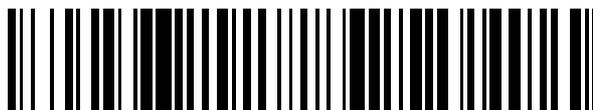


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 094**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/74** (2006.01)

**C07F 9/76** (2006.01)

**A61K 31/285** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2007 E 07815480 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2069371**

54 Título: **Compuestos de organoarsenóxido y uso de los mismos**

30 Prioridad:

**01.11.2006 AU 2006906220 P**

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

**04.07.2013**

73 Titular/es:

**NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED  
(100.0%)**

**RUPERT MYERS BUILDING GATE 14, BARKER  
STREET UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES  
NSW 2052, AU**

72 Inventor/es:

**HOGG, PHILIP JOHN y  
DILDA, PIERRE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 411 094 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

Compuestos de organoarsenóxico y uso de los mismos.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a compuestos de organoarsenóxico y a métodos para su síntesis. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos que incluyen enfermedades y trastornos proliferativos.

10

**Antecedentes de la invención**

Los compuestos arsenicales se han usado en el pasado como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades. Sin embargo, las toxicidades inherentes de los compuestos arsenicales y su índice terapéutico generalmente desfavorable han impedido esencialmente su uso como agentes farmacéuticos.

15

Los compuestos de organoarsenóxico se han divulgado en el documento WO 01/21628. Dichos compuestos se describen como aquellos que tienen propiedades antiproliferativas útiles en la terapia de enfermedades proliferativas. El documento WO 04/042079 divulga el uso de compuestos de organoarsenóxico para inducir la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) y el uso de compuestos de organoarsenóxico para la inducción de la apoptosis, particularmente en las células endoteliales. Los compuestos de organoarsenóxico descritos en los documentos WO 01/21628 y WO 04/042079 tienen un grupo colgante sustancialmente impermeable a la membrana celular unido a través de un grupo de engarce a un grupo arsenóxico. Ni el documento WO 01/21628 ni el documento WO 04/042079 divulgan específicamente los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención.

20

25

Los pacientes con leucemia promielocítica aguda (APL) pueden sufrir una recaída después del tratamiento con la terapia actual, el ácido all-trans-retinoico. En dichos casos, el trióxido de arsénico se considera el tratamiento de elección (Reiter *et al.*, 2004). El trióxido de arsénico es un compuesto arsenical trivalente que destruye selectivamente las células APL. El trióxido de arsénico también es prometedor para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (Vey, 2004), una enfermedad que, en la actualidad, carece de tratamiento estándar.

30

Sin embargo, hace tiempo que los compuestos arsenicales inorgánicos, tales como el trióxido de arsénico, se consideran venenosos y carcinógenos cuando están presentes en el organismo a niveles que superan su capacidad para desintoxicar el metaloide y se asocian con muchos efectos secundarios adversos.

35

Existe la necesidad de terapias alternativas para el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como cáncer (incluyendo el tratamiento de tumores sólidos) y las afecciones relacionadas. En particular, existe la necesidad de terapias alternativas para el tratamiento de la APL, incluyendo la leucemia mielocítica aguda (AML). También se necesita un tratamiento terapéutico para el síndrome mielodisplásico.

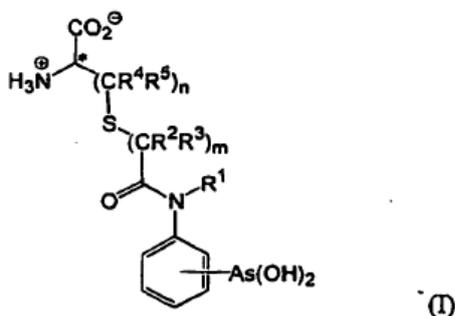
40

La presente invención se refiere a un grupo de compuestos de arsenóxico que comprenden un residuo de aminoácido opcionalmente sustituido unido a través de un grupo de engarce a un grupo de fenilarsenóxico. Los compuestos de acuerdo con la presente invención pueden tener una o más ventajas frente a los compuestos arsenicales conocidos, tales como el trióxido de arsénico y los compuestos de arsenóxico divulgados en el documento WO 01/21628 o WO 04/042079, incluyendo el compuesto 4-(N-(S-glutacionilacetil)amino)fenilarsenóxico (GSAO), particularmente cuando se usan para el tratamiento de enfermedades proliferativas tales como el cáncer (por ejemplo, tumores sólidos).

45

50 **Resumen de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I):



donde:

el grupo As(OH)<sub>2</sub> puede estar *orto*, *meta* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo;

R<sup>1</sup> se selecciona de entre hidrógeno y alquilo C<sub>1-3</sub>;

5 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenoilo C<sub>2-3</sub> opcionalmente sustituido; y alcoxi C<sub>1-3</sub> opcionalmente sustituido;

R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub> opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenoilo C<sub>2-3</sub> opcionalmente sustituido; y alcoxi C<sub>1-3</sub> opcionalmente sustituido;

10 m es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

n es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

\* indica un átomo de carbono quiral; y sales y hidratos del mismo;

donde el sustituyente opcional se selecciona independientemente de entre alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, heterocicloalquilo, halo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquenoilo, haloalcoxi, haloalquenoilo, NO<sub>2</sub>, nitroalquilo, nitroalquenoilo, nitroalquinilo, nitroheterociclo, alquilamino, dialquilamino, alquenoilamino, alquinilamino, acilo, alquenoilo, alquinoilo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfonilo, heterocicloxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alquilsulfenilo, alquilcarbonilo, alquiltio, aciltio, fosfeno, fosfinilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, aralquilo, alquilheteroarilo, ciano, cianato, isocianato, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>alquilo, C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NH(alquilo) y -C(O)N(alquil)<sub>2</sub>.

20 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal, un hidrato, un enantiómero o un racemato del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, junto con un excipiente, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal, un hidrato, un enantiómero o un racemato del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un vertebrado.

30 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal, un hidrato, un enantiómero o un racemato del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para su uso en la inducción selectiva de la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) en un vertebrado.

35 En un aspecto más, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal, un hidrato, un enantiómero o un racemato del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para la inducción de la apoptosis en células proliferativas de mamífero.

40 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula (I) o una sal, un hidrato, un enantiómero o un racemato del mismo, de acuerdo con el primer aspecto de la invención, para su uso en el tratamiento de la leucemia o el síndrome mielodisplásico en un vertebrado.

## Definiciones

45 A continuación, se presentan algunas definiciones que pueden ser útiles en la comprensión de la descripción de la presente invención. Se pretende que sean definiciones generales, y el alcance de la presente invención no se debería limitar, de ninguna manera, solo a esos términos y expresiones, sino que se exponen para facilitar la comprensión de la siguiente descripción.

50 A menos que el contexto indique lo contrario o que se especifique lo contrario, los números enteros, las etapas o los elementos de la invención citados en la presente memoria como números enteros, etapas o elementos en singular, comprenden claramente tanto la forma singular como la plural de los números enteros, etapas o elementos citados.

55 En la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto indique lo contrario, se entenderá que el término "comprenden", o las variaciones tales como "comprende" o "comprendiendo" implican la inclusión de una etapa o un elemento o un número entero o, un grupo de etapas, elementos o números enteros, pero no la exclusión de ninguna otra etapa o elemento o número entero, o grupo de elementos o números enteros. Por lo tanto, en el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "que comprende" significa "que incluye principalmente, pero no necesariamente exclusivamente".

60 Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible de sufrir variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente. Se entenderá que la invención incluye la totalidad de dichas variaciones y modificaciones. La invención también incluye todas las etapas, características, composiciones y compuestos mencionados o indicados en la presente memoria descriptiva, individual o colectivamente, y una cualquiera y todas las combinaciones, o dos cualquiera o más de dichas etapas o características.

65

En el contexto de la presente memoria descriptiva, BRAO se refiere a ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzenoarsónico; CAO se refiere a ácido 4-(*N*-(*S*-cisteinilacetil)amino)-fenilarsenioso; GSAO se refiere a ácido 4-(*N*-(*S*-glutacionilacetil)amino)fenilarsenioso; y PENAO y se refiere a ácido 4-(*N*-(*S*-penicilaminilacetil)amino)fenilarsenioso [*(S)*-penicilamino-arsenóxido].

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "grupo alquilo C<sub>1-3</sub>" incluye en su significado grupos alifáticos saturados de cadena lineal o de cadena ramificada monovalentes ("alquilo") y divalentes ("alquileno") que tienen de 1 a 3 átomos de carbono. Así pues, por ejemplo, la expresión alquilo C<sub>1-3</sub> incluye metilo, etilo, 1-propilo e isopropilo.

10 La expresión "grupo alqueno C<sub>2-3</sub>" incluye en su significado grupos de hidrocarburo alifáticos insaturados de cadena lineal o de cadena ramificada monovalentes ("alqueno") y divalentes ("alqueno") que tienen de 2 a 3 átomos de carbono y al menos un doble enlace en cualquier lugar de la cadena. A menos que se indique lo contrario, la estereoquímica de cada doble enlace puede ser independientemente *cis* o *trans*, o *E* o *Z*, según proceda. Los ejemplos de grupos alqueno incluyen etenilo, vinilo, alilo, 1-metilvinilo, 1-propeno y 2-propeno.

15 La expresión "grupo alquino C<sub>2-3</sub>", como se usa en la presente memoria, incluye en su significado grupos de hidrocarburo alifáticos insaturados monovalentes ("alquino") y divalentes ("alquino") que tienen de 2 a 3 átomos de carbono y que tienen al menos un triple enlace. Los ejemplos de grupos alquino incluyen, pero sin limitación, etinilo, 1-propino.

20 El término "alcoxi", como se usa en la presente memoria, se refiere a grupos alquiloxi (es decir, O-alquilo) de cadena lineal o ramificada, donde alquilo es como se ha definido anteriormente. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi e isopropoxi.

25 El término "amino", como se usa en la presente memoria, se refiere a grupos de forma -NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup> donde R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> se seleccionan individualmente de entre hidrógeno, alquilo (C<sub>1-4</sub>) opcionalmente sustituido, alqueno (C<sub>2-4</sub>) opcionalmente sustituido, alquino (C<sub>2-4</sub>) opcionalmente sustituido, arilo (C<sub>6-10</sub>) opcionalmente sustituido y aralquilo opcionalmente sustituido, tales como bencilo. El grupo amino puede ser un grupo amino primario, secundario o terciario.

30 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "arsenóxido" es sinónimo de "ácido arsenioso" y se refiere al resto As(OH)<sub>2</sub>, que también se puede representar como As=O.

35 El término "aminoácido", como se usa en la presente memoria, incluye aminoácidos naturales y no naturales, así como variantes sustituidas de los mismos. Por lo tanto, las formas de aminoácidos (L) y (D) se incluyen en el alcance del término "aminoácido". El término "aminoácido" incluye dentro de su alcance glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptófano, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina e histidina. La estructura del residuo de aminoácido puede estar sustituida con uno o más grupos seleccionados independientemente de entre alquilo (C<sub>1-6</sub>), halógeno, hidroxilo, hidroxialquilo (C<sub>1-6</sub>), arilo, por ejemplo, fenilo, arilalquilo (C<sub>1-3</sub>), por ejemplo, bencilo, y cicloalquilo (C<sub>3-6</sub>).

45 La expresión "arilo C<sub>6-10</sub>" o variantes tales como "arileno", como se usan en la presente memoria, se refieren a residuos de hidrocarburos aromáticos monovalentes ("arilo") y divalentes ("arileno") individuales, polinucleares, conjugados y condensados que tienen de 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos aromáticos incluyen fenilo y naftilo.

50 El término "arilalquilo" o variantes tales como "aralquilo", como se usan en la presente memoria, incluyen en su significado radicales de hidrocarburos aromáticos monovalentes ("arilo") y divalentes ("arileno") individuales, polinucleares, conjugados y condensados unidos a radicales alqueno divalentes saturados de cadena lineal o ramificada. Los ejemplos de grupos arilalquilo incluyen bencilo.

55 La expresión "heterocicloalquilo C<sub>3-8</sub>", como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales de hidrocarburos monovalentes ("heterocicloalquilo") y divalentes ("heterocicloalquileno"), saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o condensados que tienen de 3 a 8 átomos en el anillo, donde de 1 a 5, o de 1 a 3 átomos del anillo son heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N, NH o S. El grupo heterocicloalquilo puede ser heterocicloalquilo C<sub>3-6</sub>. El grupo heterocicloalquilo puede ser heterocicloalquilo C<sub>3-5</sub>. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo incluyen aziridinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, quinuclidinilo, azetidino, morfolinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropirranilo y similares.

60 La expresión "grupo heteroaromático C<sub>5-20</sub>" y variantes tales como "heteroarilo" o "heteroarileno", como se usan en la presente memoria, incluyen en su significado radicales aromáticos monovalentes ("heteroarilo") y divalentes ("heteroarileno"), individuales, polinucleares, conjugados y condensados que tienen de 5 a 20 átomos, donde de 1 a 6 átomos o de 1 a 4 o de 1 a 2 átomos del anillo son heteroátomos seleccionados independientemente de entre O, N, NH y S. El grupo heteroaromático puede ser un grupo heteroaromático C<sub>5-10</sub>. El grupo heteroaromático puede ser un grupo heteroaromático C<sub>5-8</sub>. Los ejemplos de grupos heteroaromáticos incluyen piridilo, pirimidinilo, piridazinilo, pirazinilo, 2,2'-bipiridilo, fenantrolinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, imidazolinilo, tiazolinilo, pirrolilo, furanilo, tiofenilo,

oxazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, triazolilo, y similares.

El término "halógeno" o variantes tales como "haluro" o "halo", como se usan en la presente memoria, se refieren a flúor, cloro, bromo y yodo.

El término "heteroátomo" o variantes tales como "hetero-", como se usan en la presente memoria, se refieren a O, N, NH y S.

La expresión "opcionalmente sustituido", como se usa en la presente memoria, significa que el grupo al que esta expresión se refiere puede no estar sustituido o puede estar sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de entre alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, heterocicloalquilo, halo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquenoiloxi, haloalcoxi, haloalquenoiloxi, NO<sub>2</sub>, NR<sup>a</sup>R<sup>b</sup>, nitroalquilo, nitroalquenoilo, nitroalquinilo, nitroheterociclilo, alquilamino, dialquilamino, alquenoilamina, alquililamino, acilo, alquenoílo, alquinoílo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfoniloxi, heterocicloxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alquilsulfenilo, alquilcarboniloxi, alquiltio, aciltio, grupos que contienen fósforo tales como fosfeno y fosfinilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, aralquilo, heteroarilo, ciano, cianato, isocianato, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>alquilo, C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NH(alquilo) y -C(O)N(alquilo)<sub>2</sub>. Los sustituyentes preferidos incluyen alquilo C<sub>1-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, -CH<sub>2</sub>-alcoxi (C<sub>1-3</sub>), arilo C<sub>6-10</sub>, por ejemplo, fenilo, -CH<sub>2</sub>-fenilo, halo, hidroxilo, hidroxialquilo C<sub>1-3</sub> y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>), por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. Los sustituyentes particularmente preferidos incluyen alquilo C<sub>1-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, halo, hidroxilo, hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>), por ejemplo, CH<sub>2</sub>OH y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>), por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "administrando", y las variaciones del mismo incluyendo "administrar" y "administración", incluyen poner en contacto, aplicar, suministrar o proporcionar un compuesto o una composición de la invención a un organismo o una superficie mediante cualquier medio adecuado.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "vertebrado" incluye seres humanos e individuos de cualquier especie de importancia social, económica o de investigación incluyendo, pero sin limitación, los miembros del género ovino, bovino, equino, porcino, felino, canino, primates (incluyendo los primates humanos y no humanos), roedores, murino, caprino, leporino y aviar. En una realización preferida, el vertebrado es un ser humano.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "tratamiento" se refiere a todos y cada uno de los usos que remedian un estado patológico o sus síntomas, evitan el establecimiento de la enfermedad, o previenen, impiden, retrasan o invierten de otra manera la progresión de la enfermedad o de otros síntomas no deseados en modo alguno.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, la expresión "cantidad eficaz" incluye en su significado una cantidad suficiente pero no tóxica de un compuesto o una composición de la invención para proporcionar un efecto deseado. Por lo tanto, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" incluye en su significado una cantidad suficiente pero no tóxica de un compuesto o una composición de la invención para proporcionar el efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie que se está tratando, el sexo, la edad y el estado general de salud del sujeto, la gravedad de la afección que se está tratando, el agente que se administra en particular, el modo de administración, etcétera. Así pues, no es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, el experto en la materia puede determinar una "cantidad eficaz" apropiada solo mediante los métodos experimentales habituales.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Estructura de (S)-penicilamina-arsenóxido ("PENAO").

