



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 330 519**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03810339 .6**

96 Fecha de presentación : **07.11.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1563099**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **Inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial.**

30 Prioridad: **07.11.2002 AU 2002952526**
05.11.2003 AU 2003906109

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.12.2009

73 Titular/es: **NewSouth Innovations Pty. Limited**
University of New South Wales
Rupert Myers Building Gate 14, Barker Street
Kensington, New South Wales 2052, AU

72 Inventor/es: **Hogg, Philip, John**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 330 519 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

Inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la modificación de la permeabilidad de membrana mitocondrial en células y, en particular, la identificación y uso de compuestos que induzcan selectivamente la MPT en células en proliferación.

10 **Antecedentes de la intención**

La mitocondria proporciona ATP para apoyar la función celular normal y su alteración conduce a muerte celular apoptótica y necrótica (Crompton, 1999). Un factor importante en la apoptosis y necrosis es la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) que se produce como resultado de una sobrecarga de calcio. La causa de la MPT es la apertura de un poro inespecífico en la membrana mitocondrial interna, conocido como el poro de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) (Crompton *et al*, 1987). El estrés oxidativo, el agotamiento de nucleótidos de adenina y el fosfato inorgánico elevado aumentan enormemente la sensibilidad del poro a la concentración de calcio. La apertura del MPTP se acompaña del equilibrado de todos los solutos pequeños (<1,5 kD) a través de la membrana mitocondrial interna. La alta concentración de proteína resultante en la matriz ejerce una presión osmótica coloidal que es responsable de un hinchamiento importante de la mitocondria y, en última instancia, apoptosis o necrosis.

El translocador de nucleótidos de adenina (ANT) es una proteína de 30 kD que atraviesa la membrana mitocondrial interna y es fundamental para el MPTP (Crompton *et al*, 1988).

Existe la necesidad de inducir selectivamente la MPT, particularmente en células en proliferación, como un medio para inducir la apoptosis. J. Biol. Chem. (1996) 271, págs. 6746-6751 por Constantini *et al* es un ejemplo de una publicación que describe un método para identificar compuestos que inducen la MPT pero que no contiene ninguna sugerencia de que dicho método debería usarse en células en proliferación.

La presente invención se refiere a un proceso para identificar compuestos que se unan a ANT en la mitocondria e induzcan selectivamente la MPT en células en proliferación respecto a células que no están en proliferación o de crecimiento en estado quiescente.

35 **Sumario de la invención**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un proceso *in vitro* para identificar un compuesto que induzca selectivamente la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) en células en proliferación, donde el proceso comprende poner en contacto una célula o extracto celular con un compuesto, determinar si el compuesto se une al translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y determinar si el compuesto induce selectivamente la MPT en células en proliferación.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un proceso *in vitro* para explorar una pluralidad de compuestos para identificar un compuesto que induzca selectivamente la MPT en células en proliferación, donde el proceso comprende poner en contacto una célula o un extracto celular con la pluralidad de compuestos, determinar si cualquiera de los compuestos se une a ANT y si es así, determinar por separado para cada uno de la pluralidad de compuestos si el compuesto induce selectivamente la MPT en células en proliferación.

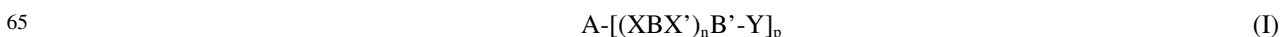
Con referencia al primer y segundo aspectos de la invención, puede determinarse la selectividad para células en proliferación, por ejemplo, comparando el efecto de compuestos que se ha identificado que se unen a ANT sobre la MPT en células en proliferación con el efecto sobre la MPT en células que no están en proliferación o de crecimiento en estado quiescente.

También con referencia al primer y segundo aspecto de la invención, en una realización, la determinación de la inducción de la MPT puede implicar medir cambios en la liberación de Citocromo C. En otra realización, la determinación de la inducción puede implicar medir cambios en la concentración de superóxido celular.

Con respecto a cualquiera del primero y segundo aspectos de la invención, en una realización el compuesto puede ser un compuesto reactivo de ditiol.

En otra realización, el compuesto puede tener un resto arsenóxido (o equivalente de arsenóxido).

