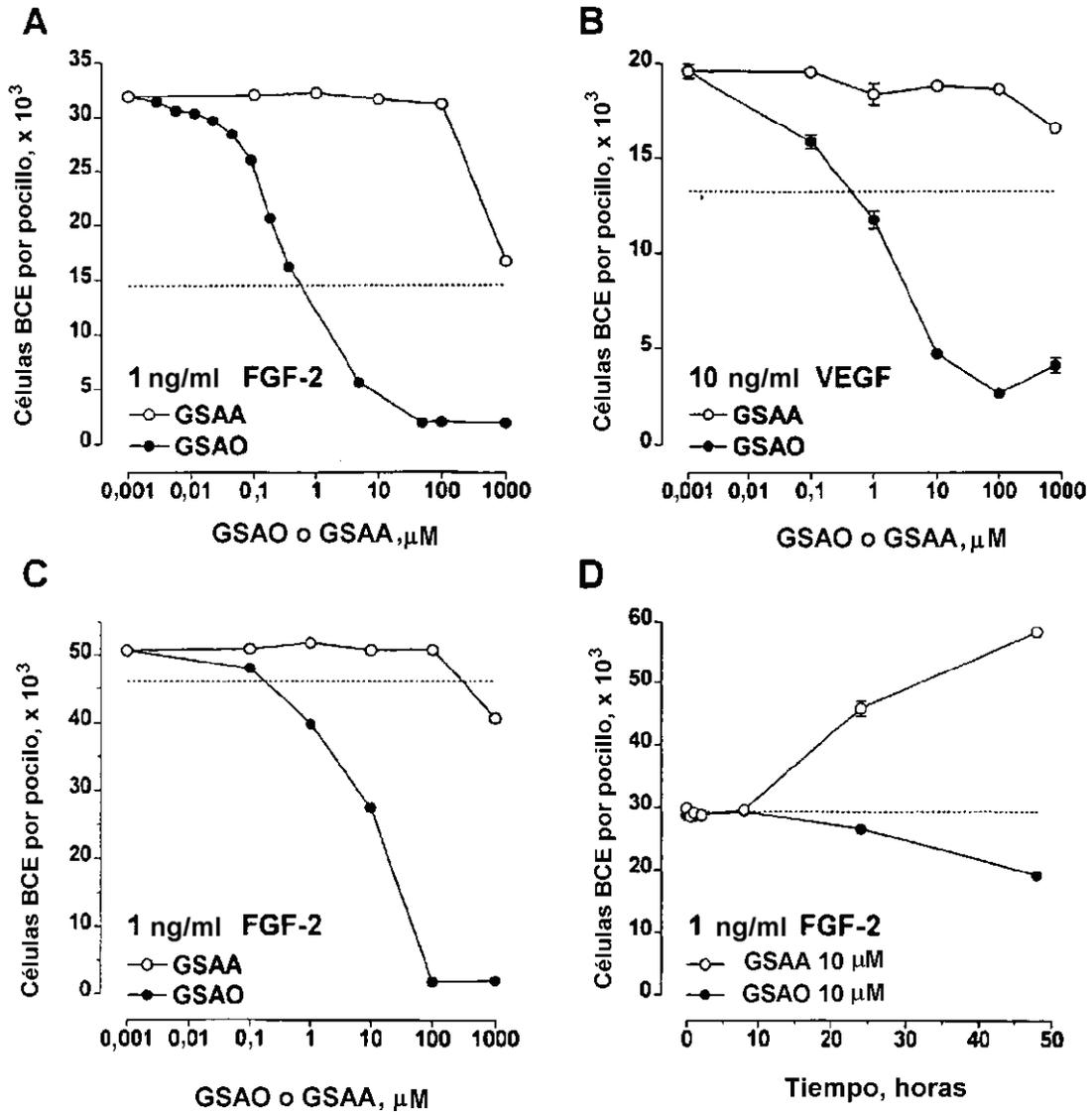


FIGURA 18

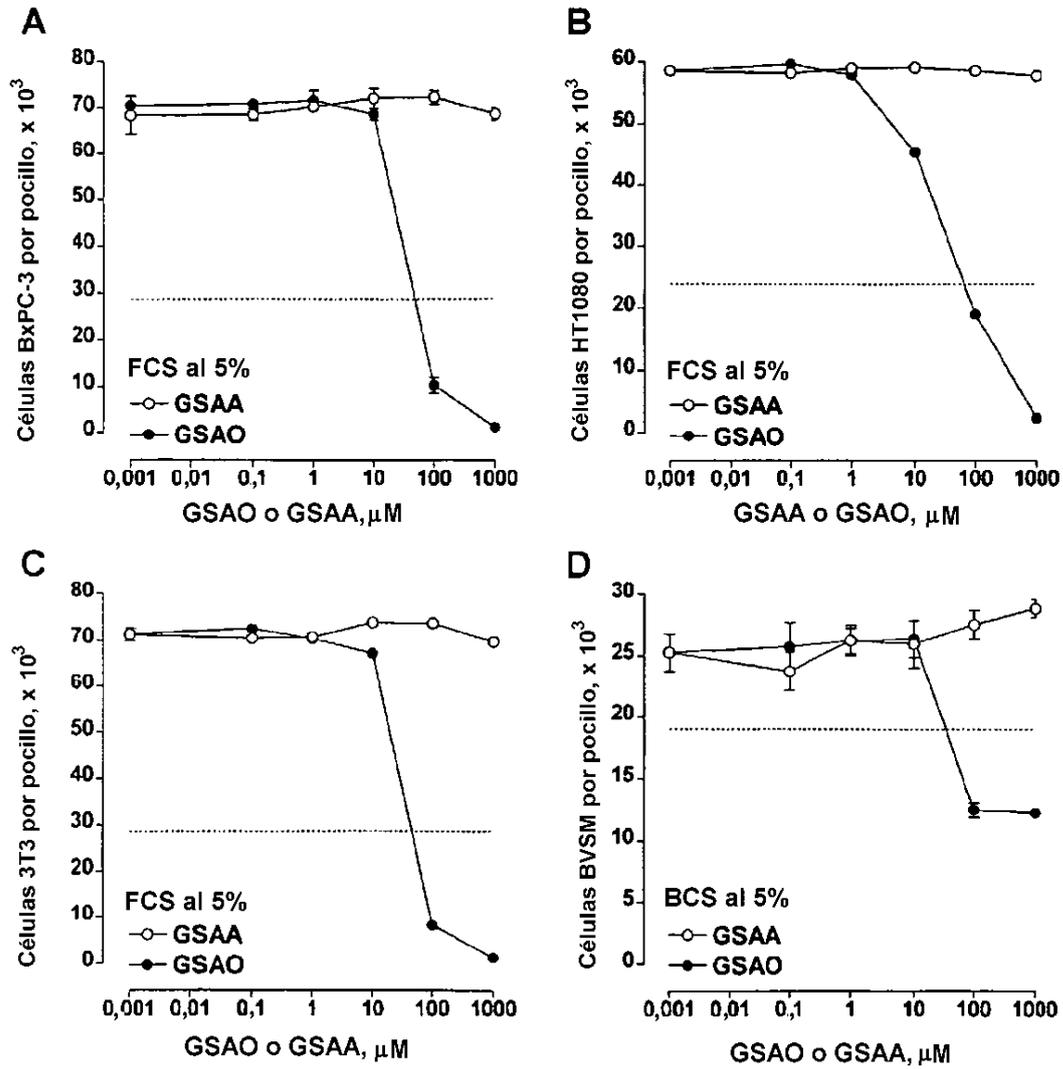


FIGURA 19