**Figura 2.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de (S)-penicilamina-arsenóxido.

**Figura 3.** Datos de correlación a múltiples enlaces <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C bidimensional para (S)-penicilamina-arsenóxido. Se observó acoplamiento de largo alcance entre los hidrógenos de acilo del ácido 4-(2-bromoacetilamino)bencenearsonico ("BRAO") (δ 3,55) y el carbono cuaternario de la penicilamina (δ 46,75). El espectro de RMN se registró en D<sub>2</sub>O en un espectrómetro de RMN de sonda de doble canal Bruker a 300 MHz.

**Figura 4.** Espectrometría de masas: pico de masa sodiado observado a 413,011678 (δ 1,5 ppm del calculado). La formación rápida de alquiléster se produce en función del disolvente alcohólico usado, por ejemplo, si la muestra se procesa en metanol, los principales picos observados son +15 o +30 unidades de masa.

**Figura 5.** La (S)-penicilamina-arsenóxido inhibe la proliferación de las células BAE con una CI<sub>50</sub> de 0,4 μM. El compuesto arsenical pentavalente, el ácido (S)-penicilamina-arsónico, no tiene ningún efecto sobre la proliferación. Los puntos de datos son la media ± DE de tres experimentos realizados por triplicado.

**Figura 6.** Comparación de los efectos de (S)-penicilamina-arsenóxido en la proliferación de BAE frente a la

viabilidad. Los puntos de datos son la media  $\pm$  DE de tres experimentos realizados por triplicado.

**Figura 7.** El (S)-penicilamina-arsenóxico es tan buen inhibidor de la proliferación de las células APL como el trióxido de arsénico. El número de células NB4 viables que quedan tras 72 h de incubación a concentraciones crecientes de trióxido de arsénico, penicilamina-arsenóxico o GSAO. Los puntos de datos son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado.

**Figura 8.** El (S)-penicilamina-arsenóxico es más eficaz que el GSAO en la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial. La dilatación mitocondrial inducida por GSAO o (S)-penicilamina-arsenóxico 100  $\mu$ M medida mediante la disminución de la dispersión de la luz a 520 nm durante 30 min. Los trazos representan dos experimentos realizados por duplicado en dos preparaciones mitocondriales diferentes.

**Figura 9.** El (S)-penicilamina-arsenóxico se acumula en las células BAE a una velocidad  $\sim$ 70 veces superior que el GSAO. Se incubaron células BAE durante hasta 4 h en presencia de GSAO o (S)-penicilamina-arsenóxico 50  $\mu$ M, y se midió el arsénico citosólico mediante espectrometría con plasma de acoplamiento inductivo. Los puntos de datos y las barras de error son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado y representan dos experimentos.

**Figura 10.** La inhibición de OATP de la superficie celular suaviza la acumulación celular de (S)-penicilamina-arsenóxico y la actividad antiproliferativa. **A.** Inhibición de la acumulación de (S)-penicilamina-arsenóxico en las células endoteliales mediante el inhibidor de OATP, DIDS. Se pretrataron las células o no con DIDS 500  $\mu$ M durante 30 min y después se incubaron con (S)-penicilamina-arsenóxico 20  $\mu$ M durante 2 h. Se determinó el contenido de arsénico mediante MS-ICP. Los valores son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado. Los resultados representan dos experimentos. \*\*:  $p < 0,01$ . **B.** DIDS suaviza la actividad antiproliferativa de GSAO en las células endoteliales. Se pretrataron células BAE o no con DIDS 300  $\mu$ M de 30 min y después se incubaron con (S)-penicilamina-arsenóxico 1,5  $\mu$ M durante 24 h. La viabilidad celular se determinó mediante MTT. Los resultados se expresan como porcentaje de control. Los valores son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado. Los resultados representan dos experimentos. \*\*:  $p < 0,01$ .

**Figura 11.** El (S)-penicilamina-arsenóxico es bombeado fuera de las células por MRP1/2. **A.** Se incubaron células BAE durante hasta 2 h con (S)-penicilamina-arsenóxico 50  $\mu$ M en la ausencia o presencia de 4H10 (5  $\mu$ M) o MK-571 (25  $\mu$ M) y se midió el arsénico citosólico mediante espectrometría con plasma de acoplamiento inductivo. Los puntos de datos y las barras de error son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por cuadruplicado y representan dos experimentos. **B.** Efecto de los inhibidores de MRP1/2, 4H10 (2  $\mu$ M) y MK-571 (15  $\mu$ M), en la inhibición mediante penicilamina-arsenóxico (0,3  $\mu$ M) de la proliferación de las células BAE. Los inhibidores de MRP se incubaron durante 30 min con las células antes de la incubación con (S)-penicilamina-arsenóxico durante 72 h. Los puntos de datos y las barras de error son la media  $\pm$  DE de las determinaciones por triplicado. \*\*\* es  $p < 0,001$ ; \*\* es  $p < 0,01$ .

**Figura 12.** El agotamiento de la glutatona celular aumenta la actividad antiproliferativa del (S)-penicilamina-arsenóxico. Se trataron células BAE conjuntamente con (S)-penicilamina-arsenóxico y las concentraciones indicadas de BSO durante 72 h, y se calculó la  $CI_{50}$  para la detención de la proliferación. Los puntos de datos y las barras de error son la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por triplicado.

**Figura 13.** Inhibición del crecimiento de tumores de carcinoma pancreático humano mediante la administración subcutánea continua de (S)-penicilamina-arsenóxico. Se establecieron tumores BxPC-3 en la línea media proximal de ratones atímicos BalbC hembra de 7 a 9 semanas de vida. Se implantaron a los ratones portadores de tumores de  $\sim$ 50 mm<sup>3</sup> bombas micro-osmóticas Alzet de 28 días subcutáneamente en la ijada. Las bombas administraron 0,25; 0,5 o 1 mg/kg/día de (S)-penicilamina-arsenóxico en glicina 100 mM (vehículo).

**Figura 14.** Producción de CAO por escisión enzimática de GSAO.

**Figura 15.** Análisis de HPLC de GSAO y CAO. Se resolvieron 5 nmol de GSAO (parte A) o CAO (parte B) en una columna de fase inversa C18 y se detectaron por absorbancia a 256 nm.

**Figura 16.** El CAO se acumula más rápidamente en las células y tiene una mayor actividad antiproliferativa que el GSAO. **A.** El CAO se acumula en las células a una velocidad mucho mayor que el GSAO. Se incubaron células BAE con GSAO o CAO 50  $\mu$ M durante 4 h. Se determinaron los niveles de arsénico celulares mediante ICP-MS. Las velocidades de acumulación de GSAO y CAO son de 0,03 y 0,20 nmol de átomos de As por 10<sup>6</sup> células, respectivamente. Los puntos de datos son la media  $\pm$  DE de tres determinaciones. Los resultados son representativos de dos experimentos. **B.** El CAO es exportado de las células por la proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos 1. Las células BAE pretratadas durante 30 minutos con 10  $\mu$ M del inhibidor de MRP-1 4H10 se incubaron con GSAO o CAO 50  $\mu$ M durante 2 h. Se determinaron los niveles de arsénico celulares mediante ICP-MS. Los puntos de datos son la media  $\pm$  DE de tres determinaciones. Los resultados

representan dos experimentos. **C.** Valores de  $Cl_{50}$  de GSAO y CAO para la detención de la proliferación de las células endoteliales. Se incubaron células BAE con GSAO o CAO 0,8-100  $\mu$ M durante 24, 48 o 72 h. Se determinó la viabilidad celular mediante MTT. Los resultados se expresan como el porcentaje de control. Los valores son la media  $\pm$  DE de determinaciones por triplicado. Los resultados representan tres experimentos.

5 **Figura 17.** El CAO desencadena la transición de la permeabilidad mitocondrial. Las mitocondrias se incubaron con nada ( $\bullet$ ),  $Ca^{2+}$  150  $\mu$ M y Pi 6 mM ( $\circ$ ) o CAO 200  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ) y se controló la dilatación mediante la disminución de la dispersión de la luz a 520 nm durante 60 min. Los trazos representan dos experimentos.

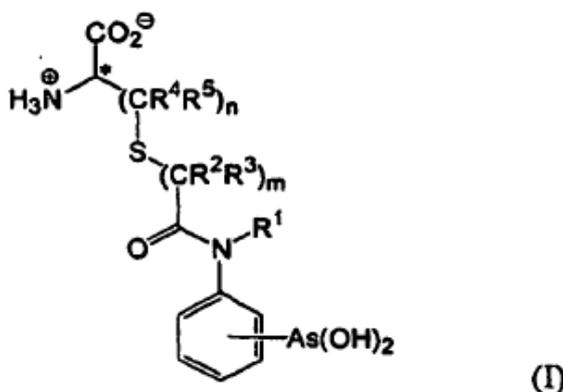
## 10 Descripción detallada de la invención las realizaciones preferidas de la invención

La presente invención se refiere a compuestos de organoarsenóxido que comprenden un resto de aminoácido opcionalmente sustituido unido a través de un grupo de engarce a un grupo de fenilarsenóxido.

15 Los compuestos de organoarsenóxido de acuerdo con la presente invención tienen un resto de aminoácido sustituido o no sustituido. Los ejemplos de restos de aminoácidos incluyen cisteinilo, cisteinilo sustituido, por ejemplo penicilaminilo (también conocido como  $\beta,\beta$ -dimetilcisteinilo o 3-mercaptovalinilo), alaninilo opcionalmente sustituido, mercaptoalaninilo opcionalmente sustituido, valinilo opcionalmente sustituido, 4-mercaptovalinilo opcionalmente sustituido, leucinilo opcionalmente sustituido, 3- o 4-, o 5-mercaptoleucinilo opcionalmente sustituido, isoleucinilo  
20 opcionalmente sustituido o 3-, 4- o 5-isoleucinilo opcionalmente sustituido. En una realización preferida de la invención, el resto de aminoácido es  $\beta,\beta$ -dimetilcisteinilo ("penicilaminilo"). En otra realización de la invención, el resto de aminoácido es (S)-penicilaminilo. En otra realización de la invención, el resto de aminoácido es cisteinilo. El resto de aminoácido puede tener una configuración (L), (D), (R) o (S). Los sustituyentes opcionales incluyen alquilo  $C_{1-3}$ , ciclopropilo, alcoxilo  $C_{1-3}$ ,  $-CH_2$ -alcoxilo  $C_{1-3}$ , arilo  $C_{6-10}$ ,  $-CH_2$ -fenilo, halo, hidroxilo, hidroalquilo  $C_{1-3}$  y haloalquilo  $C_{1-3}$ , por ejemplo,  $CF_3$ ,  $CH_2CF_3$ . En realizaciones preferidas, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente de entre hidroxilo, metoxi, halo, metilo, etilo, propilo, ciclopropilo,  $CH_2OH$  y  $CF_3$ .

El grupo de engarce de los compuestos de organoarsenóxido de acuerdo con la presente invención es un grupo acetamido sustituido o no sustituido. En una realización, el grupo de engarce es un grupo acetamido no sustituido.

30 En particular, la invención se refiere a compuestos de fórmula general (I):



donde

35 el grupo  $As(OH)_2$  puede estar *orto*, *meta* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo;

$R^1$  se selecciona de entre hidrógeno y alquilo  $C_{1-3}$ ;

$R^2$  y  $R^3$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenilo  $C_{2-3}$  opcionalmente sustituido; y alcoxi  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido;

40  $R^4$  y  $R^5$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenilo  $C_{2-3}$  opcionalmente sustituido; y alcoxi  $C_{1-3}$  opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

n es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

45 \* indica un átomo de carbono quiral; y

sales e hidratos del mismo;

donde el sustituyente opcional se selecciona independientemente de entre alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, heterocicloalquilo, halo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, hidroalquilo, alcoxi, tioalcoxi, alqueniloxi, haloalcoxi, haloalqueniloxi,  $NO_2$ , nitroalquilo, nitroalquenilo, nitroalquinilo, nitroheterociclo, alquilamino, dialquilamino, alquenilamino, alquinilamino, acilo, alquenoilo, alquinoilo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfoniloxi, heterocicloxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alquilsulfenilo, alquilcarboniloxi, alquiltio,

50

acilitio, fosfona, fosfinilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, aralquilo, alquilheteroarilo, ciano, cianato, isocianato, CO<sub>2</sub>H, CO<sub>2</sub>alquilo, C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NH(alquilo) y -C(O)N(alquilo)<sub>2</sub>.

5 A continuación, se describen las realizaciones preferidas de los compuestos de fórmula general (I). Se debe entender que una cualquiera o más de las realizaciones divulgadas en la presente memoria se pueden combinar con cualquier otra realización o realizaciones, incluyendo la(s) realización(es) preferida(s).

10 Los sustituyentes opcionales pueden ser iguales o diferentes y, típicamente, se seleccionan independientemente de entre alquilo C<sub>1-3</sub>, ciclopropilo, alcoxi C<sub>1-3</sub>, CH<sub>2</sub>-alcoxi C<sub>1-3</sub>, arilo C<sub>6-10</sub>, -CH<sub>2</sub>-fenilo, halo, hidroxilo, hidroxialquilo C<sub>1-3</sub> y haloalquilo C<sub>1-3</sub>, por ejemplo, CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. En una realización, los sustituyentes opcionales se seleccionan independientemente de entre hidroxilo, metoxi, halo, metilo, etilo, propilo, ciclopropilo, CH<sub>2</sub>OH y CF<sub>3</sub>. En una realización, no hay sustituyentes opcionales.

15 El grupo As(OH)<sub>2</sub> puede estar *orto*, *meta* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo. En una realización, el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo. En otra realización, el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *orto* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo.

R<sup>1</sup> puede ser hidrógeno, metilo o etilo. En una realización, R<sup>1</sup> es hidrógeno.

20 R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> pueden ser iguales o diferentes. R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, alquenilo C<sub>2-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, haloalcoxi (C<sub>1-3</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>) y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>). En una realización preferida, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, metoxi, vinilo, CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub> y OCF<sub>3</sub>. En otra realización preferida, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, metilo y etilo. En otra realización, R<sup>2</sup> es metilo y R<sup>3</sup> es hidrógeno. En otra realización, ambos R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> son hidrógeno.

30 R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> pueden ser iguales o diferentes. R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, alquenilo C<sub>2-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, haloalcoxi (C<sub>1-3</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>) y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>). En una realización preferida, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, metoxi, vinilo, hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>), CF<sub>3</sub> y OCF<sub>3</sub>. En otra realización preferida, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se pueden seleccionar independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo y CH<sub>2</sub>OH. En otra realización, R<sup>4</sup> es metilo o etilo y R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo. En otra realización, R<sup>4</sup> es metilo y R<sup>5</sup> es hidrógeno. En otra realización, ambos R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son hidrógeno. En otra realización, ambos R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son metilo.

35 En una realización, m es 1 o 2. En otra realización, n es 1 o 2. En otra realización, ambos m y n son 1.

40 En una realización de los compuestos de fórmula (I), el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *orto* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo; R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, alquenilo C<sub>2-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, haloalcoxi (C<sub>1-3</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>) y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>); R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo C<sub>1-3</sub>, alquenilo C<sub>2-3</sub>, alcoxi C<sub>1-3</sub>, haloalcoxi (C<sub>1-3</sub>), hidroxialquilo (C<sub>1-3</sub>) y haloalquilo (C<sub>1-3</sub>); m es 1 o 2; y n es 1 o 2.

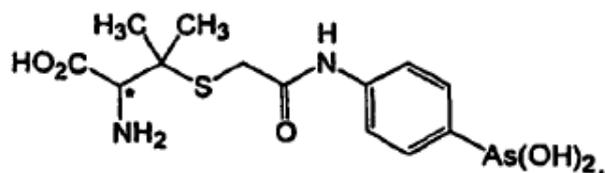
45 En otra realización de los compuestos de fórmula (I), el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *orto* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo; R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, metoxi, vinilo, CH<sub>2</sub>OH, CF<sub>3</sub> y OCF<sub>3</sub>; R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, CH<sub>2</sub>OH, metoxi, vinilo, CF<sub>3</sub> y OCF<sub>3</sub>; m es 1; y n es 1.

50 En otra realización más de los compuestos de fórmula (I), el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *orto* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo; R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, metilo y etilo; R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, metilo y etilo; m es 1; y n es 1.

55 En otra realización de los compuestos de fórmula (I), el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *orto* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo; R<sup>1</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>2</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>3</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>4</sup> es hidrógeno, metilo o etilo; R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo; m es 1; y n es 1.

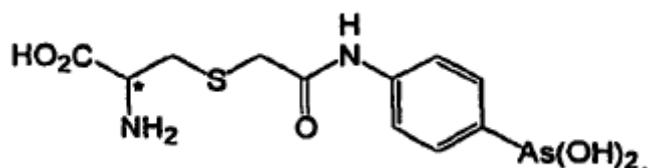
En otra realización de los compuestos de fórmula (I), el grupo As(OH)<sub>2</sub> está *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo; R<sup>1</sup> es hidrógeno; R<sup>2</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>3</sup> es hidrógeno; R<sup>4</sup> es hidrógeno o metilo; R<sup>5</sup> es hidrógeno o metilo; m es 1; y n es 1.