En una realización más, el compuesto arsenóxido (o equivalente de arsenóxido) puede tener la fórmula (I):



en la que

A comprende al menos un grupo colgante sustancialmente impermeable de membrana celular;

5 (XBX')_nB' comprende un grupo enlazador adecuado, donde n es un número entero seleccionado entre 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20;

Y comprende al menos un arsenóxido O equivalente de arsenóxido; y

10 p es un número entero seleccionado entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

En una realización, el compuesto de fórmula (I) puede tener más de 8 átomos de carbono.

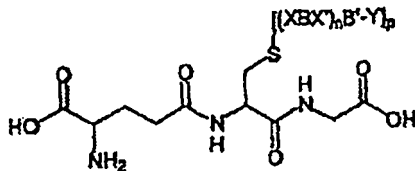
15 Las siguientes características se refieren a la Fórmula (I):

En una realización, A puede seleccionarse entre el grupo que consiste en aminoácidos naturales, no naturales y sintéticos, aminas hidrófilas, péptidos y polipéptidos, incluyendo dipéptidos tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, restos de azúcar tales como monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos (incluyendo variantes sustituidas) y proteínas que contienen tiol, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, A puede seleccionarse entre el grupo que consiste en glutatión, glucosamina, cisteinilglicina, ácido cisteico, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina, donde el átomo de azufre de cada compuesto que contiene azufre puede estar opcionalmente oxidado para formar un sulfóxido o sulfona. En otras realizaciones, A puede comprender un resto de azúcar, un resto disacárido u oligosacárido tal como, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, xilosa, lixosa, galactosa, hexosa, sacarosa, sorbosa, galactosil-sucrosa, sorbitol, manitol, xilitol, etc. En otras realizaciones, A puede ser una amina hidrófila tal como una alquil- aril- o aralquil-amina primaria, secundaria o terciaria, o una amina heterocíclica tal como piridina, pirrol, imidazol, etc.

Los aminoácidos son conocidos por los especialistas en la técnica y se muestran, por ejemplo, en libros de referencia convencionales, tales como King and Stansfield, A Dictionary of Genetics, 4ª Edición, Oxford University Press, 30 1990, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia. Por ejemplo, los aminoácidos pueden ser aminoácidos α , β o γ . La presente invención también incluye las formas de aminoácidos L y D. Los ejemplos de aminoácidos incluyen glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, prolina, fenilalanina, triptófano, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina, arginina e histidina.

En una realización, A puede seleccionarse entre el grupo que consiste en ureas tri-ácidas y péptidos que incluyen dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos. Por ejemplo, glutatión, Cys-Glu-Gly, Arg-Gly-Asp-Cys, Val-Thr-Cys-Gly, Gly-Gly-Cys, Lys-Glu-Gly, Arg-Gly-Asp-Lys, Val-Thr-Lys-Gly, Gly-Gly-Lys, Ser-Glu-Gly, Arg-Gly-Asp-Ser, Val-Thr-Ser-Gly, Gly-Gly-Ser, Asp-Glu-Gly, Arg-Gly-Asp-Asp, Val-Thr-Asp-Gly, Gly-Gly-Asp, Glu-Glu-Gly, Arg-Gly-Asp-Glu, Val-Thr-Glu-Gly, Gly-Gly-Glu, etc, ácido preslonoico, moléculas ácidas pequeñas tales como ácido 3-mercaptopropiónico, ácido mercaptosuccínico, ácidos mercaptosuccínico, alcoholes pequeños tales como 1-tio-beta-D-glucosa, 3-mercaptopropiónico, 2-mercaptopiridina y 2-aminopiridina.

En una realización, A es un tripéptido. Por ejemplo, A puede ser una glutatión y en una forma el compuesto puede representarse por la Fórmula (II):



55 en la que (XBX')_nB' comprende cualquier grupo enlazador adecuado, e Y comprende un arsenóxido o un equivalente de arsenóxido.

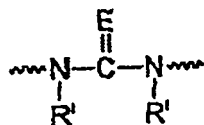
60 En una realización, p es un número entero seleccionado de 1 a 5. Por ejemplo, p puede ser 1, 2, 3, 4 ó 5. En una realización, p es 1 ó 2. En otra realización, p es 1.

En una realización, n es un número entero de 0 a 15. Por ejemplo, n puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15, en una realización n es un número entero seleccionado de 0 a 10. En otra realización n es un número entero seleccionado de 0 a 5, por ejemplo, n puede ser 0, 1, 2, 3, 4 ó 5.