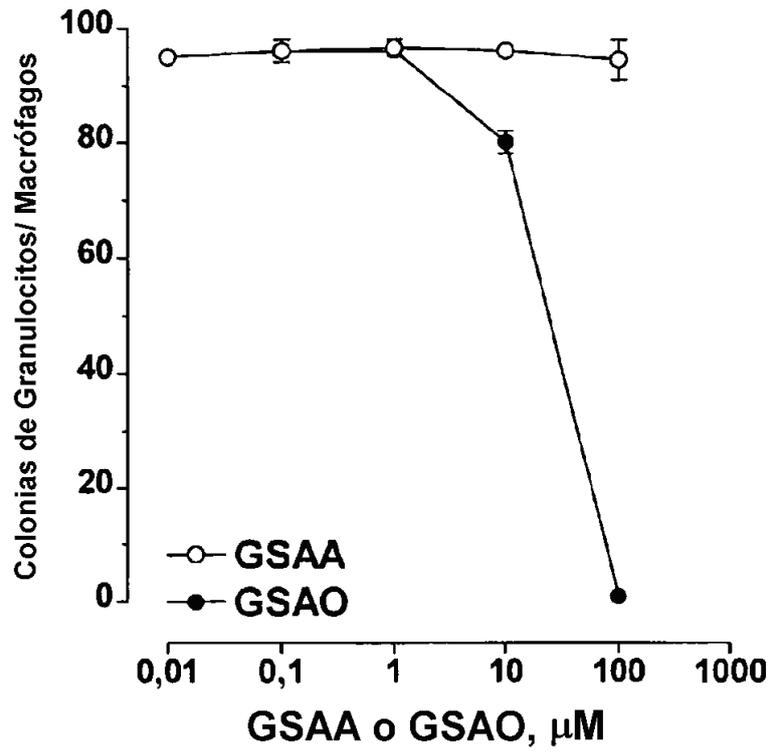


FIGURA 20

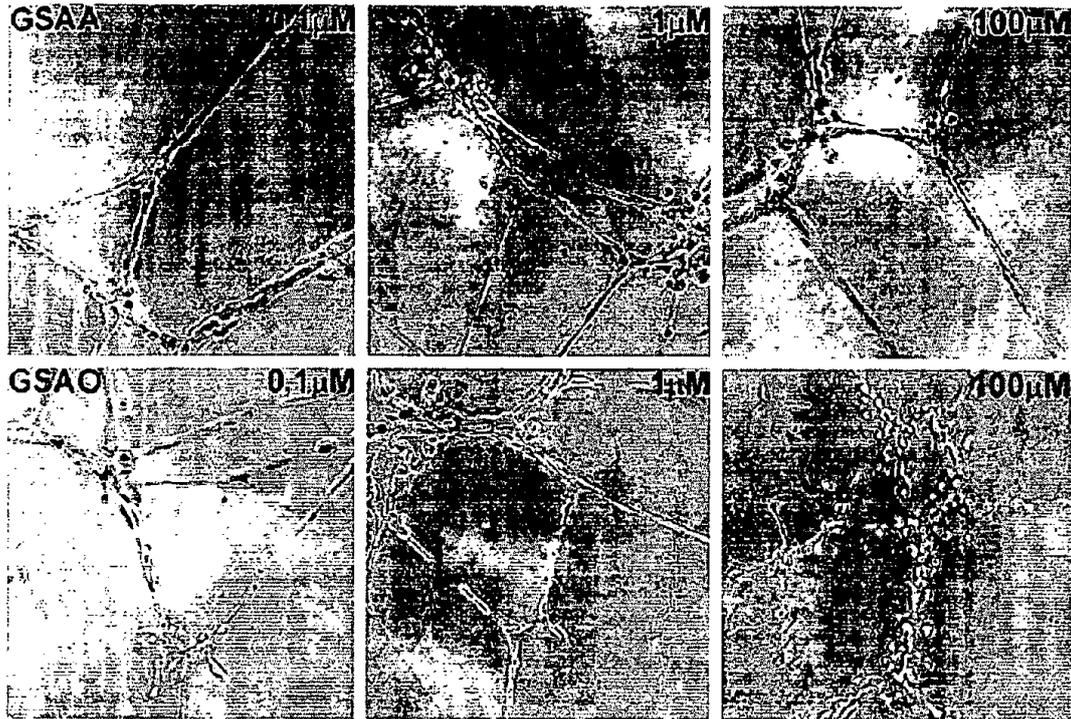


FIGURA 21