60 En una realización particular de la invención, el compuesto de fórmula (I) es:



Este compuesto se denomina en la presente memoria "penicilamina-arsenóxido".

5 En otra realización de la invención, el compuesto de fórmula (I) es:



Este compuesto se puede denominar en la presente memoria "cisteinil-fenilarsenóxido".

10

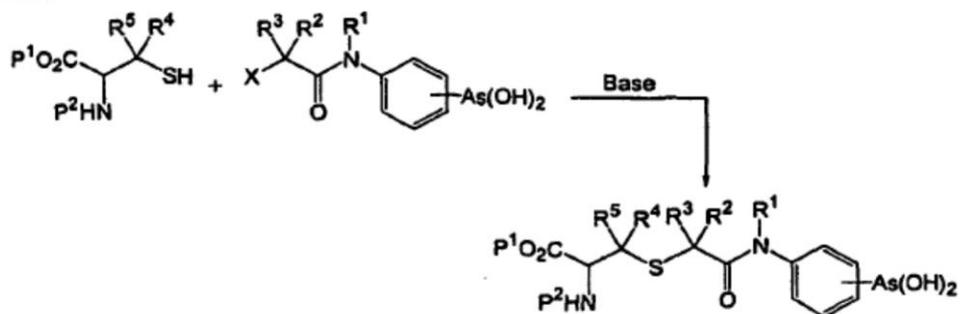
#### Síntesis de los compuestos de fórmula (I)

Los compuestos de fórmula (I) pueden ser preparados fácilmente por los expertos en la materia mediante métodos y materiales conocidos en la técnica y con referencia a libros de texto estándar tales como "Advanced Organic Chemistry" de Jerry March (tercera edición, 1985, John Wiley and Sons) o "Comprehensive Organic Transformations" de Richard C. Larock (1989, VCH Publishers).

15

A continuación, se muestra un esquema representativo para la preparación de los compuestos de fórmula (I):

**Esquema 1**



20

donde X es un grupo saliente, y P<sup>1</sup> y P<sup>2</sup> es hidrógeno o grupos protectores.

En el Esquema 1, X es un grupo saliente capaz de ser desplazado en una reacción nucleófila por un nucleófilo. Los grupos salientes adecuados incluyen halógenos tales como yodo, bromo y cloro. Los expertos en la materia conocerán otros grupos salientes adecuados. De acuerdo con la presente invención, el grupo nucleófilo puede ser un tiol. El -SH se puede desprotonar mediante una base, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, bicarbonato de sodio, carbonato de sodio, etc. El grupo amino y/o grupo de ácido carboxílico se pueden proteger. Los grupos protectores adecuados son conocidos por los expertos en la materia, y cabe hacer referencia a "Protective Groups in Organic Synthesis" de Theodora Greene y Peter Wuts (tercera edición, 1999, John Wiley and Sons).

30

En una estrategia de síntesis alternativa, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se pueden preparar mediante la escisión enzimática de un residuo de peptidilo de un compuesto de organoarsenóxido. La(s) enzima(s) adecuada(s) se puede(n) seleccionar dependiendo de la composición del residuo de peptidilo. Así pues, por ejemplo, cuando un compuesto de partida de organoarsenóxido comprende un residuo de tripéptido tal como glutatióna, los compuestos de fórmula (I) se pueden preparar mediante escisión enzimática del residuo de  $\gamma$ -glutamilo terminal con  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa (por ejemplo,  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa de tipo I de riñón ovino), seguido de la escisión del residuo de glicinilo con una aminopeptidasa (por ejemplo, aminopeptidasa de riñón porcino) para dejar un residuo de aminoácido cisteinilo.

35

La estereoquímica del átomo quiral indicado por \* en la fórmula (I) puede ser (R) o (S). La presente invención incluye las formas enantioméricamente puras de los compuestos de fórmula (I), mezclas de enantiómeros en cualquier proporción, así como racematos. En una realización de la invención, la estereoquímica del átomo quiral indicado por \* en la fórmula (I) es (R). En otra realización de la invención, la estereoquímica del átomo quiral indicado por \* en la fórmula (I) es (S).

En otra realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es (S)-penicilamina-arsenóxido. En otra realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es (R)-penicilamina-arsenóxido. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) comprende una mezcla de enantiómeros (R) y (S) de penicilamina-arsenóxido. En otra realización, la mezcla de enantiómeros (R) y (S) de penicilamina-arsenóxido es una mezcla racémica.

En una realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es (S)-cisteinil-fenilarsenóxido. En otra realización preferida de la invención, el compuesto de fórmula (I) es (R)-cisteinil-fenilarsenóxido. En otra realización, el compuesto de fórmula (I) comprende una mezcla de enantiómeros (R) y (S) de cisteinil-fenilarsenóxido. En otra realización, la mezcla de enantiómeros (R) y (S) de cisteinil-fenilarsenóxido es una mezcla racémica.

También se incluyen en el alcance de la presente invención todos los estereoisómeros, isómeros geométricos y formas tautoméricas de los compuestos de fórmula (I), incluyendo compuestos que presentan más de un tipo de isomería, y las mezclas de uno o más de los mismos. También se incluyen sales de adición de ácidos o bases donde el contraión es ópticamente activo, por ejemplo, *D*-lactato o *L*-lisina, o racémico, por ejemplo, *DL*-tartrato o *DL*-arginina.

Los isómeros *cis/trans* (*E/Z*) se pueden separar mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía y cristalización fraccionada.

Las técnicas convencionales para la preparación/el aislamiento de enantiómeros individuales incluyen síntesis quiral a partir de un precursor ópticamente puro adecuado o resolución del racemato (o el racemato de una sal o un derivado) usando, por ejemplo, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) quiral.

Como alternativa, se puede hacer reaccionar el racemato (o un precursor racémico) con un compuesto adecuado ópticamente activo, por ejemplo, un alcohol o, en el caso de que el compuesto de fórmula I contenga un resto ácido o básico, una base o ácido tal como 1-feniletilamina o ácido tartárico. La mezcla diastereomérica resultante se puede separar mediante cromatografía y/o cristalización fraccionada y convertir uno o ambos de los diastereoisómeros en el(los) enantiómero(s) puro(s) correspondiente(s) por medios bien conocidos por el experto.

Los compuestos quirales de la invención (y precursores quirales de los mismos) se pueden obtener en forma enantioméricamente enriquecida mediante cromatografía, típicamente HPLC, sobre una resina asimétrica con una fase móvil que consiste en un hidrocarburo, típicamente heptano o hexano, que contiene del 0 al 50% en volumen de isopropanol, típicamente del 2% al 20%, y del 0 al 5% en volumen de una alquilamina, típicamente el 0,1% de dietilamina. La concentración del eluato proporciona la mezcla enriquecida.

### Aplicación(es) terapéutica(s)

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención, y las sales e hidratos farmacéuticamente aceptables de los mismos, son capaces de unirse a los residuos de cisteína del translocador mitocondrial de nucleótidos de adenina (ANT) en células endoteliales proliferativas, induciendo de ese modo la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Por consiguiente, los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se pueden usar para inducir la detención de la proliferación y la muerte celular. Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I) pueden inducir selectivamente la MPT en células endoteliales proliferativas, en comparación con otras células tales como células tumorales. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades proliferativas.

Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I), tales como el penicilamina-arsenóxido y el cisteinil-fenilarsenóxido, pueden ser más eficaces que los compuestos de arsenóxido conocidos, incluyendo los compuestos de organo-arsenóxido divulgados en el documento WO 01/21628, tales como el compuesto 4-(*N*-(*S*-glutathionilacetil)amino)fenilarsenóxido ("GSAO"), en la inhibición de la proliferación celular (particularmente, la proliferación de las células endoteliales) y/o la reducción de la viabilidad de las células endoteliales. En el contexto de la presente invención, "la reducción de la viabilidad de las células endoteliales" puede incluir la muerte celular o la progresión hacia la muerte celular. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) pueden ser aproximadamente 5 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 75 veces o aproximadamente 100 veces más eficaces que el GSAO en la inhibición de la proliferación de las células endoteliales y/o la reducción de la viabilidad de las células endoteliales. En una realización particular, los compuestos de fórmula (I) son de aproximadamente 5 a 50 veces más eficaces que el GSAO en la inhibición de la proliferación y/o la reducción de la viabilidad de las células endoteliales. En otra realización, los compuestos de fórmula (I) son de aproximadamente 10 a 30 veces más eficaces que el GSAO en la inhibición de la proliferación y/o

la reducción de la viabilidad de las células endoteliales. En otra realización, los compuestos de fórmula (I) son de aproximadamente 20 a 25 veces más eficaces que el GSAO en la inhibición de la proliferación y/o la reducción de la viabilidad de las células endoteliales.

5 Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I), tales como el penicilamina-arsenóxido y el cisteinil-fenilarsenóxido, pueden ser más eficaces que los compuestos de arsenóxido conocidos, por ejemplo el GSAO, en la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT). Por ejemplo, el tiempo para la dilatación máxima media de mitocondrias aisladas puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces más rápido para los compuestos de fórmula (I) que para otros compuestos de arsenóxido tales como el GSAO. En una realización particular de los compuestos de la invención de fórmula (I), estos son de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces más rápidos en la inducción de la MPT que otros compuestos de arsenóxido tales como el GSAO. En otra realización, los compuestos de fórmula (I) son de aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces más rápidos en la inducción de la MPT que otros compuestos de arsenóxido tales como el GSAO. En otra realización, los compuestos de fórmula (I) son aproximadamente 4 veces más rápidos en la inducción de la MPT que otros compuestos de arsenóxido tales como el GSAO.

20 El aumento de la eficacia de inhibición de las células endoteliales proliferativas por parte de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se puede deber a una mayor acumulación en las células. Por ejemplo, los compuestos de fórmula (I) se pueden acumular en las células endoteliales a una velocidad más rápida que la de otros compuestos de arsenóxido tales como el GSAO. Por consiguiente, los compuestos de fórmula (I) pueden ser inhibidores más eficaces de la proliferación celular que otros compuestos de organo-arsenóxido tales como el GSAO.

25 Así pues, es posible tratar una enfermedad proliferativa celular en un vertebrado mediante la administración al vertebrado de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal o un hidrato del mismo, o una composición farmacéutica del mismo. Las células pueden ser células endoteliales. Los compuestos de fórmula (I) pueden ser selectivos de la proliferación de las células endoteliales. Los compuestos de fórmula (I) pueden presentar una mayor selectividad hacia las células proliferativas que el compuesto de GSAO. La enfermedad proliferativa puede ser cáncer, tal como tumores sólidos. En una realización particular, se pueden tratar tumores sólidos mediante la administración al vertebrado de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un hidrato del mismo, o una composición farmacéutica de los mismos. En realizaciones preferidas, el compuesto de fórmula (I) puede ser penicilamina-arsenóxido o cisteinil-fenilarsenóxido.

35 En otra realización, es posible inhibir la angiogénesis en un vertebrado mediante la administración al vertebrado de una cantidad eficaz de al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato del mismo, o una composición farmacéutica de los mismos.

40 En otra realización más de la invención, se puede usar al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un hidrato del mismo, o una composición farmacéutica de los mismos para inducir selectivamente la MPT en células proliferativas en un vertebrado. Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención pueden inducir la MPT mediante la unión a residuos de cisteína en el translocador de nucleótidos de adenina mitocondrial. El compuesto de fórmula (I) puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, por ejemplo, aproximadamente 4 veces más eficaz en la inducción de la MPT en células proliferativas que el compuesto de GSAO.

50 En otra realización de la invención, se puede usar al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal o un hidrato del mismo, o una composición farmacéutica de los mismos para inducir la apoptosis en células proliferativas en un mamífero. Los compuestos de fórmula (I) pueden inducir selectivamente la apoptosis en las células proliferativas en relación con las células normales. Los compuestos de fórmula (I) pueden ser más eficaces en la inducción de la apoptosis en las células proliferativas que el compuesto de GSAO.

55 Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención también pueden ser útiles para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (APL). El tratamiento actual de la APL es la terapia con ácido all-trans-retinoico (ATRA), que se dirige a la lesión molecular subyacente y conduce a la diferenciación de blastos leucémicos en granulocitos maduros (Reiter *et al.*, 2004). Sin embargo, el tratamiento con ATRA se asocia con el síndrome del ácido retinoico, que puede provocar la muerte. La recaída es también un problema. En pacientes que han recaído, el trióxido de arsénico se considera el tratamiento de elección (Reiter *et al.*, 2004). Sin embargo, los compuestos arsenicales inorgánicos, tales como el trióxido de arsénico, tienen varias desventajas cuando se usan en terapia. Por ejemplo, hace tiempo que los compuestos arsenicales inorgánicos tales como el trióxido de arsénico se consideran venenosos y carcinógenos cuando están presentes en el organismo a niveles que superan su capacidad para desintoxicar el metaloide. El trióxido de arsénico se administra por infusión intravenosa durante 2 h para minimizar los efectos secundarios, que incluyen la prolongación del intervalo QTc, el síndrome de diferenciación de APL, neuropatías periféricas, disfunción hepática y reacciones gastrointestinales (Evens *et al.*, 2004). Se necesitan compuestos arsenicales más seguros para el tratamiento de la APL, incluyendo la AML y el síndrome

mielodisplásico.

Por lo tanto, en otra realización más de la invención, se puede usar un compuesto de fórmula (I), o una sal o hidrato del mismo, o una composición farmacéutica de los mismos, para el tratamiento de la leucemia o del síndrome mielodisplásico en un vertebrado.

En una realización, la leucemia es leucemia promielocítica aguda (APL). En otra realización, la leucemia es leucemia aguda mieloide (AML). De acuerdo con la presente invención, los compuestos de fórmula (I) pueden ser al menos tan eficaces como el trióxido de arsénico en la inhibición de las células de APL. En una realización, los compuestos de fórmula (I) son más eficaces que el trióxido de arsénico en el tratamiento de la APL. Ventajosamente, los compuestos de fórmula (I) pueden presentar menos efectos secundarios que el trióxido de arsénico. Los compuestos de fórmula (I) pueden ser más eficaces que otros compuestos de organoarsenóxido, tales como GSAO, en el tratamiento de la APL, la AML y/o síndrome mielodisplásico.

Otra característica de los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es que pueden tener una reducida solubilidad en lípidos, por ejemplo, en comparación con el trióxido de arsénico. La hidrosolubilidad de los compuestos de fórmula (I) es tal que pueden tener una penetración reducida en los tejidos, restringiéndose principalmente al compartimiento intravascular. Por lo tanto, los compuestos de fórmula (I) pueden producir ventajosamente menos efectos secundarios que otros compuestos arsenicales tales como el trióxido de arsénico.

Las ventajas terapéuticas se pueden poner en práctica a través de regímenes de combinación. En la terapia de combinación, los respectivos agentes se pueden administrar simultánea o secuencialmente en cualquier orden. En consecuencia, los métodos de tratamiento de acuerdo con la presente invención pueden implicar la administración de uno o más compuestos de fórmula (I). El(los) compuesto(s) de fórmula (I) se puede(n) administrar en combinación con la terapia convencional, tal como radioterapia, quimioterapia, cirugía u otras formas de intervención médica. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, taxol, fluorouracilo, melfalán, cisplatino, oxaliplatino, alfa-interferón, vincristina, vinblastina, angiinhibinas, TNP-470, polisulfato de pentosano, factor plaquetario 4, angiostatina, LM-609, SU-101, CM-101, Techgalan, talidomida, SP-PO y similares. Otros agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como mostazas de nitrógeno, incluyendo mecloetamina, melfán, clorambucilo, ciclofosfamida e ifosfamida; nitrosoureas, incluyendo carmustina, lomustina, semustina y estreptozocina; alquil sulfonatos, incluyendo busulfán; triazinas, incluyendo dicarbazina; etieniminas, incluyendo tiotepa y hexametilmelamina; análogos de ácido fólico, incluyendo metotrexato; análogos de pirimidina, incluyendo 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina; análogos de purina, incluyendo 6-mercaptopurina y 6-tioguanina; antibióticos antitumorales, incluyendo actinomicina D; antraciclinas, incluyendo doxorubicina, bleomicina, mitomicina C y metramicina; hormonas y antagonistas de hormonas, incluyendo tamoxifén y cortiosteroides y agentes misceláneos, incluyendo cisplatino y brequinar, y regímenes tales como COMP (ciclofosfamida, vincristina, metotrexato y prednisona), etopósido, mBACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina y dexametasona) y PROMACE/MOPP (prednisona, metotrexato (w/leucovin rescue), doxorubicina, ciclofosfamida, taxol, etopósido/mecloretamina, vincristina, prednisona y procarbazona).