En una realización, X se selecciona entre el grupo que consiste en -NR-, -S(O)-, -S(O)O-, -S(O)₂-, -S(O)₂O-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O-, -C(S)S-, -P(O)(R₁)- y -P(O)(R₁)O-, o está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₁₀, alquenilenilo C₂-C₁₀, alquinilenilo C₂-C₁₀, cicloalquileno C₃-C₁₀, cicloalquenilenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquileno C₃-C₁₀, heterocicloalquenilenilo C₅-C₁₀, arileno C₆-C₁₂, heteroarileno y acilo C₂-C₁₀;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -NR-, -O-, -S-, -Se-, -S-S-, S(O)-, -OS(O)-, OS(O)O-, -OS(O)₂-, -OS(O)₂O-, -S(O)O-, -S(O)₂-, -S(O)₂O-, -OP(O)(R₁)-, -OP(O)(R₁)O-, -OP(O)(R₁)OP(O)(R₁)O-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)



O-, C(S)O-, -C(S)S-, -P(O)(R₁)-, P(O)(R₁)O- y (R)₂⁺; , o está ausente; donde E es O, S, Se, NR o N

n es 0, 1 ó 2; y

B' se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₁₀, alquenilenilo C₂-C₁₀, alquinilenilo C₂-C₁₀, cicloalquileno C₃-C₁₀, cicloalquenilenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquileno C₃-C₁₀, heterocicloalquenilenilo C₅-C₁₀, arileno C₆-C₁₂ y heteroarileno o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo, OR₂ y acilo C₂-C₁₀;

R' es igual que R o dos R' pueden tomarse junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo heterocíclico, saturado o insaturado, de 5 o 6 miembros;

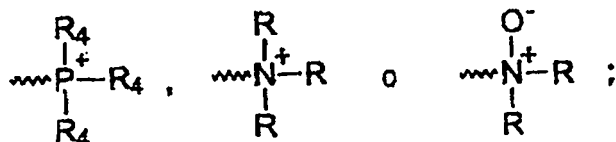
cada R₁ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo, halo, OR₂ y N(R)₂;

cada R₂ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo y -C(O)R₅;

cada R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo, alcoxi C₁-C₁₀, alqueniloxi C₁-C₁₀, alquiniloxi C₃-C₁₀, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, heterocicloalquiloxi C₃-C₁₀, heterocicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, heteroariloxi, alquiltio C₁-C₁₀, alqueniltio C₃-C₁₀, alquiniltio C₃-C₁₀, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, heterocicloalquiltio C₃-C₁₀, heterocicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, heteroariltio, OH, SH y N(R)₂;

donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en cualquier posición disponible, y, por ejemplo, pueden estar en una relación para-, meta- u orto-; y

donde cada alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, cicloalquileno, cicloalquenilenilo, heterocicloalquileno, heterocicloalquenilenilo, arileno, heteroarileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquinilo C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -OS(O)R₃, -S(O)₂R₃, -OS(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -OP(O)R₄R₄, -N(R'')₂, -NRC(O)(CH₂)_mQ, -C(O)R₅;



donde

R, R₁ y R₅ son como se han definido anteriormente; y

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂, N(R)₂ y -C(O)R₅;

ES 2 330 519 T3

cada R_3 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alcoxi C_1-C_{10} , alquenoiloxi C_3-C_{10} , alquinoiloxi C_3-C_{10} , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , cicloalquenoiloxi C_3-C_{10} , heterocicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , heterocicloalquenoiloxi C_3-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , heteroariloxi, alquiltio C_1-C_{10} , alquenoiltio C_3-C_{10} , alquinoiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquenoiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquenoiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio y $N(R)_2$;

cada R_4 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alcoxi C_1-C_{10} , alquenoiloxi C_3-C_{10} , alquinoiloxi C_3-C_{10} , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , cicloalquenoiloxi C_3-C_{10} , heterocicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , heterocicloalquenoiloxi C_3-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , heteroariloxi, alquiltio C_1-C_{10} , alquenoiltio C_3-C_{10} , alquinoiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquenoiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquenoiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio, halo y $N(R)_2$;

R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_{10} , alqueno C_2-C_{10} , alquino C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alquiltio C_1-C_{10} , alquenoiltio C_3-C_{10} , alquinoiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquenoiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquenoiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio, $-S(O)R_3$, $SU(O)_2R_3$ y $-C(O)R_5$,

R'' es igual que R o dos R'' tomados junto con el átomo de N al que están unidos pueden formar un sistema de anillo heterocíclico saturado, insaturado o aromático;

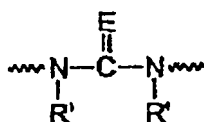
Q se selecciona entre halógeno y $-OS(O)_2Q_1$; donde Q_1 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , perfluoroalquilo, fenilo, p -metilfenilo; y

m es 1, 2, 3, 4 ó 5.