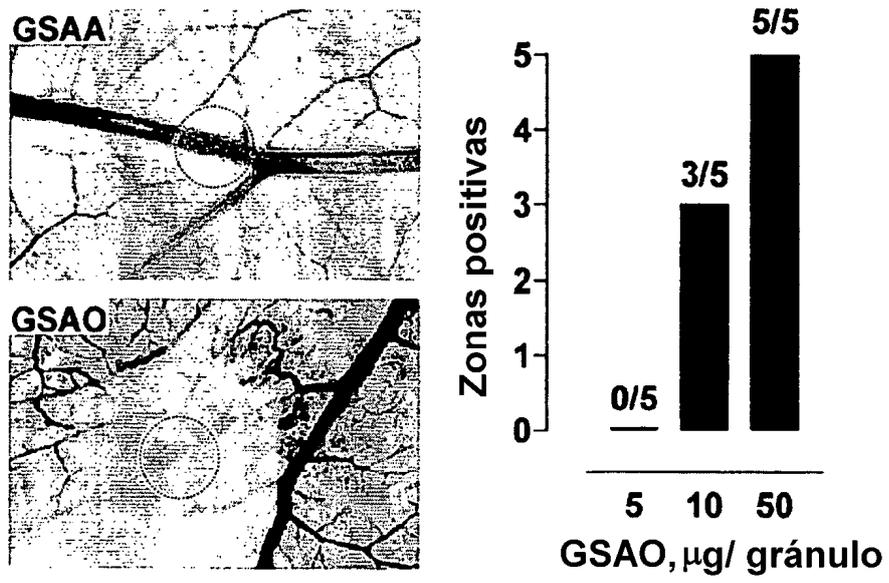


FIGURA 22

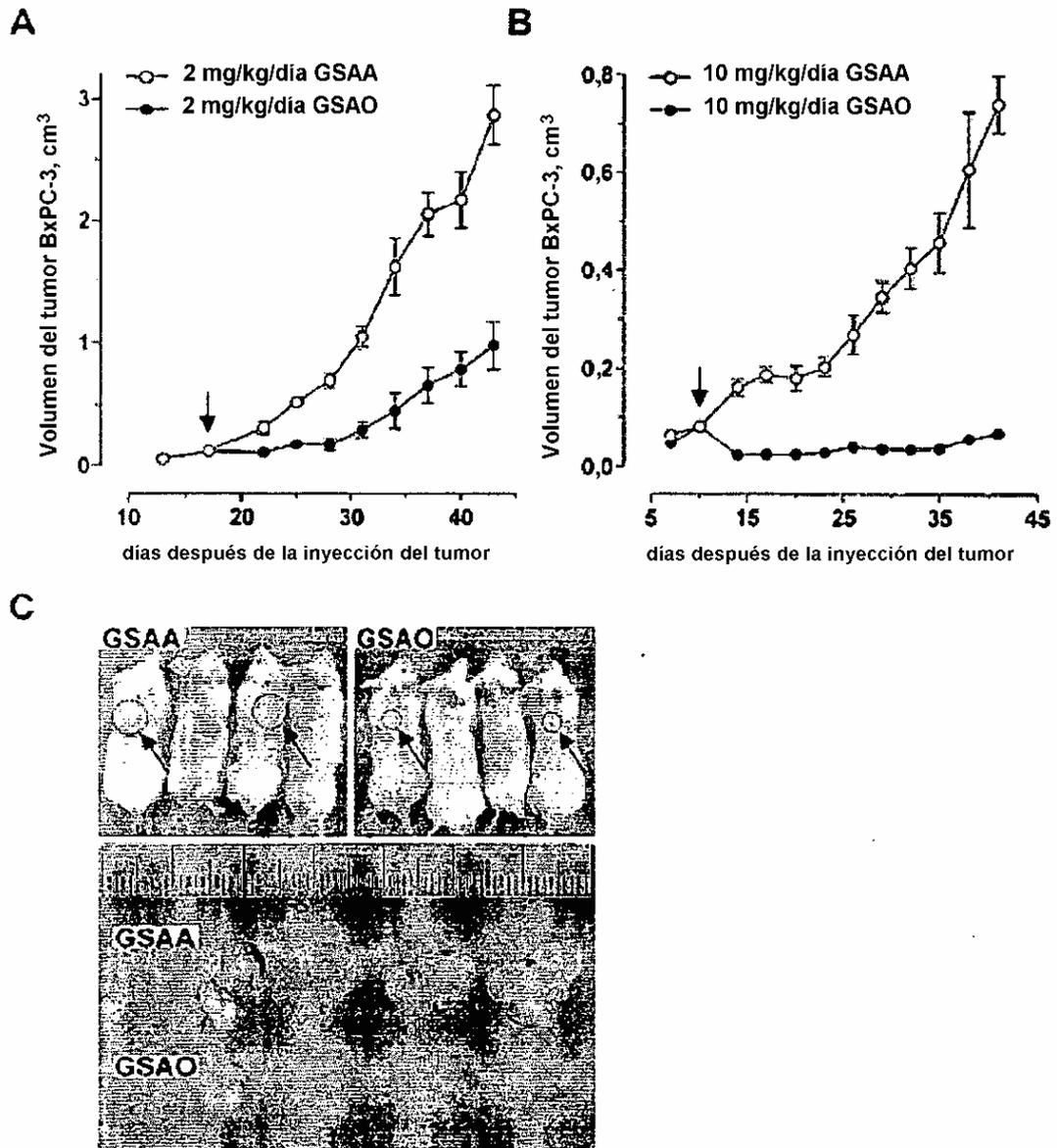


FIGURA 23