#### **Formulaciones farmacéuticas y/o terapéuticas**

Por lo general, para un uso médico, las sales de los compuestos de la presente invención serán sales farmacéuticamente aceptables, aunque se pueden usar otras sales en la preparación de los compuestos de la invención o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. "Sal farmacéuticamente aceptable" pretende significar aquellas sales que, dentro del alcance del juicio médico razonable, son adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin provocar toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y similares, y corresponden a una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I se pueden preparar mediante métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, por ejemplo, (i) hacer reaccionar un compuesto de fórmula I con el ácido o base deseado; (ii) eliminar un grupo protector lábil en medio ácido o básico de un precursor adecuado del compuesto de fórmula I o abrir el anillo de un precursor cíclico adecuado, por ejemplo, una lactona o lactama, usando el ácido o la base deseado o (iii) convertir una sal del compuesto de fórmula I en otra mediante reacción con un ácido o una base apropiado o por medio de una columna de intercambio iónico adecuada.

Típicamente, las tres reacciones se llevan a cabo en disolución. La sal resultante puede precipitar y recogerse por filtración o se puede recuperar por evaporación del disolvente. El grado de ionización de la sal resultante puede variar de completamente ionizada a casi no ionizada.

Así pues, por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas de los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden preparar 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 adecuadas de los compuestos de la presente invención

incluyen, por lo tanto, sales de adición de ácido.

5 S. M. Berge *et al.* describen detalladamente sales farmacéuticamente aceptables en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66:1-19. Las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y la purificación finales de los compuestos de la invención, o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, digluconato, ciclopentanopropionato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, 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, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato, y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina, incluyendo, pero sin limitación, amonio, tetraetilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, trietanolamina y similares.

10 Los modos convenientes de administración incluyen la inyección (subcutánea, intravenosa, etc.), administración oral, inhalación, aplicación transdérmica, cremas o geles o polvos tópicos, o administración rectal. En una realización, el modo de administración es parenteral. En otra forma de realización, el modo de administración es oral. Dependiendo de la vía de administración, la formulación y/o el compuesto puede estar revestido de un material para proteger al compuesto de la acción de las enzimas, los ácidos y otras condiciones naturales que puedan desactivar la actividad terapéutica del compuesto. El compuesto también se puede administrar por vía parenteral o intraperitoneal.

15 También se pueden preparar dispersiones de los compuestos de acuerdo con la invención en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, las preparaciones farmacéuticas pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Lo ideal es que la composición sea estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, pudiendo incluir un conservante para estabilizar la composición frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

25 El(los) compuesto(s) de la invención se puede(n) administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El(los) compuesto(s) y otros ingredientes también se pueden encerrar en una cápsula de recubrimiento de gelatina dura o blanda, comprimirse en comprimidos o incorporarse directamente en la dieta de un individuo. Para la administración terapéutica oral, el(los) compuesto(s) se puede(n) incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Adecuadamente, dichas composiciones y preparaciones pueden contener al menos el 1% en peso de principio activo. Como es evidente, se puede variar el porcentaje del(de los) compuesto(s) de fórmula (I) en composiciones y preparaciones farmacéuticas, pudiendo variar convenientemente, por ejemplo, del aproximadamente 2% al aproximadamente 90%, del aproximadamente 5% al aproximadamente 80%, del aproximadamente 10% al aproximadamente 75%, del aproximadamente 15% al aproximadamente 65%, del aproximadamente 20% al aproximadamente 60%, del aproximadamente 25% al aproximadamente 50%, del aproximadamente 30% al aproximadamente 45%, o del aproximadamente 35% al aproximadamente 45%, del peso de la unidad de dosis. La cantidad de compuesto de las composiciones terapéuticamente útiles es tal que se obtendrá una dosis adecuada.

30 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto, se contempla el uso del mismo en las composiciones, y los métodos de tratamiento y profilaxis terapéuticos. También se pueden incorporar principios activos suplementarios a las composiciones de acuerdo con la presente invención. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de dosis unitarias para facilitar la administración y uniformizar la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria", como se usa en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para el individuo que se vaya a tratar, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto(s) calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el vehículo farmacéutico requerido. El(los) compuesto(s) se puede(n) formular para la administración conveniente y eficaz en cantidades eficaces con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado en una dosis unitaria aceptable. En el caso de las composiciones que contienen ingredientes activos suplementarios, las dosis se determinan por referencia a la dosis y forma de administración habituales de dichos ingredientes.

35 En una realización, el vehículo es un vehículo que se puede administrar por vía oral.

Otra forma de composición farmacéutica es una forma de dosificación formulada en forma de gránulos, comprimidos o cápsulas con recubrimiento entérico adecuados para una administración oral.

También se incluyen en el alcance de la presente invención las formulaciones de liberación retardada.

5 Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la invención también se pueden administrar en forma de un "profármaco". Un profármaco es una forma inactiva de un compuesto que se transforma *in vivo* en la forma activa. Los profármacos adecuados incluyen ésteres, ésteres de fosfonato, etc. de la forma activa del compuesto.

10 En una realización, el compuesto de fórmula (I) se puede administrar por inyección. En el caso de las soluciones inyectables, el vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de

15 tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y/o antifúngicos. Los agentes adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, alcohol bencílico, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, puede ser preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se

20 puede conseguir incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del análogo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según

25 se requiera, seguida de la esterilización por filtración. En general, las dispersiones se preparan incorporando el análogo a un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y el resto de ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente.

Los comprimidos, trociscos, píldoras, cápsulas y similares también pueden contener lo siguiente: un aglutinante tal

30 como gragacanto, goma arábiga, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato dicálcico; un agente desintegrante tal como almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico y similares; un lubricante tal como estearato de magnesio; y un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, aceite de gaulteria o aroma de cereza. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido. Otros diversos materiales pueden estar

35 presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras o cápsulas pueden estar recubiertos de goma laca, azúcar o ambos. Un jarabe o elixir puede contener el análogo, sacarosa como agente edulcorante, metil- y propil-parabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante tal como aroma de cereza o naranja. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no

40 tóxico en las cantidades empleadas. Además, el análogo se puede incorporar en preparaciones y formulaciones de liberación sostenida.

Preferentemente, la composición farmacéutica puede incluir además un tampón adecuado para minimizar la hidrólisis ácida. Los agentes de tamponamiento adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia e

45 incluyen, pero sin limitación, fosfatos, citratos, carbonatos y mezclas de los mismos.

Se pueden llevar a cabo administraciones únicas o múltiples de los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Un experto en la materia sería capaz, mediante la experimentación

50 rutinaria, de determinar los niveles de dosis eficaces y no tóxicos del compuesto y/o de la composición de la invención, y un patrón de administración que fueran adecuados para el tratamiento de las enfermedades y/o infecciones en las que los compuestos y las composiciones son aplicables.

Además, será evidente para cualquier experto habitual en la materia que el curso óptimo de tratamiento tal como el

55 número de dosis del compuesto o de la composición de la invención dado al día durante un número definido de días, se puede determinar mediante el curso convencional de los ensayos de determinación de tratamientos.

En general, una dosis eficaz cada 24 horas puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a

60 aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal; por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal; o de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por

kg de peso corporal. Más adecuadamente, una dosis eficaz cada 24 horas puede estar en el intervalo de

aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a

65 aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal; de aproximadamente 5,0 mg a

aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal; o de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal.

5 Como alternativa, una dosis eficaz puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>. Por ejemplo, en general, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 25 a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, y aproximadamente 75 a aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>.

10 En otra realización, un compuesto de Fórmula (I) se puede administrar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 mg al día, por ejemplo, de aproximadamente 200 mg a aproximadamente 750 mg al día, de aproximadamente 250 a aproximadamente 500 mg al día, de aproximadamente 250 a aproximadamente 300 mg al día, o de aproximadamente 270 mg a aproximadamente 280 mg al día.

15 Los compuestos de acuerdo con la presente invención se pueden administrar como parte de un régimen terapéutico con otros fármacos. Puede ser deseable administrar una combinación de compuestos activos, por ejemplo, con el propósito de tratar una determinada enfermedad o afección. Por consiguiente, está dentro del alcance de la presente invención poderse combinar dos o más composiciones farmacéuticas, al menos una de las cuales contiene un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención, en forma de un kit adecuado para la administración conjunta de las composiciones.

20 A continuación, se describirá la invención más detalladamente, únicamente a modo ilustrativo, con respecto a los siguientes ejemplos. Los ejemplos pretenden servir para ilustrar la presente invención y no se deben interpretar como restrictivos de la generalidad de la divulgación de la descripción que figura a lo largo de la presente memoria.

25

## Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación y eficacia de (S)-penicilamina-arsenóxido ("PENAO")

30 Materiales y métodos

Síntesis y purificación del (S)-penicilamina-arsenóxido:

35 Se disolvió ácido *p*-arsanílico (10 g, 46,07 mmol) en una solución 1,18 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, preparada a partir de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15 g, 141,5 mmol) disuelto en H<sub>2</sub>O (120 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se enfrió la solución en un refrigerador a 4 °C durante 2 horas y luego se colocó en un baño de hielo sobre un agitador magnético. Se añadió una solución de bromuro de bromoacetilo (9 ml, 101,4 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (14 ml) en 4 alícuotas al matraz mientras se agitaba la mezcla vigorosamente. La adición duró aproximadamente 1 min, generándose CO<sub>2</sub>. Se dejó la mezcla en agitación en el baño de hielo durante 5 min, y luego a temperatura ambiente durante 30 min hasta que cesó la generación de CO<sub>2</sub>. Se decantó la mezcla en un embudo de decantación de 250 ml. Se añadió más CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se dejó que se separaran las capas durante aproximadamente 10 min. Se separó la capa de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se colocó la capa acuosa en un vaso de precipitados de 400 ml. Se agitó la solución y se acidificó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% (2,8 ml) a pH 4. Se produjo un precipitado blanco que se recogió por filtración (14,83 g, rendimiento del 95%). Se disolvió el ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzoarsónico ("BRAO") resultante (14,83 g, 43,88 mmol) en HBr/MeOH (1:1) (210 ml) en un matraz de fondo redondo de 3 bocas de 500 ml. Se añadió NaI (5 mg) y se agitó la mezcla. Se burbujeó SO<sub>2</sub> a aprox. 2 burbujas/segundo y tras 10 min, comenzó a formarse un precipitado blanco. Se burbujeó SO<sub>2</sub> a través durante otras 20 h más y se agitó la mezcla a una velocidad media. Se recogió el sólido por filtración, a continuación se lavó el filtrado con agua (30 ml x 3), y se colocó en el evaporador rotatorio a 50 °C durante 5 h, dando ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzoarsenioso (6,04 g, rendimiento del 38,8%). Se disolvió una porción del ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzoarsenioso (500 mg, 1,553 mmol) en DMSO purgado con nitrógeno (10 ml) y se añadió gota a gota durante aproximadamente 1 min a una solución de S-penicilamina (265 mg, 1,77 mmol) en una solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> (840 mg, 10 mmol) que usó H<sub>2</sub>O saturada de nitrógeno (20 ml). La adición se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 100 ml y la solución transparente se agitó a una velocidad baja en atmósfera de argón durante 4 h. Se acidificó la solución con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98% (aproximadamente 0,2 ml) a pH 5. Se agitó acetona (500 ml) vigorosamente, y se añadió la solución acidificada gota a gota durante aproximadamente 5 minutos, produciéndose un precipitado blanco. Se centrifugó el sobrenadante, se decantó, y luego se lavó el sólido blanco resultante y se volvió a centrifugar con acetona (20 ml x 2), se transfirió con acetona (40 ml) a un matraz en forma de pera de 100 ml y se secó en el evaporador rotatorio a 25 °C durante 2 h. Se encontró penicilamina-arsenóxido en bruto con un pureza del aproximadamente 30% mediante RMN de <sup>1</sup>H de un patrón interno.

60 Se disolvió el (S)-penicilamina-arsenóxido (100,2 mg, 0,077 mmol con pureza del 30%) en bruto en H<sub>2</sub>O saturada de nitrógeno (2,5 ml) y se purificó en un sistema de cromatografía de líquidos de baja presión. Las condiciones usadas fueron una columna de 30 cm con un radio interno de 1,25 cm, H<sub>2</sub>O saturada de nitrógeno como el tampón de procesamiento, resina Biogel P-2 y una velocidad de 0,25 ml/min. Se recogió el segundo pico en un tubo Falcon de 50 ml, se congeló en N<sub>2</sub> líquido, se liofilizó durante 3 días y se colocó en un desecador durante 1 día para producir (S)-penicilamina-arsenóxido puro seco (20,3 mg, 0,052 mmol). Se repitió el proceso con más porciones de

65

penicilamina-arsenóxido en bruto (696 mg en total) y esto produjo (S)-penicilamina-arsenóxido purificado (114 mg, rendimiento del 26,5%). La estructura de la (S)-penicilamina-arsenóxido (Fig. 1) se confirmó mediante MS, RMN de  $^1\text{H}$  y RMN 2D. La pureza obtenida fue del 90% en un ensayo de actividad de compuestos arsenicales. La impureza principal fue el agua, por lo que el producto final resultó ser sumamente higroscópico. El peso molecular del (S)-penicilamina-arsenóxido es 390,28 g/mol.

RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  1,32 (s, 3H), 1,53 (s, 3H), 3,55 (d, J = 3,4 Hz, 2H), 3,63 (s, 1H), 7,52 (d, J = 8,3 Hz, 2H), 7,68 (d, J = 8,3 Hz, 2H). El espectro de RMN protónico (Fig. 2) se registró en un espectrómetro de RMN de sonda de doble canal Bruker. El rápido tautomerismo cetoenólico y la posterior sustitución del deuterio produjo la pérdida del pico doblete a  $\delta$  3,5518, que se produjo durante 1 h. Esto se puede monitorizar mediante RMN dependiente del tiempo.

RMN de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ):  $\delta$  23,15; 26,83; 33,12; 46,75; 61,36; 121,62; 130,04; 139; 144; 170.

La estructura del (S)-penicilamina-arsenóxido también se confirmó mediante un experimento de HMBC (acoplamiento a múltiples enlaces de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  bidimensional, véase la Fig. 3).

MS: m/z 413,011678 (M+Na)<sup>+</sup> ( $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{SO}_5\text{N}_2\text{AsNa}$  requiere 413,012285). (Fig 4)

#### Síntesis de ácido penicilamina-arsónico

Se disolvió ácido *p*-arsanílico (10 g, 46,07 mmol) en una solución 1,18 M de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , preparada a partir de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (15 g, 141,5 mmol) disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$  (120 ml) en un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se enfrió la solución en un refrigerador a 4 °C durante 2 horas y luego se colocó en un baño de hielo sobre un agitador magnético. Se añadió una solución de bromuro de bromoacetilo (9 ml, 101,4 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (14 ml) en 4 alícuotas al matraz mientras se agitaba la mezcla vigorosamente. La adición duró aproximadamente 1 min, generándose  $\text{CO}_2$ . Se dejó la mezcla en agitación en el baño de hielo durante 5 min, y luego a temperatura ambiente durante 30 min hasta que cesó la generación de  $\text{CO}_2$ . Se decantó la mezcla en un embudo de decantación de 250 ml. Se añadió más  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml) y se dejó que se separan las capas durante aproximadamente 10 min. Se separó la capa de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se colocó la capa acuosa en un vaso de precipitados de 400 ml. Se agitó la solución y se acidificó con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% (2,8 ml) a pH 4. El ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzoarsónico precipitado blanco ("BRAO") se recogió por filtración (14,83 g, rendimiento del 95%).

Se disolvió una porción de ácido 4-(2-bromoacetilamino)benzoarsónico (500 mg, 1,479 mmol) en solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  (420 mg, 4,999 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml) y se añadió gota a gota durante aproximadamente 1 min a una solución de (S)-penicilamina (265 mg, 1,77 mmol) en una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$  (640 mg, 7,618 mmol) en  $\text{H}_2\text{O}$  (15 ml). La adición se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 100 ml y la solución transparente se agitó a una velocidad baja durante 4 h. Se acidificó la solución con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% (aproximadamente 0,25 ml) a pH 5. Se agitó vigorosamente una solución de acetona:etanol (1:1) (500 ml), y se añadió la solución acidificada gota a gota durante aproximadamente 5 minutos, produciéndose un precipitado blanco. Se centrifugó el sobrenadante, que se decantó, y luego se lavó el sólido blanco resultante y se volvió a centrifugar con acetona:etanol (1:1) (25 ml x 2), se transfirió con acetona:etanol (1:1) (50 ml) a un matraz en forma de pera de 100 ml y se secó en el evaporador rotatorio a 25 °C durante 2 h. Se encontró que el ácido (S)-penicilamina-arsónico resultante tenía una pureza del aproximadamente 44% mediante espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  de un patrón interno y se usó sin purificación adicional (1,022 g, rendimiento del 75%). La estructura del ácido (S)-penicilamina-arsónico se confirmó mediante MS, RMN de  $^1\text{H}$  y RMN 2D. La impureza principal fue agua, por lo que el producto final resultó ser sumamente higroscópico. El peso molecular fue de 406,28 g/mol.