En otra realización, X se selecciona entre el grupo que consiste en una atmósfera de NH , $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(O)O-$, $C(S)O-$ y $-C(S)S-$ o está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en $-O-$, $-S-$, $-NR-$, $-S-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-P(O)(R_1)-$, $-OP(O)(R_1)-$, $OP(O)(R_1)O-$, $OP(O)(R_1)OP(O)(R_1)O-$, $-C(O)-$, $-C(S)-$, $-C(O)O-$, $C(S)O-$, $-C(S)S-$, $-Se-$,



, o está ausente; donde E es O , S o $N(R)_2^+$;

n es 0, 1 ó 2; y

B' se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} y arilo C_6-C_{12} , o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , OR_2 y acilo C_2-C_{10} ;

R' es el mismo que R ;

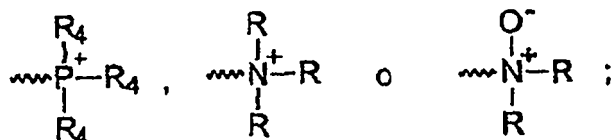
cada R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halo, OR_2 y $N(R)_2$;

cada R_2 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} y $-C(O)R_5$;

cada R_5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , alquenoiloxi C_3-C_5 , alquinoiloxi C_3-C_5 , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , cicloalquenoiloxi C_3-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_6 , alquenoiltio C_3-C_5 , alquinoiltio C_3-C_5 , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquenoiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , OH , SH y $N(R)_2$;

donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en cualquier posición, y, por ejemplo, pueden estar en una relación para-, meta- u orto-, y

donde cada alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, cicloalquileno, cicloalquenilenilo, arileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, ciano, halo, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -OS(O)R₃, -S(O)₂R₃, -OS(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -OP(O)R₄R₄, -N(R'')₂, NRC(O(CH₂)_mQ, -C(O)R₆,



donde

R, R₁ y R₅ son como se han definido anteriormente; y

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂, N(R)₂ y -C(O)R₅;

cada R₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alqueniloxi C₃-C₅, alquiniloxi C₃-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂ y N(R)₂;

cada R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alqueniloxi C₃-C₅, alquiniloxi C₃-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₅, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₅, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, halo y N(R)₂;

R₆ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃ y -C(O)R₅,

R'' es el mismo que R;

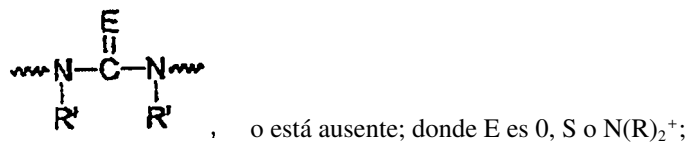
Q se selecciona entre el grupo que consiste en halógeno y -OS(O)₂Q₁; donde Q₁ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, perfluoroalquilo C₁-C₄, fenilo, p-metilfenilo; y

m es 1, 2, 3, 4 ó 5.

En otra realización, X está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquileno C₁-C₅, arileno C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -O-, -S-, -NR-, -S-S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -P(O)(R₁)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)-, -Se- y



n es 0, 1 ó 2; y

B' es alquileno C₁-C₅, arileno C₆-C₁₂ o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, OR₂ y acilo C₂-C₅;

R' es el mismo que R;

cada R₁ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, OR₂ y N(R)₂;

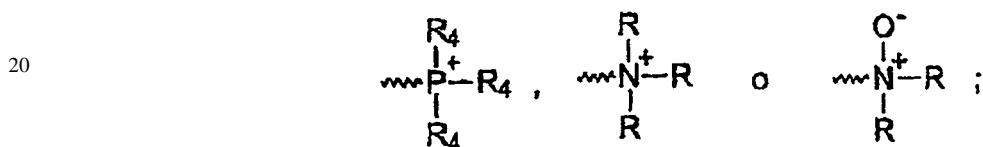
ES 2 330 519 T3

cada R_2 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} y $-C(O)R_5$;