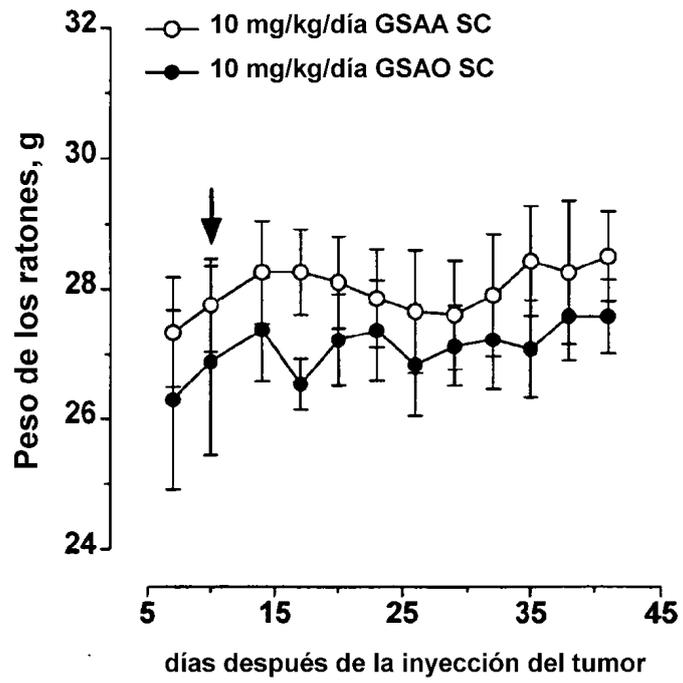


FIGURA 24

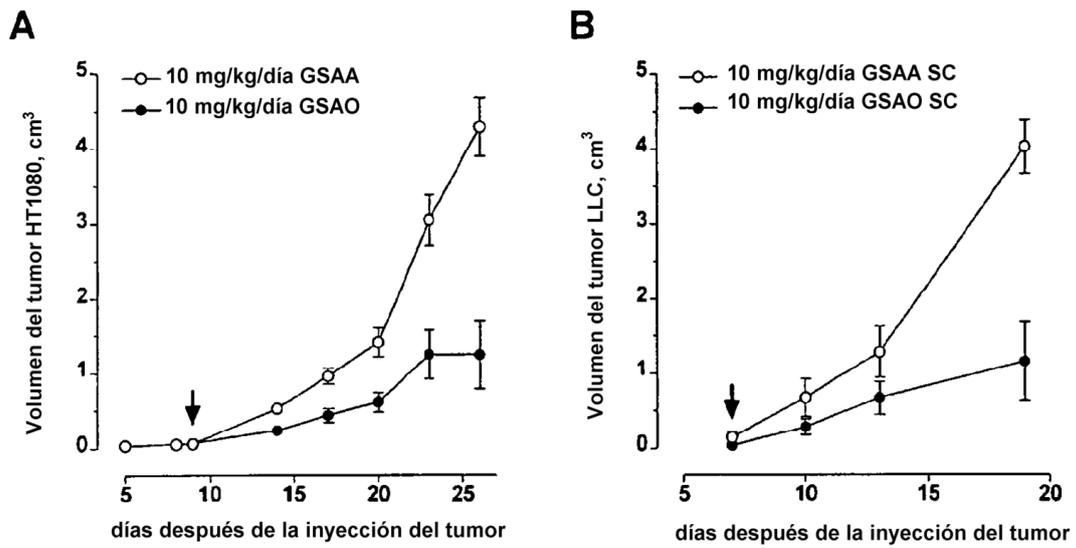


FIGURA 25