El GSAO se preparó como se ha descrito previamente (Don *et al.*, 2003)-

Se preparó una solución 1 M de trióxido de arsénico disolviendo el sólido (Sigma, St. Louis, MO) en  $\text{NaOH}$  3 M preparado en agua desoxigenada. Se diluyó la solución 10 veces en agua desoxigenada, se ajustó el pH a 7,0 usando  $\text{HCl}$  y se almacenó a 4 °C en un recipiente hermético hasta su uso.

#### Análisis de los compuestos arsenicales

Se disolvió (S)-penicilamina-arsenóxido en el tampón de valoración, se filtró en condiciones estériles y se determinó la concentración por valoración con dimercaptopropanol y calculando los tioles libres restantes con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico). Se almacenó la solución a 4 °C en la oscuridad hasta su uso. No hubo pérdida significativa de la concentración activa de las soluciones madre de los compuestos arsenicales durante al menos un mes cuando se almacenaron en estas condiciones.

#### Ensayo de dilatación mitocondrial

Se aislaron mitocondrias de los hígados de ratas Wistar macho de ~250 g mediante centrifugación diferencial como se ha descrito previamente (Dilda *et al.*, 2005a; Don *et al.*, 2003). Se volvió a suspender el sedimento mitocondrial

final en tampón de HEPES-KOH 3 mM a pH 7,0 que contenía manitol 213 mM, sacarosa 71 mM y succinato sódico 10 mM a una concentración de 30 mg de proteína por ml. Se analizó la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial espectrofotométricamente mediante la suspensión de las mitocondrias de hígado a 0,5 mg de proteína por ml a 25 °C en tampón de HEPES-KOH 3 mM a pH 7,0 que contenía manitol 75 mM, sacarosa 250 mM, succinato de sodio 10 mM y rotenona 2  $\mu$ M. Se midió la dilatación mediante el control de la disminución de la dispersión de la luz asociada a 520 nm con un lector de microplacas SpectraMax Plus (Molecular Devices, Palo Alto, CA).

#### Cultivo celular

Las células BAE se adquirieron en Cell Applications, San Diego, CA, y las células BxPC-3, HT1080, LLC, PANC-1, MCF-7, HCT116 y K562, en ATCC, Bethesda, MD. Las células NB4 y MDCK2 se adquirieron en Shane Supple (Kanematsu Laboratories, Royal Prince Alfred Hospital, Sidney, Australia) y P. Borst (Instituto del Cáncer de Holanda, Amsterdam, Países Bajos). Las células BAE, HT1080, Panc-1, MCF-7, HCT116, MDCK2 y LLC se cultivaron en DMEM. Las células NB4, K562 y BxPC-3 se cultivaron en medio RPMI. Las células fueron suplementados con suero bovino fetal al 10% (FBS), L-glutamina 2 mM de y 1 U x ml<sup>-1</sup> de penicilina/estreptomicina. El cultivo de células plasticware se adquirió en Techno Plastic Products (Trasadingen, Suiza). Todos los demás reactivos de cultivo de células se adquirieron en Gibco (Gaithersburg, MD).

#### Ensayos de proliferación y viabilidad celular

Se sembraron células BAE, NB4, K562, MDCK2, HT1080, LLC, HCT116, Panc-1, MCF-7 y BxPC-3 a una densidad de 1,5 x 10<sup>3</sup>, 3 x 10<sup>3</sup>, 4 x 10<sup>3</sup>, 5 x 10<sup>2</sup>, 2 x 10<sup>3</sup>, 5 x 10<sup>2</sup>, 5 x 10<sup>2</sup>, 6 x 10<sup>3</sup>, 6 x 10<sup>3</sup> y 1 x 10<sup>4</sup> células por pocillo, respectivamente, en placas de 96 pocillos. Se permitió la adhesión de las células adherentes durante una noche. Luego se cultivaron durante 72 h en medio que contenía suero bovino fetal al 10% y (S)-penicilamina-arsenóxido. Se determinaron las células viables mediante la incubación de las células con la sal de tetrazolio MTT (Sigma, St. Louis, MO), que es metabolizada por las células viables para formar cristales de formazán de color púrpura insolubles. Se añadió DMSO para lisar las células, se homogeneizaron los contenidos de los pocillos y se midió la absorbancia a 550 nm. Se normalizó el número de células del control sin tratar como el 100%, y se expresó el número de células viables para todos los tratamientos como el porcentaje del control. Se analizaron los efectos citotóxicos del (S)-penicilamina-arsenóxido mediante citometría de flujo con yoduro de propidio. Se sembraron células BAE a una densidad de 5 x 10<sup>4</sup> células por pocillo en placas de 12 pocillos, se permitió su adhesión durante una noche y después se trataron durante 48 h con GSAO. Se desprendieron las células adherentes con tripsina/EDTA y se combinaron con el medio de cultivo que contenía las células que se habían separado durante el tratamiento. Se sedimentaron las células combinadas, se volvieron a suspender en 0,5 ml de medio libre de suero que contenía 1  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de yoduro de propidio (Molecular Probes, Eugene, OR.) y se analizaron por citometría de flujo.

#### Flujo de (S)-penicilamina-arsenóxido

Se sembraron células BAE a una densidad de 1,5 x 10<sup>6</sup> células en placas de Petri y se permitió su adhesión durante la noche. Se incubaron las células con (S)-penicilamina-arsenóxido 50  $\mu$ M en diferentes periodos de tiempo durante un máximo de 2 horas a 37 °C y luego se lavaron tres veces con PBS enfriado en hielo. Se lisaron las células lavadas en 1 ml de ácido nítrico p/p al 70%. Luego se lavaron las placas de Petri dos veces con 1 ml de PBS y se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Se diluyeron las muestras 10 veces y se analizaron los átomos de arsénico con un espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo Elan 6100 (Perkin Elmer Sciex Instruments, Shelton, CT).

Estudios del polipéptido transportador de aniones orgánicos (OATP). Se sembraron 750.000 células BAE en placas de 6 pocillos que contenían DMEM con suero bovino fetal al 10% y se permitió su adhesión durante una noche. Se pretrataron las células o no con 4,4'-diisotiocianoestilbena-2,2'-disulfónico (DIDS) 500  $\mu$ M durante 30 min y después se incubaron con (S)-penicilamina-arsenóxido 20  $\mu$ M durante 2 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo y se lisaron con ácido nítrico al 70%. Se determinaron los niveles de arsénico celulares mediante ICP-MS. Se sembraron 5.000 células BAE en placas de 96 pocillos que contenían DMEM con suero bovino fetal al 10% y se permitió su adhesión durante una noche. Se pretrataron las células o no con DIDS 300  $\mu$ M durante 30 min y luego se incubaron con (S)-penicilamina-arsenóxido 1,5  $\mu$ M durante 24 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se determinó la viabilidad celular mediante MTT.

Transfectantes de transportador de fármacos. Los transfectantes de la línea de células epiteliales polarizadas de riñón canino II (MDCKII) de Madin-Darby, que sobreexpresan proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP) 1, 2 o 3, se han descrito (Evers *et al.*, 2000; Kool *et al.*, 1999), al igual que la MDR1 o BCRP humanas que sobreexpresan el clon H4 de MEF/MDR1 (Dilda *et al.*, 2005b). Se sembraron las células y se mantuvieron en forma de monocapas adherentes en DMEM que contenía suero bovino al 10% (Cosmic™, Hyclone, Tauranga, Nueva Zelanda), 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de penicilina y 60  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> de estreptomicina. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron como se ha descrito previamente (Allen *et al.*, 1999).

Ensayos de crecimiento del tumor primario. Se usaron ratones atímicos Balb C hembra de 7-9 semanas de vida

(Centro de Recursos Biológicos UNSW). Se mantuvieron los ratones en grupos de 3 a 5 en un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, y se les administró pienso y agua *ad libitum*. Se inyectó una suspensión de  $2 \times 10^6$  células BxPC-3 en 0,2 ml de PBS por vía subcutánea en la línea media proximal. Se dejó que los tumores se establecieran y crecieran hasta un tamaño de  $\sim 50 \text{ mm}^3$ , tras lo que se repartieron aleatoriamente en cuatro grupos. Se calculó el volumen del tumor mediante la relación de longitud x altura x anchura x 0,523. Se calculó el tiempo de duplicación del tumor ( $T_D$ ) a partir de la curva de tasa de crecimiento tumoral durante el crecimiento exponencial con la fórmula  $T_D = 0,693/\ln(V_F/V_I)$ , donde  $V_F$  es el volumen final del tumor y  $V_I$  es el volumen del tumor inicial (Wolff *et al.*, 2004). Se implantaron a los animales bombas micro-osmóticas modelo 1004 Alzet de 28 días (Alza Corporation, Palo Alto, CA) por vía subcutánea en la ijada. Las bombas administraron 0,25, 0,5 o 1 mg/ kg/día de (S)-penicilamina arsenóxido en glicina 100 mM. Se midieron el volumen del tumor y el peso del animal cada 2 o 3 días.

#### Análisis estadísticos

Los resultados se presentan como las medias  $\pm$  DE. Todas las pruebas de relevancia estadística fueron dobles, y los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente relevantes.

#### **Resultados y análisis**

##### El (S)-penicilamina-arsenóxido inhibe la proliferación de células de mamífero

Los valores publicados de  $CI_{50}$  para la detención de la proliferación y la pérdida de viabilidad de las células endoteliales de aorta bovina (BAE) inducidas por GSAO son  $10 \mu\text{M}$  y  $75 \mu\text{M}$ , respectivamente (Dilda *et al.*, 2005a; Don *et al.*, 2003). La  $CI_{50}$  para detener la proliferación de las células BAE es de  $0,4 \mu\text{M}$  para el (S)-penicilamina-arsenóxido (Fig. 5) en comparación con  $10 \mu\text{M}$  para el GSAO, mientras que el valor de  $CI_{50}$  para la pérdida de viabilidad es de  $3,5 \mu\text{M}$  (Fig. 6). Por lo tanto, el (S)-penicilamina-arsenóxido es  $\sim 25$  veces más eficaz que el GSAO en el bloqueo de la proliferación y la reducción de la viabilidad de las células endoteliales.

El (S)-penicilamina-arsenóxido es un inhibidor selectivo de las células endoteliales frente a las células tumorales. En la Tabla 1, se muestra la comparación de la  $CI_{50}$  para la detención de la proliferación de las células endoteliales y epiteliales en comparación con ocho líneas de células tumorales diferentes. Todas las células tumorales analizadas fueron de 1,6 a 30 veces más resistentes al (S)-penicilamina-arsenóxido que las células endoteliales. Las células BAE también fueron 5,6 veces más sensibles al (S)-penicilamina-arsenóxido que las células epiteliales de riñón. El (S)-penicilamina-arsenóxido es equivalente al trióxido de arsénico en sus efectos sobre las células APL, mientras que el GSAO es  $\sim 10$  veces menos activo (Fig. 7).

Tabla 1. Valores de  $CI_{50}$  del (S)-penicilamina-arsenóxido para la detención de la proliferación de diversas líneas celulares

Tipo de célula	Línea celular	$CI_{50}$ , $\mu\text{M}$
Endotelial aórtica bovina	BAEC	0,43
Leucemia promielocítica aguda humana	NB4	0,70
Leucemia mielógena crónica humana	K562	1,4
Epitelial de riñón canino	MDCK2	2,4
Fibrosarcoma humano	HT1080	4,0
Carcinoma de pulmón humano	LLC	5,0
Carcinoma colorrectal humano	HCT1116	6,0
Carcinoma pancreático humano	PANC-1	6,5
Carcinoma de mama humano	MCF-7	9,0
Carcinoma pancreático humano	BxPC-3	13

El (S)-penicilamina-arsenóxido también es más eficaz que el GSAO en la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial. El (S)-penicilamina-arsenóxido, como el GSAO, provocaron la dilatación de las mitocondrias aisladas de hígado de rata de una manera dependiente del tiempo y de la concentración (Fig. 8). La duración de la dilatación media-máxima de las mitocondrias aisladas fue aproximadamente 4 veces más rápida para el (S)-penicilamina-arsenóxido que para el GSAO.

Sin el deseo de quedar vinculados a ninguna teoría en particular, un posible mecanismo para el aumento de la actividad antiproliferativa del (S)-penicilamina-arsenóxido en comparación con el GSAO fue el aumento de la acumulación en las células. Esta teoría se probó comparando la absorción de los dos compuestos en las células endoteliales mediante la medición de la acumulación celular del arsénico. El (S)-penicilamina-arsenóxido se acumuló en las células BAE a una velocidad aproximadamente 70 veces superior a la del GSAO (Fig. 9). Las velocidades iniciales de acumulación del GSAO y el (S)-penicilamina-arsenóxido fueron de 1 y 69 pmol por  $10^6$  células por min,

respectivamente.

El OATP está implicado en el transporte de la (S)-penicilamina a través de la membrana plasmática

5 El DIDS es un inhibidor del polipéptido de transporte de aniones orgánicos a través de la membrana plasmática (OATP) (Kobayashi *et al.*, 2003). El hallazgo de que este compuesto inhibe la absorción del (S)-penicilamina-arsenóxido (Fig. 10A) y reduce su actividad antiproliferativa (Fig. 10B) en células BAE implica que este transportador participa en la absorción del (S)-penicilamina-arsenóxido en estas células.

10 El (S)-penicilamina-arsenóxido es exportado desde la célula por MRP1 y 2

MRP1/2 media la exportación de GSAO desde las células BAE (Dilda *et al.*, 2005b). El penicilamina-arsenóxido también es un sustrato para MRP1/2. Se acumuló más (S)-penicilamina-arsenóxido en las células BAE en presencia de los inhibidores de MRP1/2 4H10 y MK-571 (Fig. 11A), lo que se correlacionó con un efecto antiproliferativo más potente (Fig. 11B). Los inhibidores solos no tuvieron ningún efecto sobre la proliferación de células BAE (datos no mostrados).

Se analizó la resistencia de las células de mamífero que sobreexpresan MRP1, 2, 3 o 6, o MDR1 o BCRP al (S)-penicilamina-arsenóxido. MRP1, MRP2 o MRP3 se sobreexpresaron en la línea celular epitelial de riñón canino MDCKII, mientras que MRP6, MDR1 o BCRP se sobreexpresaron en la línea de fibroblastos de embrión murino MEF3.8. Se expusieron las células a las concentraciones indicadas de (S)-penicilamina-arsenóxido durante 96 h, y se midió y expresó el número de células viables en relación con el número de células no tratadas. El factor de resistencia se calcula en relación con la  $CI_{50}$  del (S)-penicilamina-arsenóxido para la detención de la proliferación de las células parentales no transfectadas.

25 Tabla 2. Resistencia de las células de mamífero que sobreexpresan diferentes transportadores de fármacos al (S)-penicilamina-arsenóxido

Transportador	Factor de resistencia
MD/MRP1	3,7
MD/MRP2	4,6
MD/MRP3	0,8
MEF/MRP6	1,3
MEF/MDR1	1,2
MEF/BCRP	1,1

30 Estos resultados indican que tanto el GSAO como el (S)-penicilamina-arsenóxido son exportados de las células BAE por MRP1/2.

El tratamiento de las células BAE con glutatona redujo la inhibición por parte del GSAO de la proliferación de células BAE, mientras que el bloqueo de la síntesis *de novo* de la glutatona con sulfoximina de butionina (BSO), un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetasa, aumentó la detención de la proliferación en casi 100 veces (Dilda *et al.*, 2005b). Estos resultados indicaron que MRP1/2 requiere glutatona celular para el transporte eficaz de GSAO desde la célula. De manera similar a los hallazgos encontrados con el GSAO, el tratamiento de las células BAE con BSO mejoró la  $CI_{50}$  del (S)-penicilamina-arsenóxido para la detención de la proliferación en aproximadamente 25 veces (Fig. 12).

40 Estos resultados indican que el (S)-penicilamina-arsenóxido es un inhibidor más eficaz de las células endoteliales, ya que se acumula en las células a una velocidad mucho mayor que el GSAO.

45 Actividad antitumoral del (S)-penicilamina-arsenóxido

Se implantaron a ratones atímicos BalbC portadores de tumores subcutáneos de carcinoma pancreático humano BxPC-3 en la línea media proximal bombas microosmóticas Alzet de 28 días por vía subcutánea en la ijada. Las bombas administraron 0,25, 0,5 o 1 mg por kg al día de (S)-penicilamina-arsenóxido. El crecimiento de los tumores BxPC-3 se inhibió significativamente en los ratones que recibieron (S)-penicilamina-arsenóxido (Fig. 13). Los tiempos de duplicación tumoral fueron de 9,2; 8,3; 13,9 y 16,2 días para los grupos tratados con vehículo (glicina 100 mM) o 0,25, 0,5 y 1 mg/kg/día de (S)-penicilamina-arsenóxido, respectivamente.

No hubo ningún cambio en el peso de los animales tratados con vehículo frente a los tratados con (S)-penicilamina-arsenóxido (no se muestra). Se produjo cierta toxicidad de la piel de la zona de administración de la bomba en los animales de dosis más alta. No hubo necrosis cutánea en la zona de la administración en 3 de los 10 ratones y en 1 ratón hubo una acumulación de tejido conjuntivo. Hubo algunas pruebas de acumulación de tejido conjuntivo en la

zona de la administración en el ratón de manera ocasional a las dosis inferiores de (S)-penicilamina-arsenóxido.