5 cada R_5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , alquenoiloxi C_3-C_5 , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , cicloalquenoiloxi C_5-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , alquenoiltio C_3-C_5 , cicloalquiltio C_1-C_{10} , cicloalquenoiltio C_5-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , OH, SH y $N(R)_2$;

10 donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en cualquier posición del anillo o anillos respectivos y, por ejemplo, pueden estar en una relación para-, meta- u orto-, y

15 donde cada alquileo, alquenoileno, alquinoileno, cicloalquileo, cicloalquenoileno, arileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alquino C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalqueno C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a} , SR_6 , nitro, arsenóxido, $-S(O)R_3$, $-OS(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-OS(O)_2R_3$, $-P(O)R_4R_4$, $-OP(O)R_4R_4$, $-N(R'')_2$, $-NRC(O)(CH_2)_mQ$, $-C(O)R_5$,



25 donde

R , R_1 y R_5 son como se han definido anteriormente; y

30 R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)(R_4)_2$ y $-C(O)R_5$;

35 cada R_3 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_5 , cicloalquiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} y $N(R)_2$;

cada R_4 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , alcoxi C_1-C_5 , cicloalquiloiloxi C_3-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , halo y $N(R)_2$;

40 R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , alquiltio C_1-C_6 , cicloalquiltio C_3-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$ y $-C(O)R_5$,

R'' es el mismo que R ;

45 Q se selecciona entre halógeno y $-OS(O)_2Q_1$; donde Q_1 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , perfluoroalquilo C_1-C_4 , fenilo, *p*-metilfenilo; y

m es 1, 2, 3, 4 ó 5.

50 En una realización más, X está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquileo C_1-C_5 , arileno C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

55 X' se selecciona entre el grupo que consiste en -O-, -S-, -NR-, -C(O)- y -C(O)O-, o está ausente;

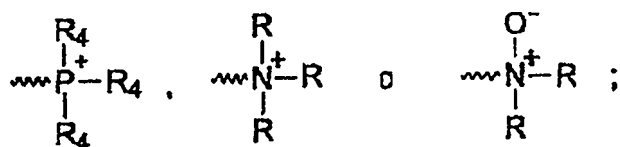
n es 1; y

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

60 R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , arilo C_6-C_{12} y acilo C_2-C_5 ;

65 donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en cualquier posición disponible del anillo o anillos respectivos y, por ejemplo, puede estar en una relación para-, meta- u orto-, y

donde cada alquileo, arileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -N(R'')₂, -NRC(O)(CH₂)_mQ, -C(O)R₅,



donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂ y -C(O)R₅;

cada R₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅ y ariltio C₆-C₁₂;

cada R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, ariltio C₆-C₁₂, halo y N(R)₂;

cada R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, ariltio C₆-C₁₂, OH, SH y N(R)₂;

R₆ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₆, ariltio C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃ y -C(O)R₅,

R'' es el mismo que el R anterior;

Q se selecciona entre halógeno y -OS(O)₂Q₁; donde Q₁ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, perfluoroalquilo C₁-C₄, fenilo, *p*-metilfenilo; y

m es 1, 2, 3, 4 ó 5.

En otra realización más, X está ausente

B es acilo C₂-C₅;

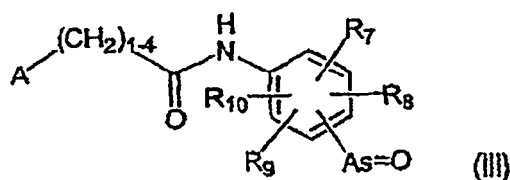
X' es NR;

n es 1;

B' es fenileno; y

R es H;

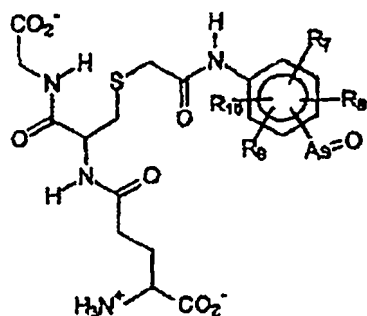
donde los sustituyentes unidos directamente al anillo de fenileno pueden estar en cualquier posición disponible, como se ilustra, por ejemplo, por la Fórmula (III);



en la que R₇ a R₁₀ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, -OS(O)₂R₃ y -NHC(O)CH₂Q donde Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ y -OS(O)₂-*p*-tolilo; y donde, cuando uno cualquiera de R₇ a R₁₀ es alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, -OS(O)₂R₃, es capaz de formar un anillo condensado con el fenileno; y donde, además, al menos uno de R₇ a R₁₀ es alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅ o -OS(O)₂R₃, junto con al menos otro cualquiera de R₇ a R₁₀, es capaz de formar un anillo condensado con el fenileno.