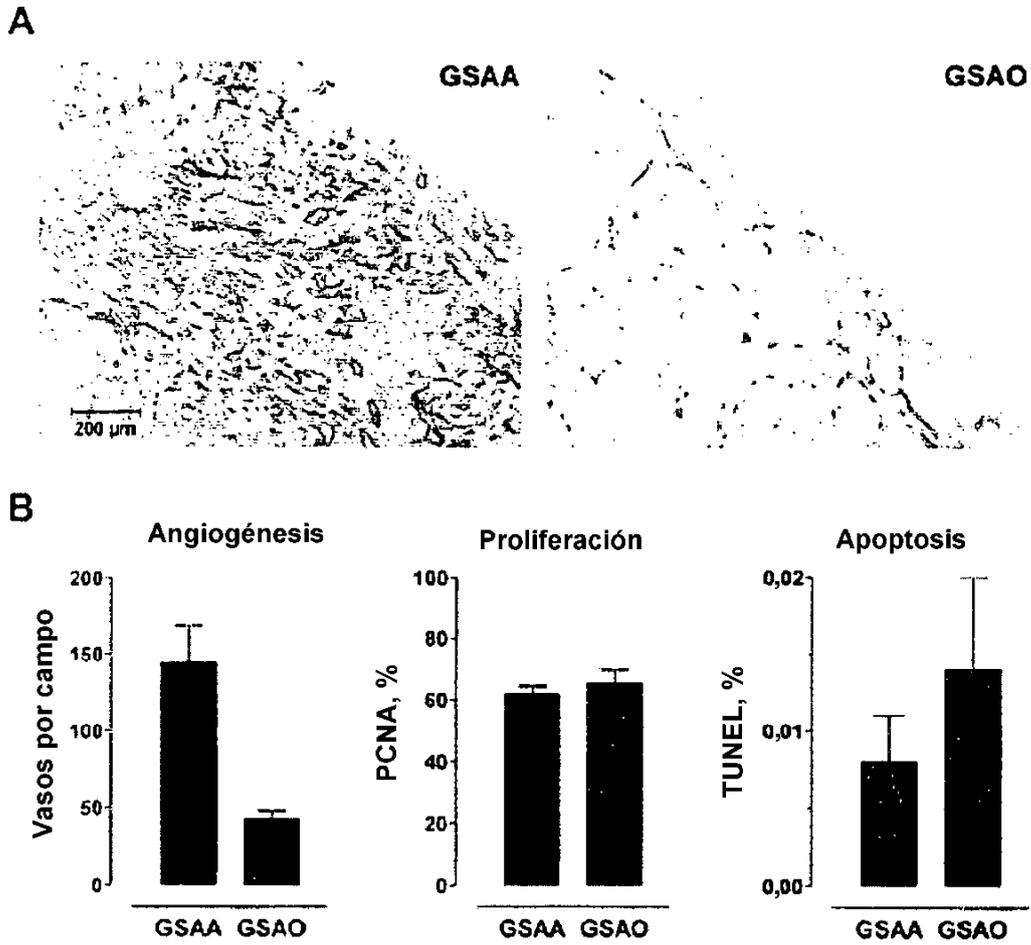


FIGURA 26

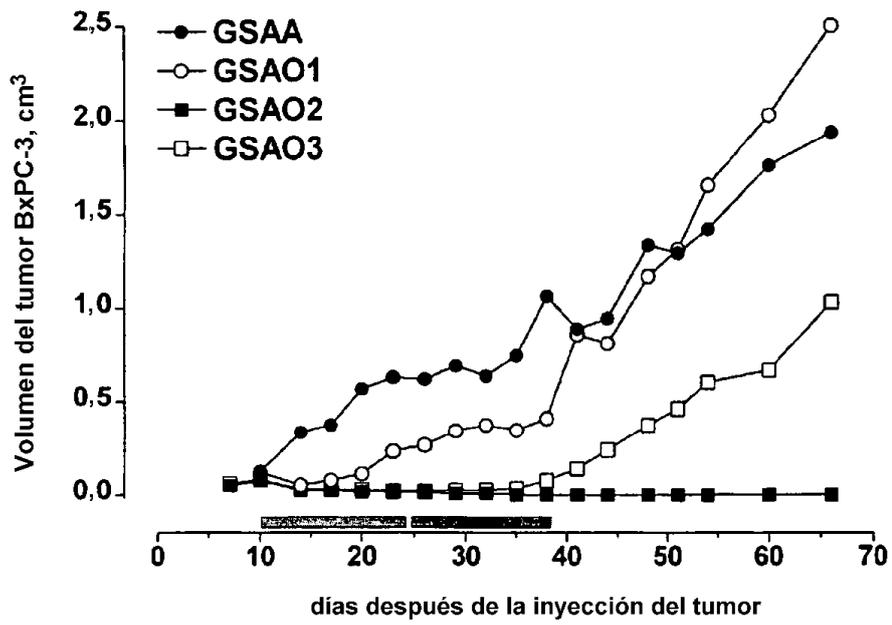


FIGURA 27

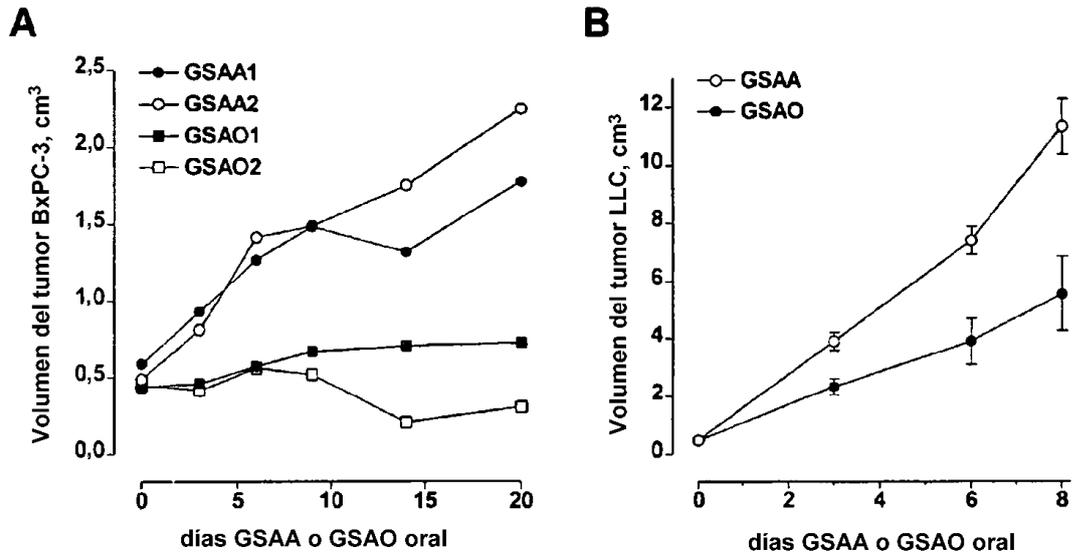