## **Ejemplo 2: Preparación y eficacia de ácido 4-(N-(S-cisteinilacetil)amino)-fenilarsenioso ("CAO")**

### **5 Materiales y métodos**

#### Ensayo de proliferación celular

Las células endoteliales aórticas bovinas (BAE) se adquirieron en Cell Application (San Diego, CA). Las células BAE se cultivaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, L-glutamina 2 mM y 5 unidades por ml de penicilina y estreptomycin (Gibco, Gaithersburg, MD). Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de aire al 95% y de CO<sub>2</sub> al 5%. Se sembraron células BAE en placas de 96 pocillos (5.000 células por pocillo) en 0,2 ml de medio de cultivo. Tras 24 h de crecimiento, se reemplazó el medio por medio de cultivo recién preparado suplementado con GSAO, CAO o 4H10 y se cultivaron las células durante otras 24, 48 o 72 h más. Se determinaron las células unidas viables mediante sal de tetrazolio MTT (Sigma, St. Louis, Mo.) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados se expresaron como el porcentaje de los controles no tratados.

#### Preparación del CAO

Se produjo GSAO como se ha descrito previamente (documento WO 01/21628) a una pureza de > 94% por HPLC. Se preparó una solución 50 mM de GSAO mediante la disolución del sólido en tampón de Hepes 20 mM, pH 7,0 que contenía NaCl 0,14 M, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Se produjo ácido 4-(N-(S-cisteinilglucilacetil)amino)fenilarsenioso mediante la escisión del grupo  $\gamma$ -glutamilo de GSAO con  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa de tipo I renal ovina (Sigma, número de producto G8040) (Fig. 14). Se incubó una solución 10 mM de GSAO con 0,55 unidades por ml de  $\gamma$ -GT en tampón de Tris 15 mM, pH 7,4 que contenía glicil-glicina 40 mM durante 1 hora a 30 °C. Se retiró la  $\gamma$ -GT de la reacción por filtración usando una membrana YM3 Microcon (Millipore, Billerica, MA).

Se produjo ácido 4-(N-(S-cisteinilacetil)amino)fenilarsenioso (CAO) mediante la escisión del aminoácido glicina del ácido 4-(N-(S-cisteinilglicilacetil)amino)fenilarsenioso con aminopeptidasa N renal porcina (Tipo IV-S, Sigma, número de producto L5006) (Fig. 14). Se incubó el filtrado con 2 unidades por ml de aminopeptidasa N durante 1 hora a 37 °C. Se retiró la aminopeptidasa N de la reacción por filtración usando una membrana YM3 Microcon (Millipore). Se midió la concentración de CAO mediante valoración con dimercaptopropanol y el cálculo de los tioles libres restantes con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Don *et al.*, 2003). Se filtraron en condiciones estériles las soluciones valoradas y se almacenaron a 4 °C en la oscuridad hasta su uso.

#### Análisis de HPLC

Se caracterizaron el GSAO y CAO por HPLC (Serie 1200; Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se resolvieron las muestras en una columna Eclipse XDB-C18 de Zorbax (4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies) usando una fase móvil de acetonitrilo-agua (25:75 v/v), caudal de 0,5 ml x min<sup>-1</sup> y detección por absorbancia a 256 nm (Fig. 15).

#### Acumulación de GSAO y CAO en células BAE

En función del tipo de experimentos, se sembraron 1,6 x 10<sup>6</sup> o 7,5 x 10<sup>5</sup> células BAE en placas de Petri o en placas de 6 pocillos, respectivamente, y dejó que se unieran durante toda la noche. Se reemplazó el medio y se incubaron las células durante 30 min en ausencia o presencia de acivicina o 4H10. Se incubaron las células con GSAO o CAO 50 o 100  $\mu$ M durante 30 min a 4 h. Se lavaron las células dos veces con PBS enfriado en hielo y se lisaron con 1 ml de ácido nítrico al 70% p/p. Se diluyeron los lisados 30 veces y se analizaron los átomos de arsénico con un espectrómetro de plasma de acoplamiento inductivo Elan 6100 (Perkin Elmer Sciex Instruments, Shelton, CT).

Ensayo de dilatación mitocondrial. Se aislaron mitocondrias a partir de los hígados de ratones atímicos BalbC hembra de ~20 g usando centrifugación diferencial como se ha descrito previamente (Dilda *et al.*, 2005a). Se volvió a suspender el sedimento mitocondrial final en tampón de Hepes-KOH 3 mM a pH 7,0 que contenía manitol 213 mM, sacarosa 71 mM y succinato sódico 10 mM a una concentración de 30 mg de proteína por ml. Se analizó la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial espectrofotométricamente mediante la suspensión de las mitocondrias de hígado a 1 mg de proteína por ml a 37 °C en tampón de Hepes-KOH 3 mM a pH 7,0 que contenía manitol 75 mM, sacarosa 250 mM, succinato de sodio 10 mM y rotenona 2 mM (Dilda *et al.*, 2005a). Se midió la dilatación mediante el control de la disminución de la dispersión de la luz asociada a 520nm con un lector de microplacas M2 de Molecular Devices (Palo Alto, CA).

### **Resultados y análisis**

El CAO se acumula más rápidamente en las células y tiene mayor actividad antiproliferativa que el GSAO.

65

Se produjo ácido 4-(N-(S-cisteinilacetil)amino)fenilarsenioso (CAO) por escisión enzimática de GSAO y su acumulación en las células endoteliales y se midieron los efectos sobre la proliferación celular. Se produjo ácido 4-(N-(S-cisteinilglicilacetil)amino)-fenilarsenioso mediante la escisión del grupo  $\gamma$ -glutamilo de GSAO con  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa renal ovina, y se produjo ácido 4-(N-(S-cisteinilacetil)amino)-fenilarsenioso (CAO) mediante la escisión del aminoácido glicina de este compuesto intermedio con aminopeptidasa N renal porcina (Fig. 14). Se eliminaron las enzimas de las reacciones por filtración de exclusión por tamaño.

El CAO se acumuló en las células endoteliales a una velocidad de  $\sim 8$  veces mayor que la del GSAO (Fig. 16A). La acumulación celular de estos metabolitos es un equilibrio entre la velocidad de absorción y la velocidad de exportación de la célula. La acumulación de GSAO en las células está controlada por la velocidad de exportación por las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP) 1 y 2 (Dilda *et al.*, 2005b). Para probar si el CAO también es exportado por MRP, se midió el efecto del inhibidor de MRP-1, 4H10, en la acumulación en las células endoteliales. Se aumentó la acumulación celular de CAO  $\sim 3$  veces, respectivamente, cuando se inhibió MRP-1 (Fig. 16B). Este hallazgo implica que el aumento de la acumulación de CaO en las células endoteliales se debe en mayor medida al aumento de la velocidad de absorción.

Se prevé que la velocidad más rápida de acumulación de CaO en las células endoteliales produce un aumento de la actividad antiproliferativa. En la Fig. 16C, se muestra la  $CI_{50}$  para la detención de la proliferación de las células endoteliales por GSAO y CAO en ensayos de 24, 48 y 72 h. Es evidente a partir de los resultados que la  $CI_{50}$  para el GSAO disminuye notablemente con el tiempo de incubación y mucho menos para el CAO. Por ejemplo, la  $CI_{50}$  de GSAO a las 72 h es similar a la  $CI_{50}$  de CAO a las 24 h.

El CAO desencadena la transición de la permeabilidad mitocondrial.

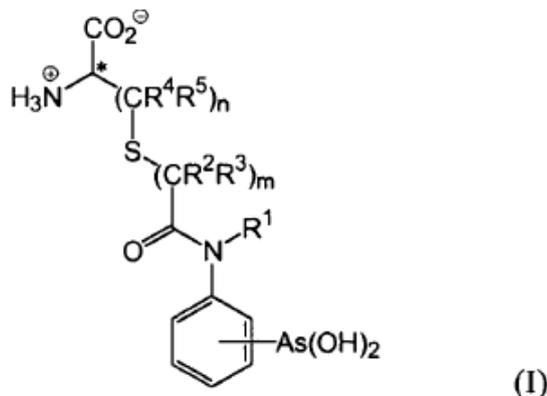
Se ha observado que el GSAO desactiva el transportador de la membrana mitocondrial interna translocasa de nucleótidos de adenina (ANT), lo que conduce a la detención de la proliferación y a la muerte celular (Don *et al.*, 2003). El CAO también induce la transición de la permeabilidad mitocondrial (Fig. 17).

## Referencias

- Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J., y Schinkel, A. H. (1999). "The mouse Bcrp1/Mxr/Abcp gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin". *Cancer Res* 59, 4237-4241.
- Dilda, P. J., Decollogne, S., Rossiter-Thornton, M., y Hogg, P. J. (2005a). "Para to ortho repositioning of the arsenical moiety of the angiogenesis inhibitor 4-(N-(S-glutathionylacetyl)amino)phenylarsenoxide results in a markedly increased cellular accumulation and antiproliferative activity". *Cancer Res* 65, 11729-11734.
- Dilda, P. J., Don, A. S., Tanabe, K. M., Higgins, V. J., Allen, J. D., Dawes, I. W., y Hogg, P. J. (2005b). "Mechanism of selectivity of an angiogenesis inhibitor from screening a genome-wide set of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains". *J Natl Cancer Inst* 97, 1539-1547.
- Don, A. S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., Creighton, B., Flynn, E., Folkman, J., y Hogg, P. J. (2003). "A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells". *Cancer Cell* 3, 497-509.
- Evens, A. M., Tallman, M. S., y Gartenhaus, R. B. (2004). "The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present, y future". *Leuk Res* 28, 891-900.
- Evers, R., Kool, M., Smith, A. J., van Deemter, L., de Haas, M., y Borst, P. (2000). "Inhibitory effect of the reversal agents V-104, GF120918 and Pluronic L61 on MDR1 Pgp-, MRP1- y MRP2-mediated transport". *Br J Cancer* 83, 366-374.
- Kobayashi, D., Nozawa, T., Imai, K., Nezu, J., Tsuji, A., y Tamai, I. (2003). "Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane". *J Pharmacol Exp Ther* 306, 703-708.
- Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G. L., de Vree, J. M., Smith, A. J., Jansen, G., Peters, G. J., Ponne, N., Scheper, R. J., *et al.* (1999). "MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs". *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 96, 6914-6919.
- Reiter, A., Lengfelder, E., y Grimwade, D. (2004). "Pathogenesis, diagnosis and monitoring of residual disease in acute promyelocyte leukaemia". *Acta Haematol* 112, 55-67.
- Vey, N. (2004). "Arsenic trioxide for the treatment of myelodysplastic syndromes". *Expert Opin Pharmacother* 5, 613-621.
- Wolff, N. C., Randle, D. E., Egorin, M. J., Minna, J. D., y Ilaria, R. L., Jr. (2004). "Imatinib mesylate efficiently achieves therapeutic intratumor concentrations in vivo but has limited activity in a xenograft model of small cell lung cancer". *Clin Cancer Res* 10, 3528-3534.

## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula general (I):



5 donde:

el grupo  $\text{As(OH)}_2$  puede estar *orto*, *meta* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo;

$\text{R}^1$  se selecciona de entre hidrógeno y alquilo  $\text{C}_{1-3}$ ;

$\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-3}$  opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenoilo  $\text{C}_{2-3}$  opcionalmente sustituido; y alcoxi  $\text{C}_{1-3}$  opcionalmente sustituido;

10  $\text{R}^4$  y  $\text{R}^5$  pueden ser iguales o diferentes y se seleccionan independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-3}$  opcionalmente sustituido, ciclopropilo opcionalmente sustituido, alquenoilo  $\text{C}_{2-3}$  opcionalmente sustituido; y alcoxi  $\text{C}_{1-3}$  opcionalmente sustituido;

m es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

15 n es un número entero seleccionado de entre 1, 2 y 3;

\* indica un átomo de carbono quiral; y

sales e hidratos del mismo;

20 donde el sustituyente opcional está seleccionado independientemente de entre alquilo, alquenoilo, alquinilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo, heterocicloalquilo, halo, haloalquilo, haloalquinilo, hidroxilo, hidroxialquilo, alcoxi, tioalcoxi, alquenoilo, haloalcoxi, haloalquenoilo,  $\text{NO}_2$ , nitroalquilo, nitroalquenoilo, nitroalquinilo, nitroheterociclilo, alquilamino, dialquilamino, alquenoilamino, alquinilamino, acilo, alquenoilo, alquinoilo, acilamino, diacilamino, aciloxi, alquilsulfonilo, heterocicloxi, heterocicloamino, haloheterocicloalquilo, alquilsulfenilo, alquilcarbonilo, alquiltio, aciltio, fosfeno, fosfinilo, arilo, heteroarilo, alquilarilo, aralquilo, alquilheteroarilo, ciano, cianato, isocianato,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{CO}_2$ alquilo,  $\text{C(O)NH}_2$ ,  $-\text{C(O)NH}(\text{alquilo})$  y  $-\text{C(O)N}(\text{alquilo})_2$ .

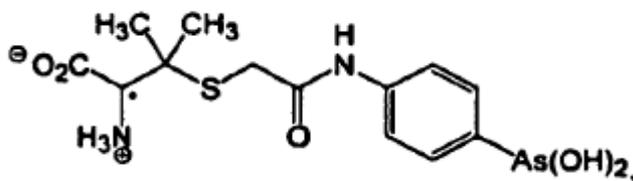
25 2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde  $\text{R}^1$  está seleccionado de entre hidrógeno, metilo y etilo.

3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  están seleccionados independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, metoxi, vinilo, hidroximetilo,  $\text{CF}_3$  y  $\text{OCF}_3$ .

30 4. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde  $\text{R}^4$  y  $\text{R}^5$  están seleccionados independientemente de entre hidrógeno, alquilo  $\text{C}_{1-3}$ , alquenoilo  $\text{C}_{2-3}$ , alcoxi  $\text{C}_{1-3}$ , haloalcoxi ( $\text{C}_{1-3}$ ), hidroxialquilo ( $\text{C}_{1-3}$ ) y haloalquilo ( $\text{C}_{1-3}$ ).

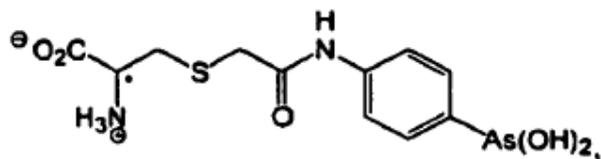
35 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, donde el grupo  $\text{As(OH)}_2$  es *orto* o *para* con respecto al átomo de N del anillo de fenilo;  $\text{R}^1$  es hidrógeno o metilo;  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  están seleccionados independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo, metoxi, vinilo,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CF}_3$  y  $\text{OCF}_3$ ;  $\text{R}^4$  y  $\text{R}^5$  están seleccionados independientemente de entre hidrógeno, metilo, etilo,  $\text{CH}_2\text{OH}$ , metoxi, vinilo,  $\text{CF}_3$  y  $\text{OCF}_3$ ; m es 1; y n es 1.

40 6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula estructural:



y sales, hidratos, enantiómeros y racematos del mismo.

7. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la siguiente fórmula estructural:



5 y sales, hidratos, enantiómeros y racematos del mismo.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, donde la estereoquímica en el carbono quiral indicado con \* es (S), y sales e hidratos del mismo.

10 9. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una sal o un hidrato del mismo, junto con un excipiente, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

15 10. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de una enfermedad proliferativa celular en un vertebrado.

20 11. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en la inhibición de la angiogénesis en un vertebrado.

12. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso la inducción selectiva de la transición de la permeabilidad mitocondrial (MPT) en células proliferativas en un vertebrado.

25 13. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en la inducción de apoptosis en células proliferativas de mamífero.

30 14. Un compuesto de fórmula (I) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o una composición de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en el tratamiento de la leucemia o el síndrome mielodisplásico en un vertebrado.

15. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, donde la leucemia es leucemia promielocítica aguda (APL) o leucemia mielocítica aguda (AML).

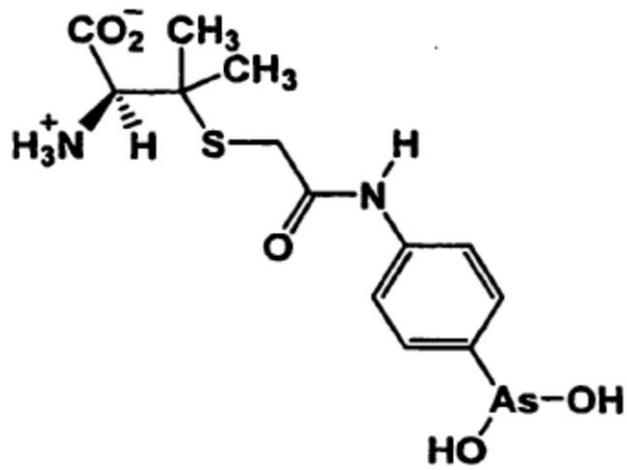


Figura 1

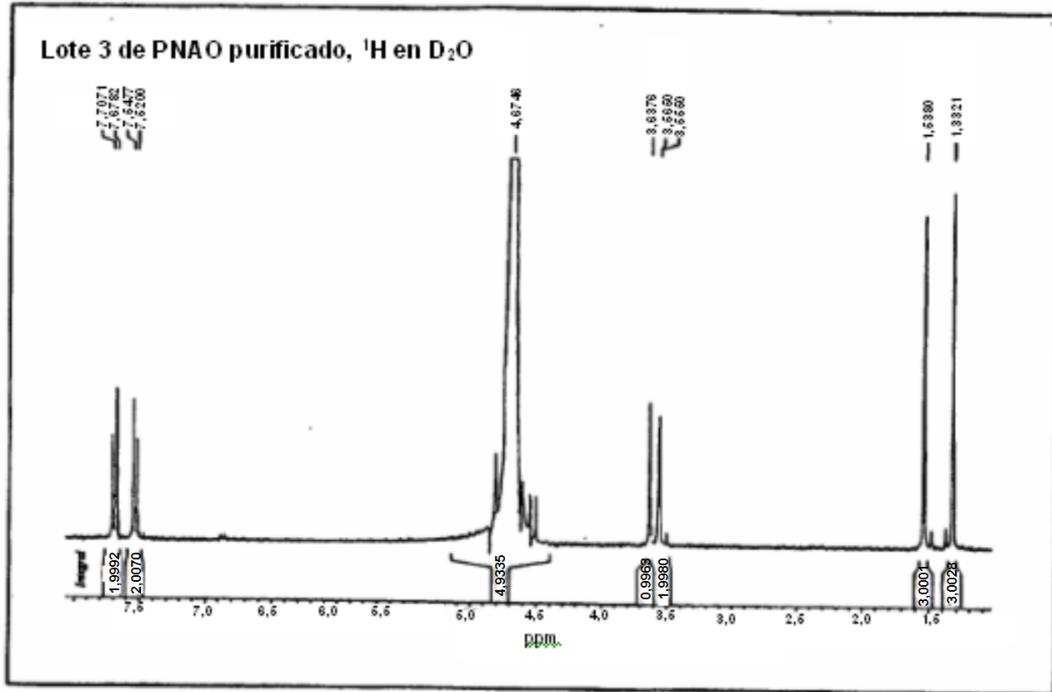


Figura 2

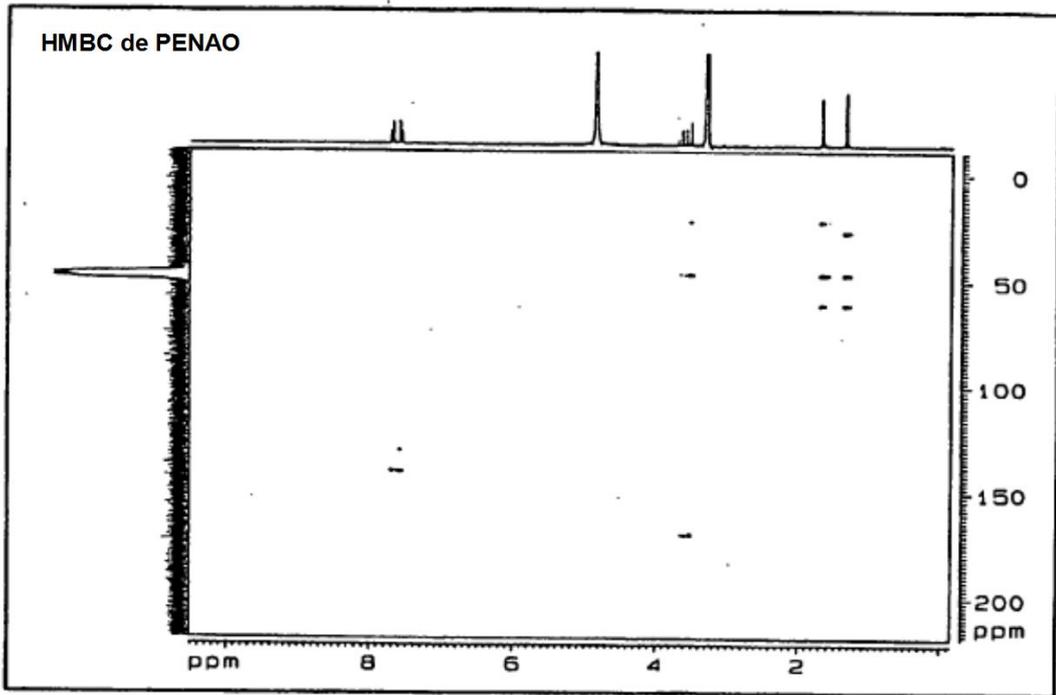


Figura 3

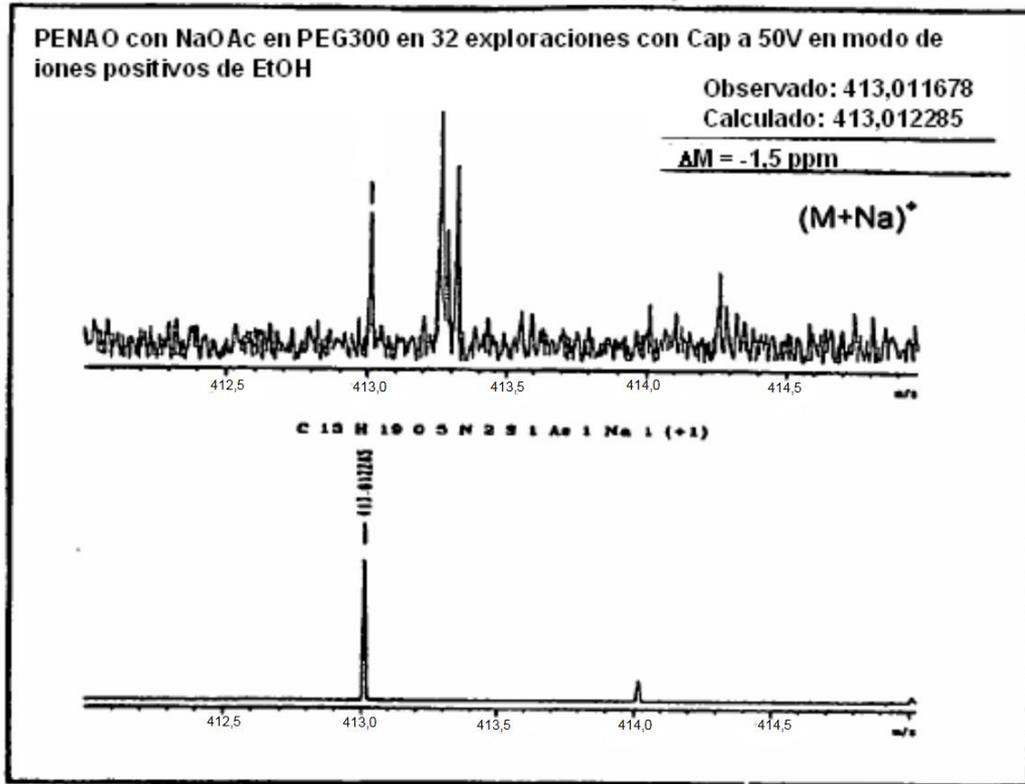


Figura 4

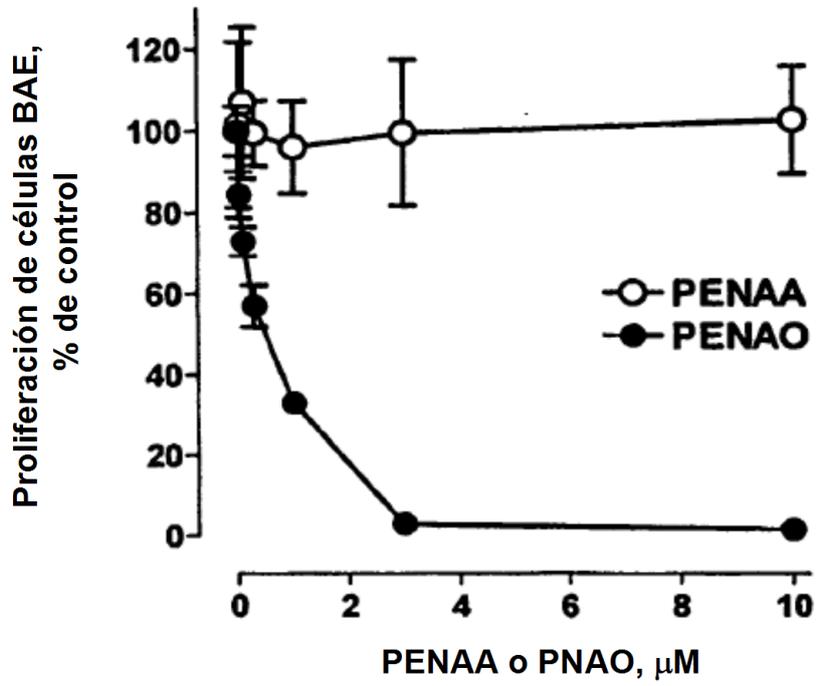


Figura 5

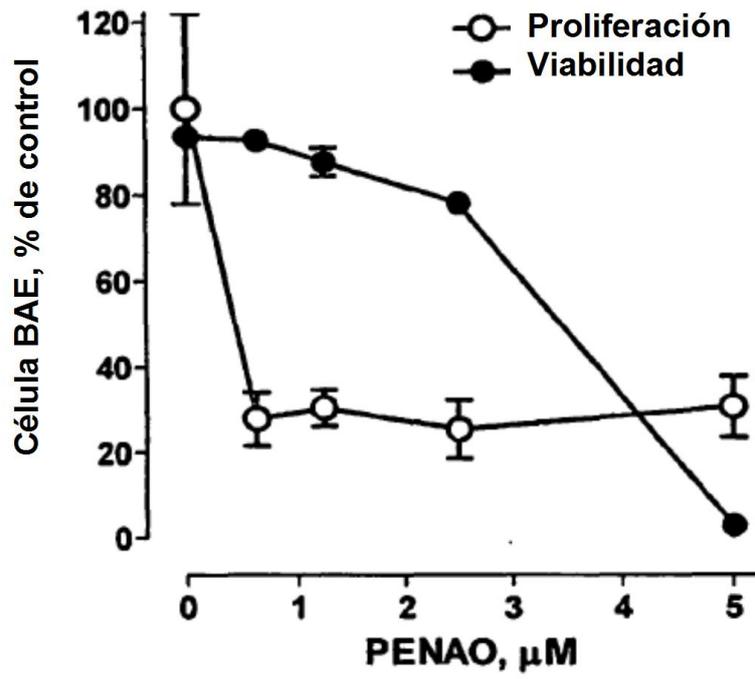


Figura 6

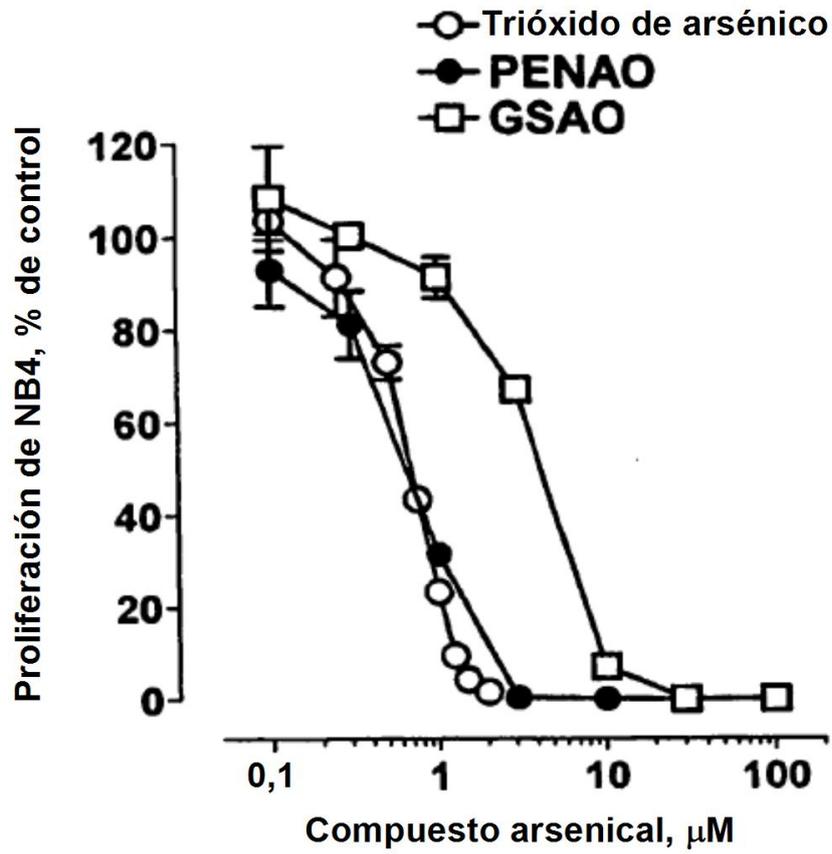


Figura 7

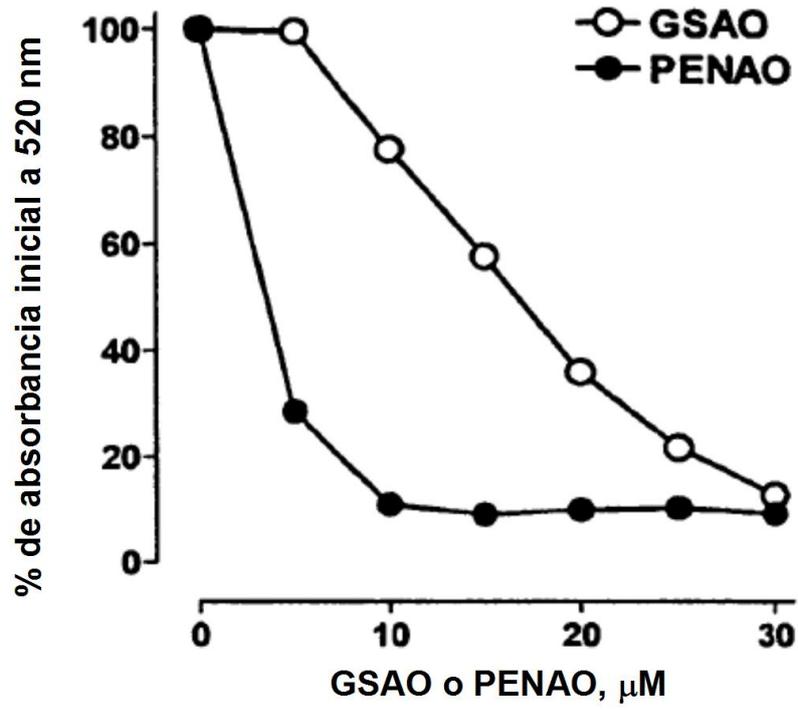


Figura 8

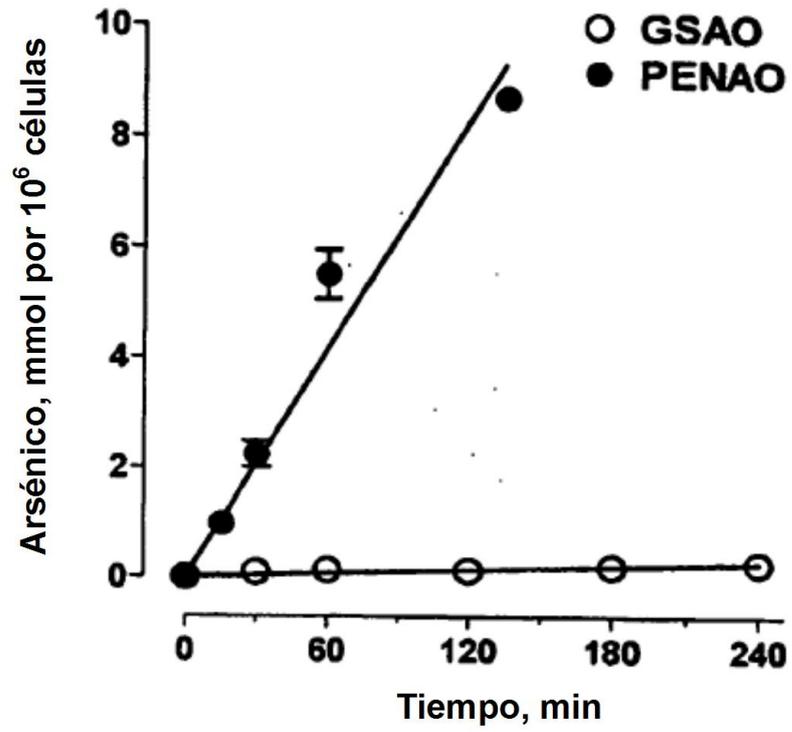