FIGURA 28

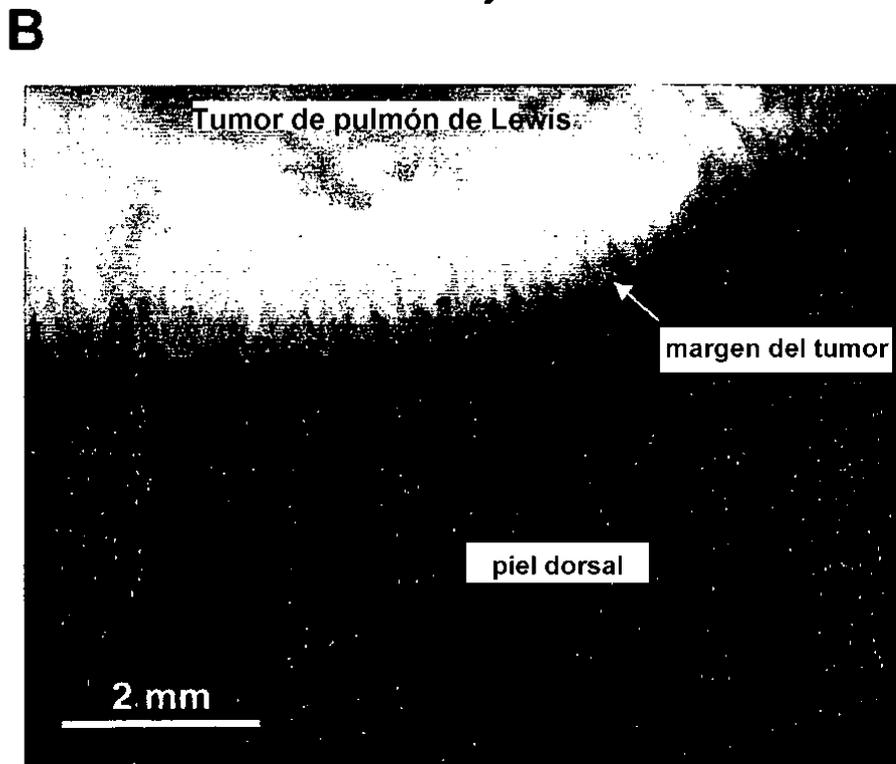
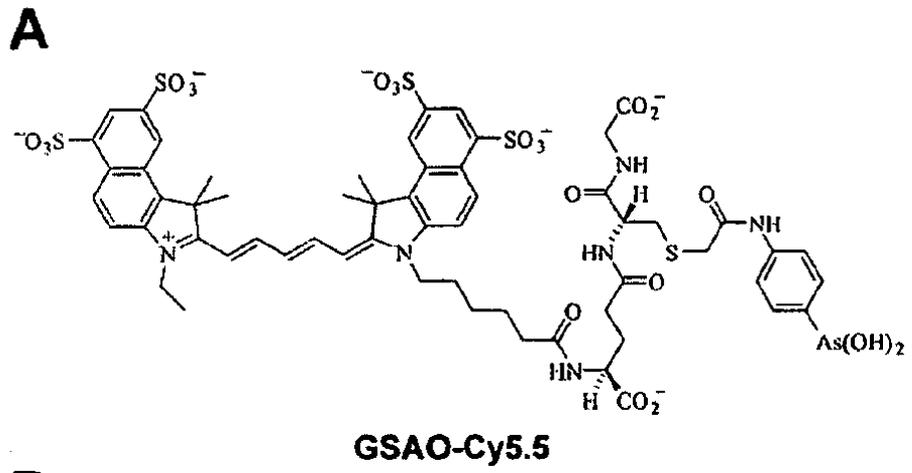


FIGURA 29

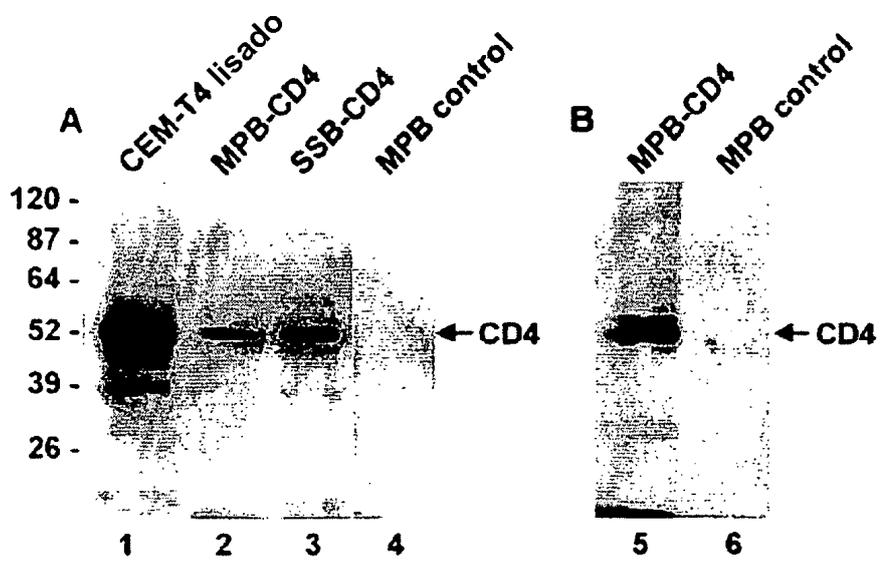


FIGURA 30

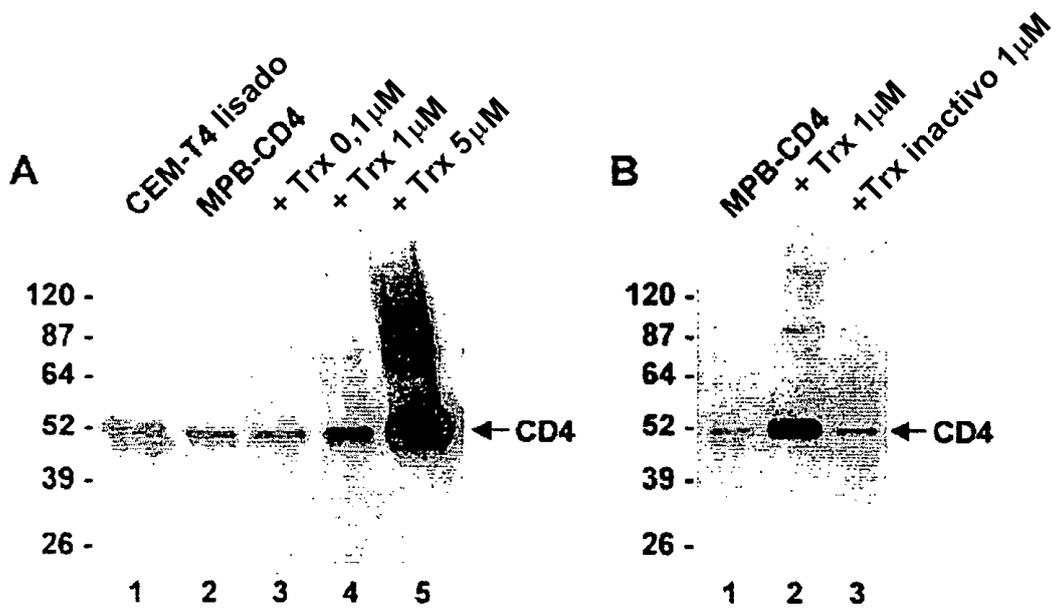


FIGURA 31

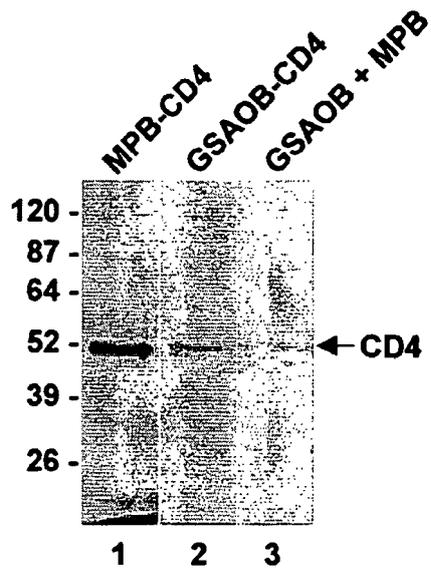