Figura 9

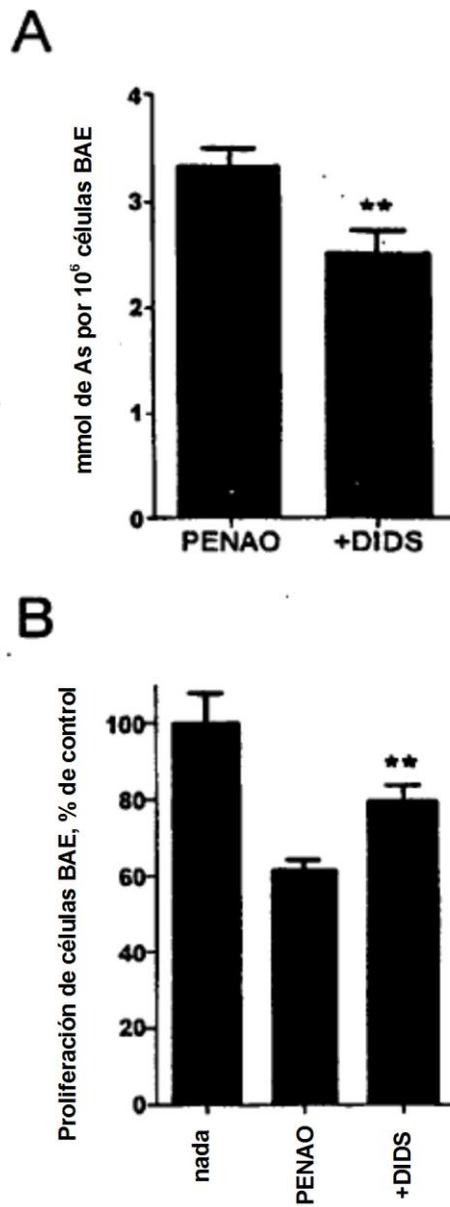


Figura 10

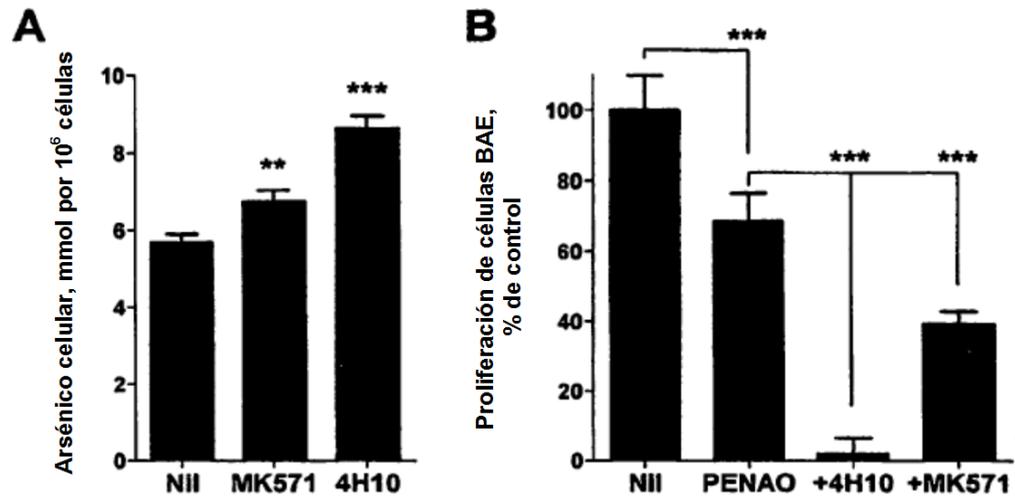


Figura 11

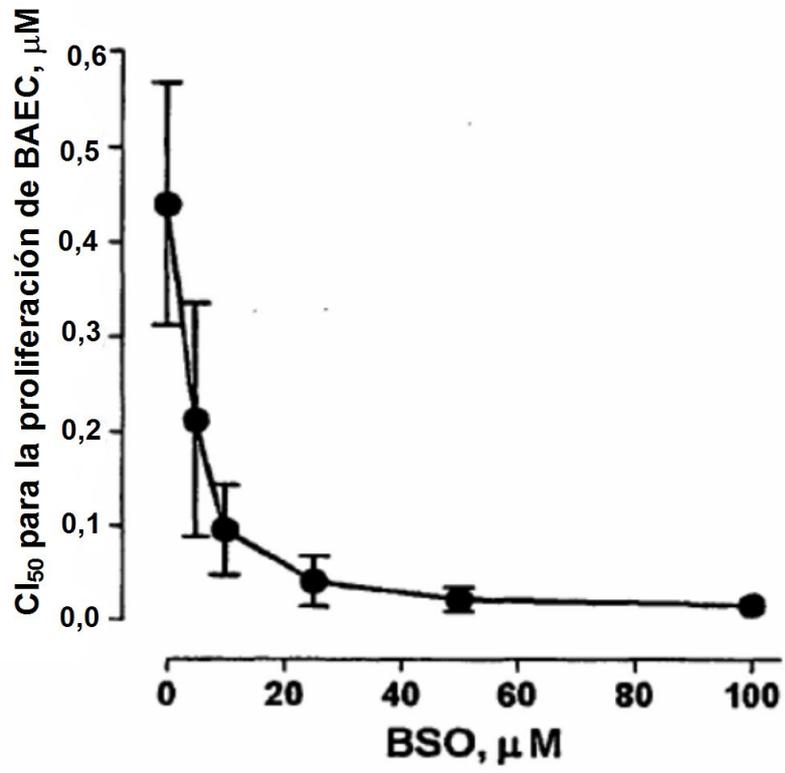


Figura 12

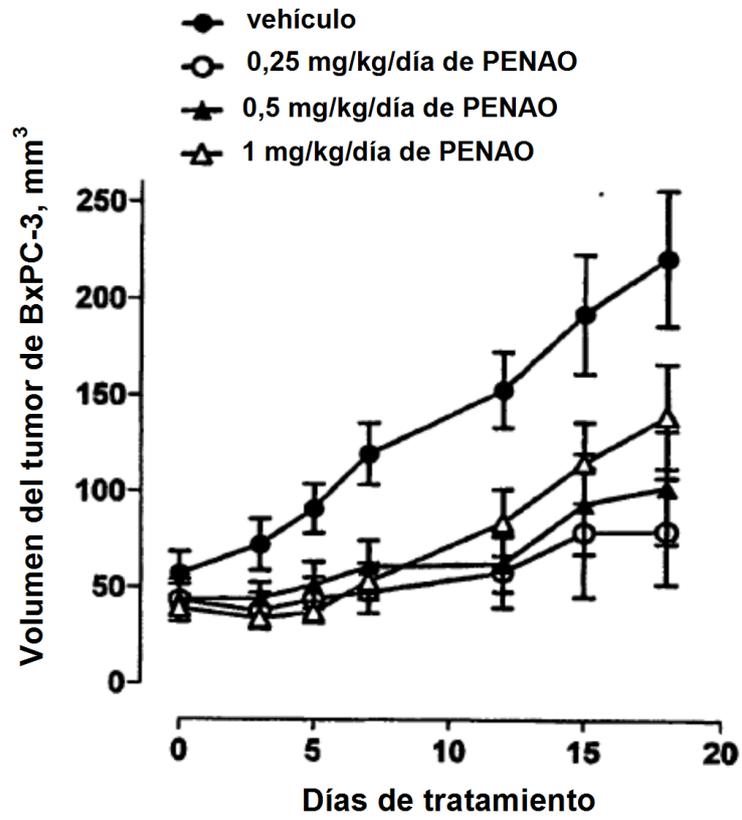


Figura 13

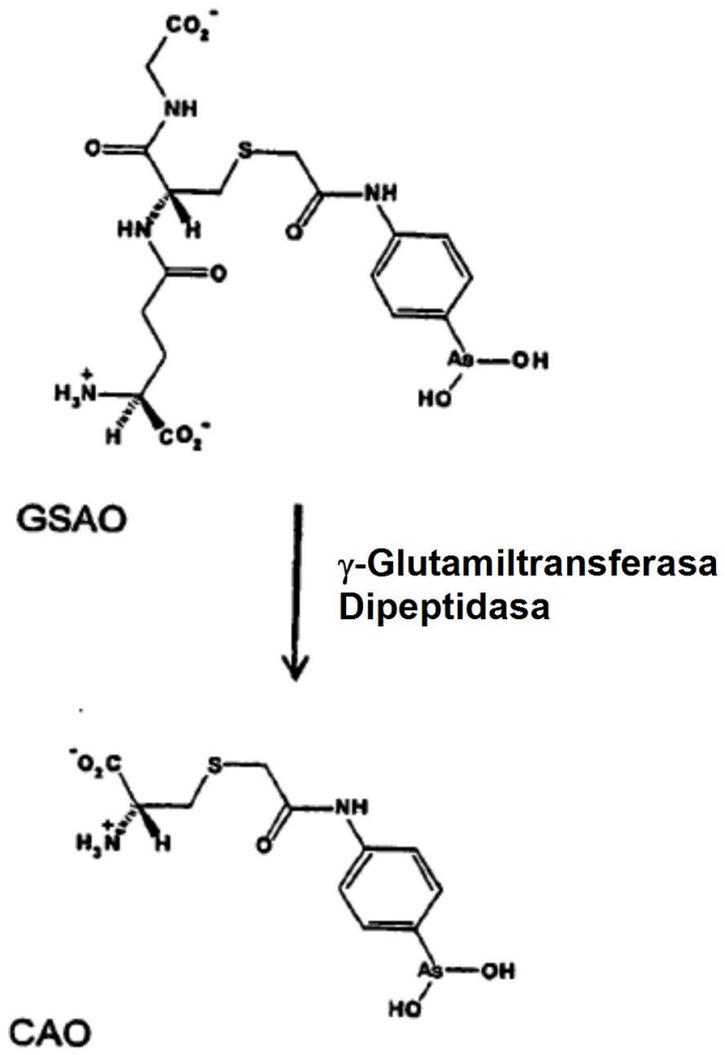


Figura 14

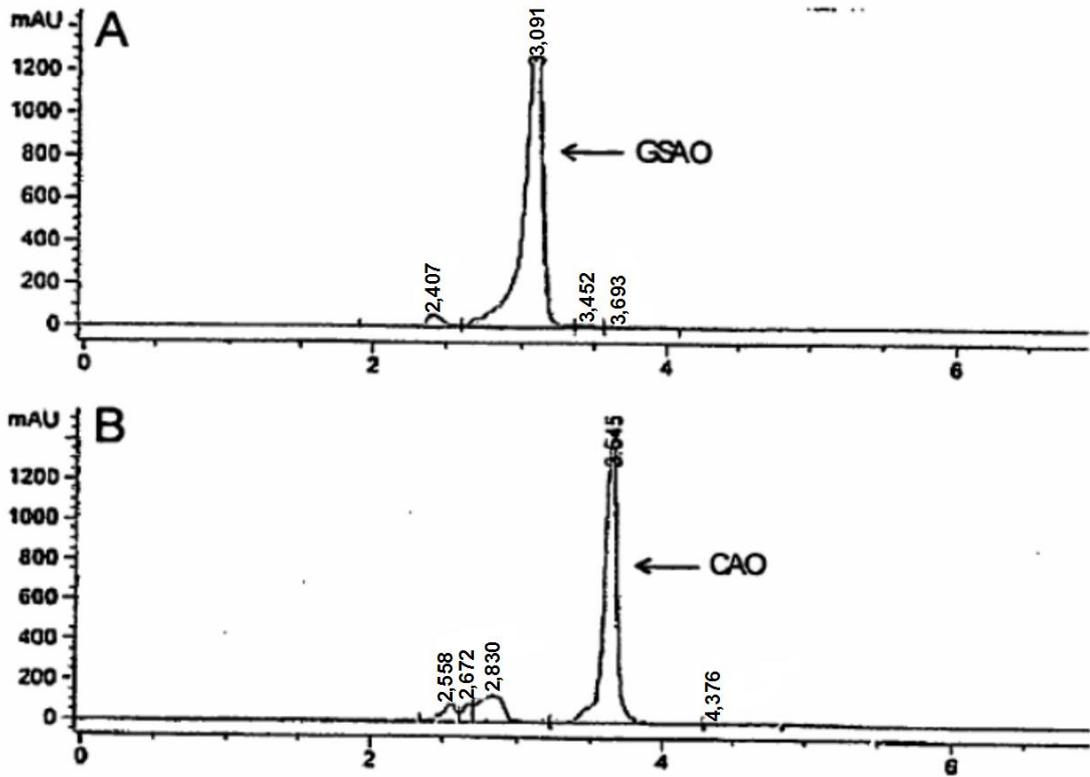


Figura 15

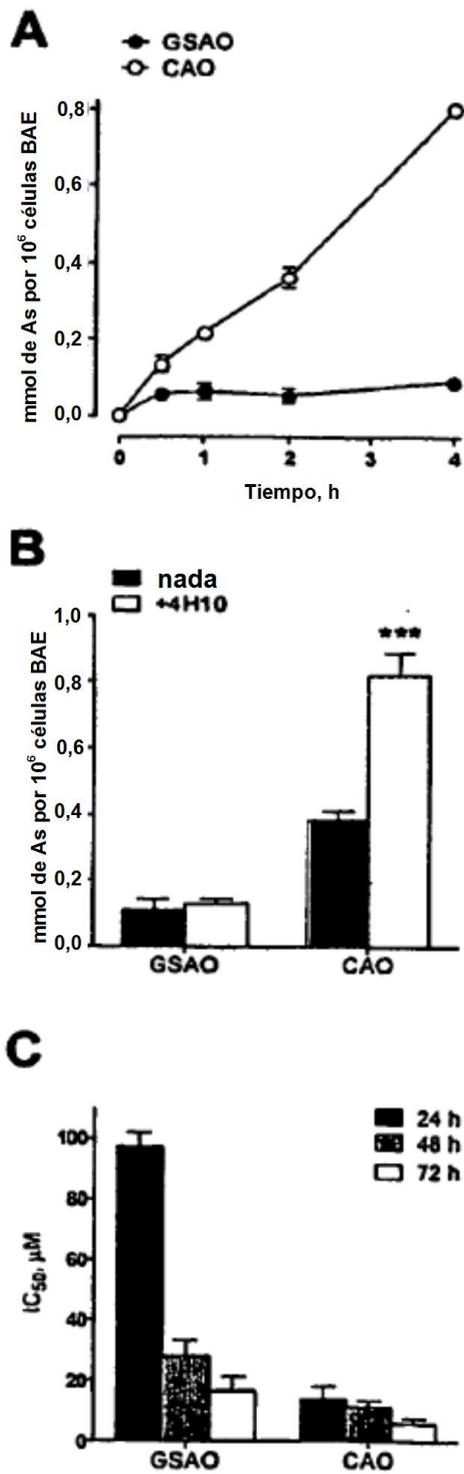


Figura 16

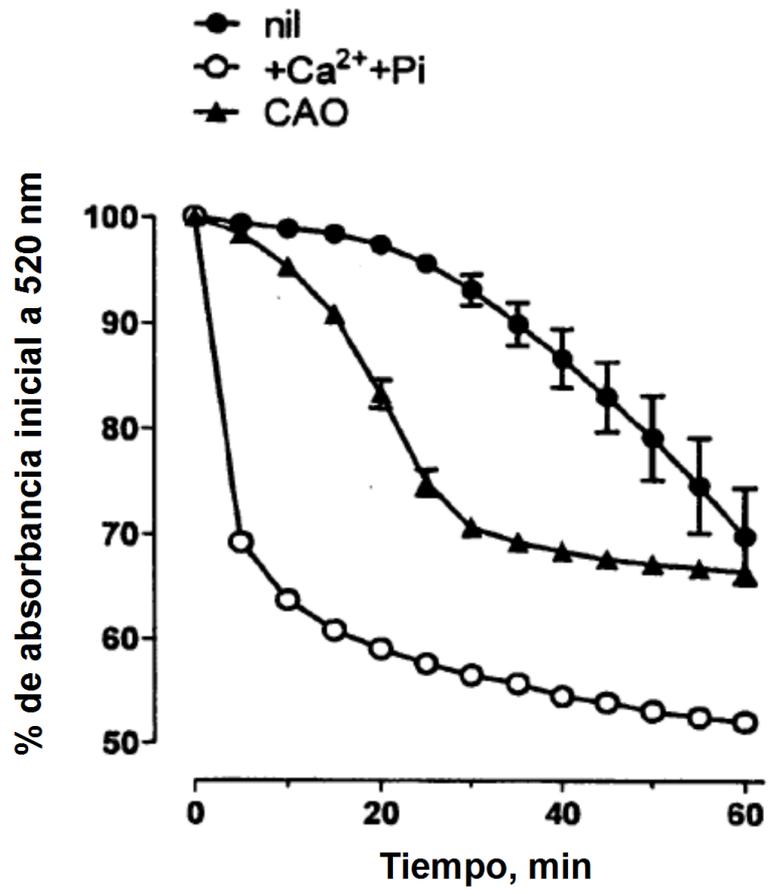


Figura 17