FIGURA 32

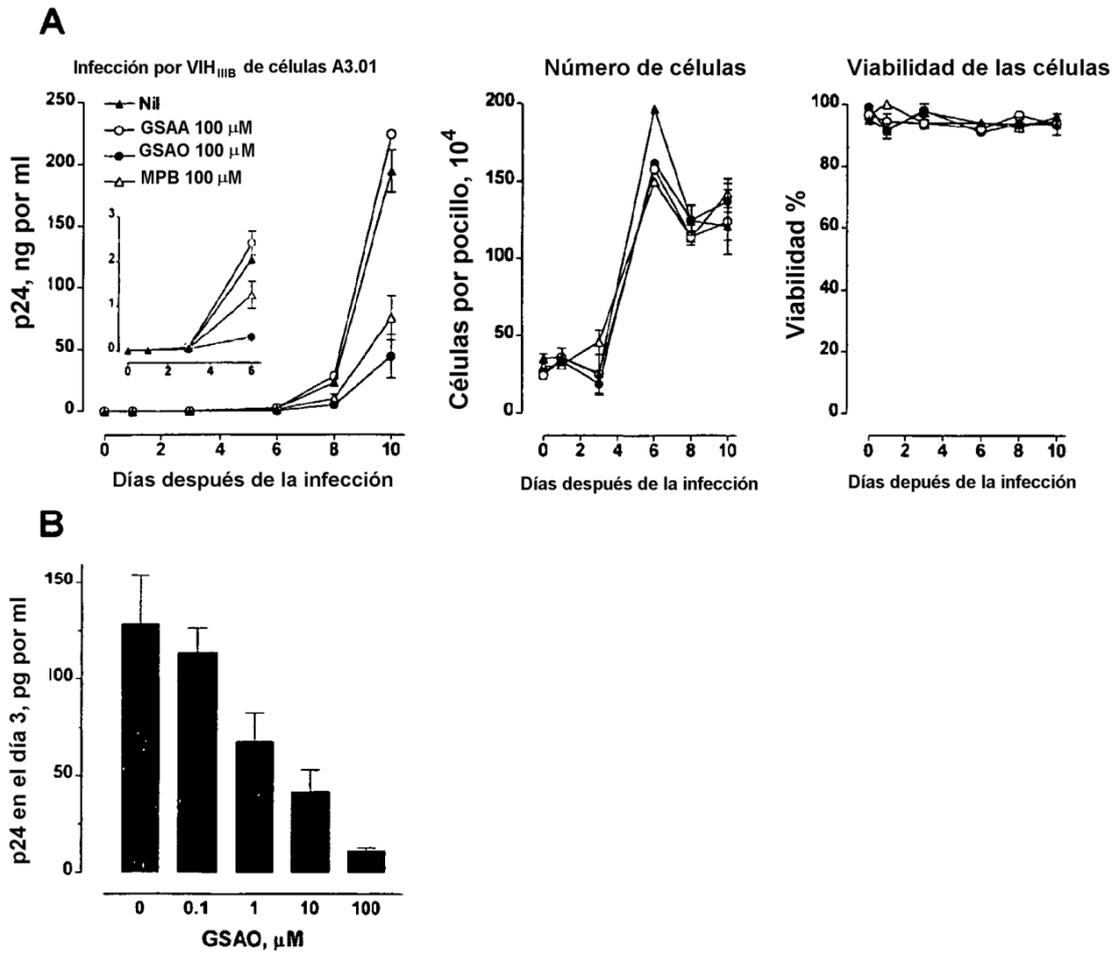


FIGURA 33

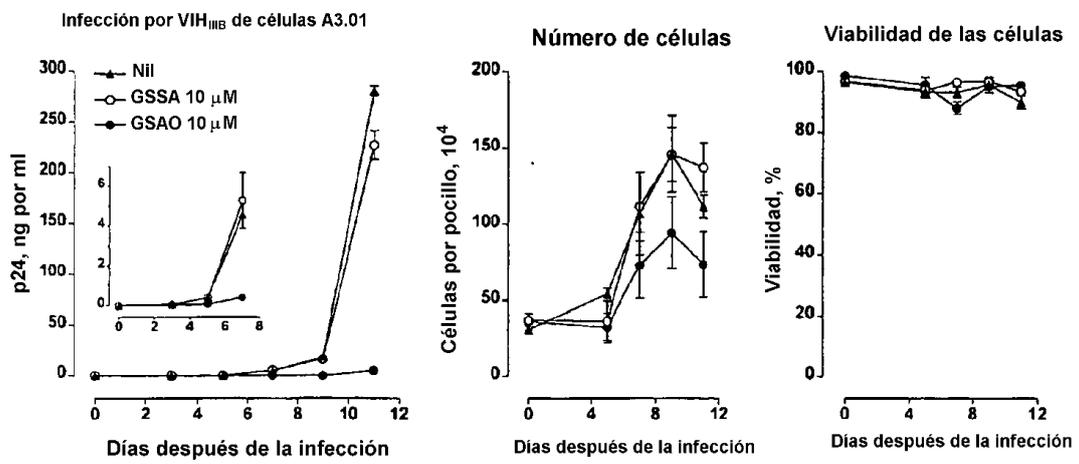


FIGURA 34

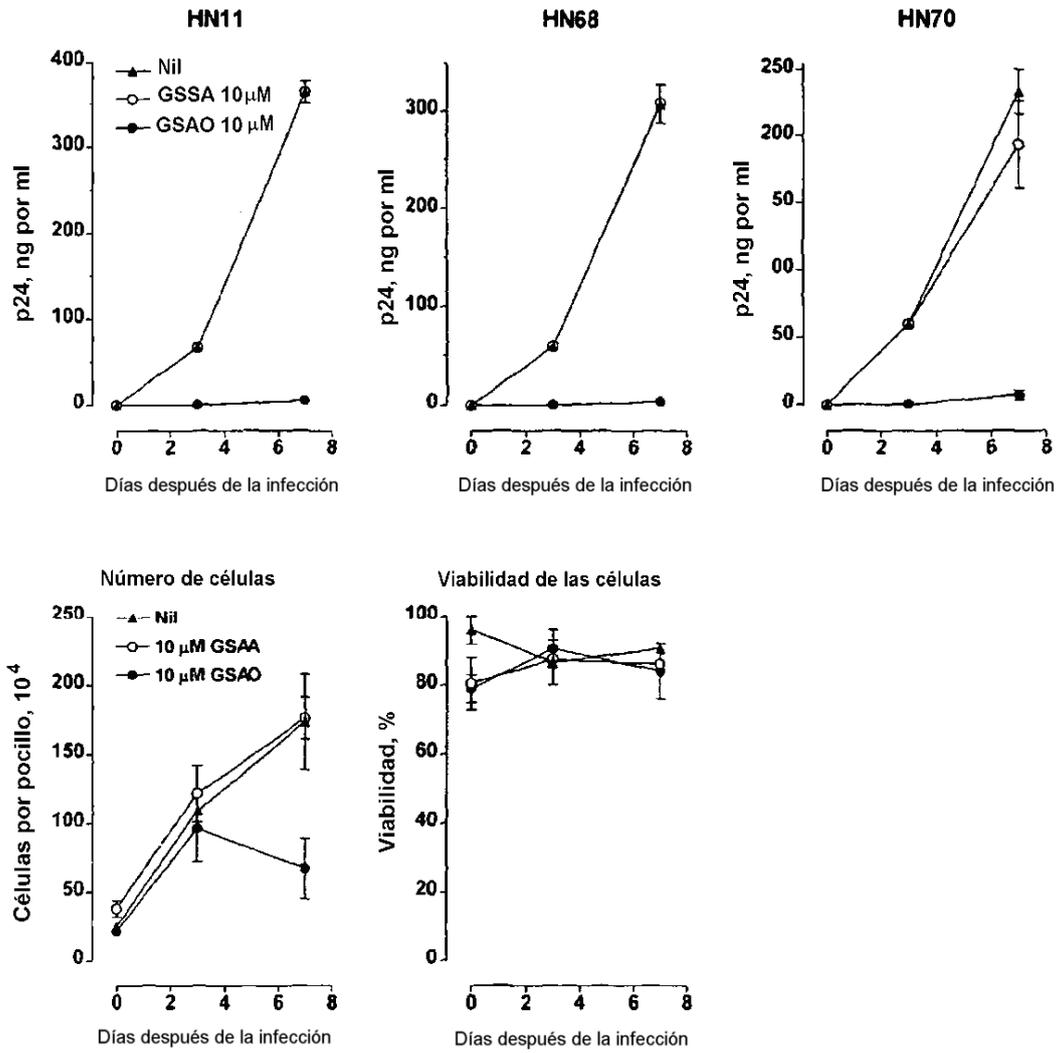


FIGURA 35