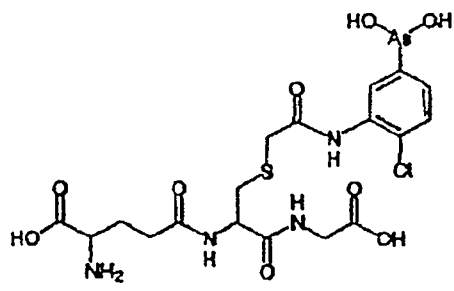
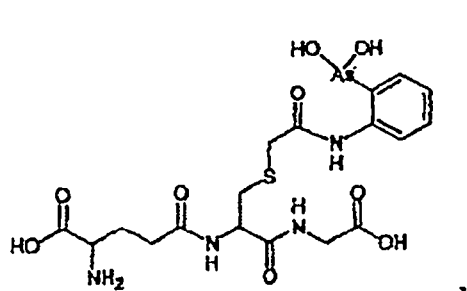
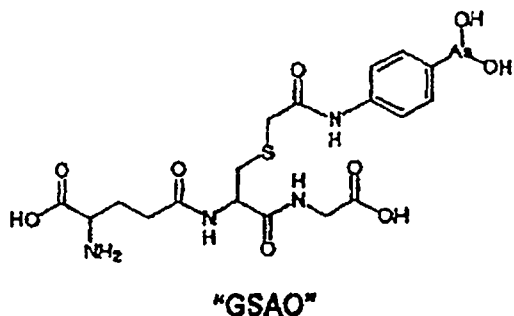
Más típicamente, de R_7 a R_{10} se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi, alcoxi C_1 - C_5 , metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo y $-NHC(O)CH_2Q$ donde Q es halógeno, $-OS(O)_2CH_3$, $-OS(O)_2C_5H_6$ y $-OS(O)_2$ -*p*-tolilo.

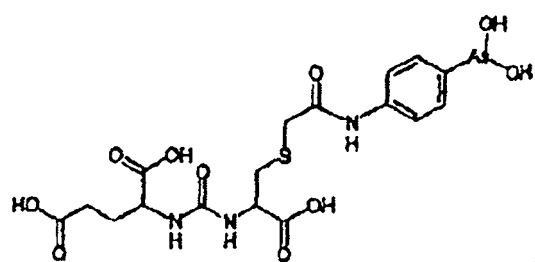
Por ejemplo, cuando el grupo colgante A es glutatión, el compuesto de fórmula (III) puede representarse como



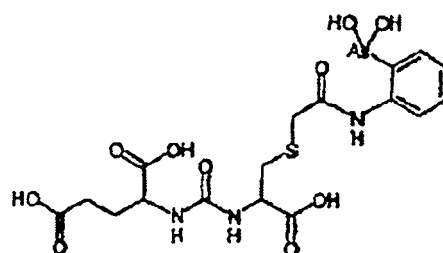
Además, cuando B' es arileno, los sustituyentes unidos al anillo de arileno pueden estar en cualquier posición disponible del anillo de arileno. Por ejemplo, los sustituyentes pueden estar en una relación meta- o para- con respecto al grupo $-As=O$.

En otra realización, un compuesto de arsenóxido identificado de acuerdo con la presente invención se selecciona entre los siguientes compuestos:

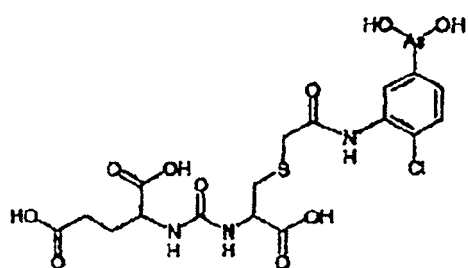




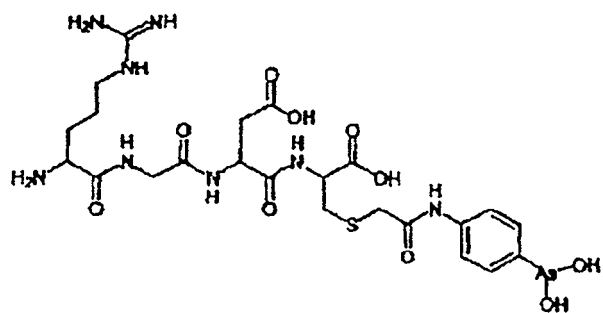
3



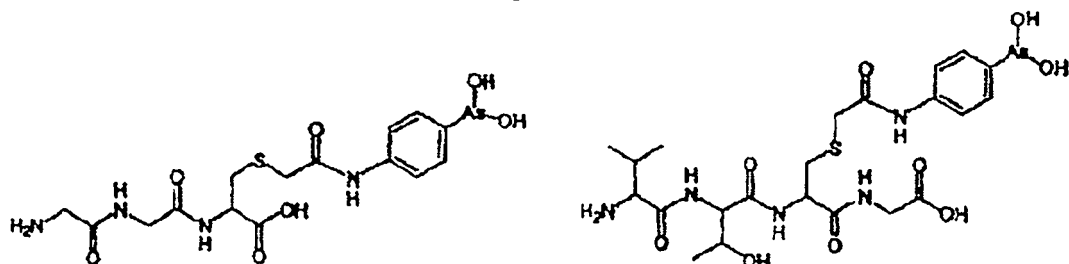
4



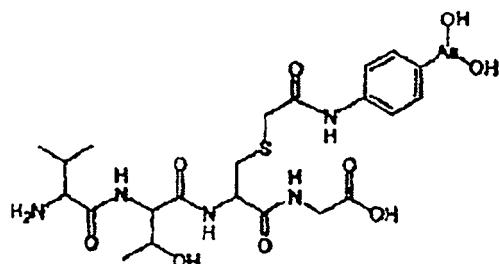
5



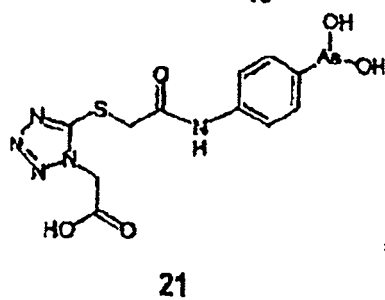
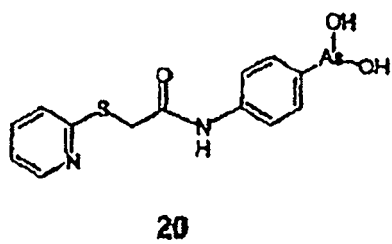
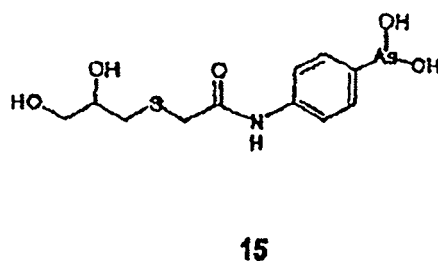
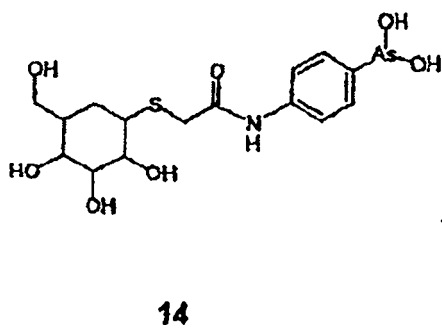
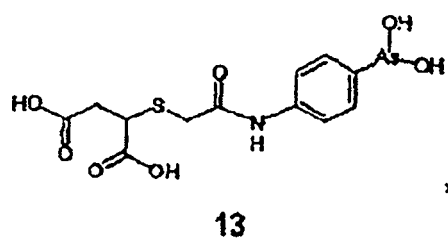
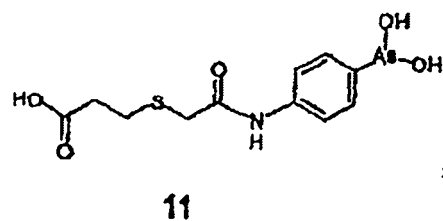
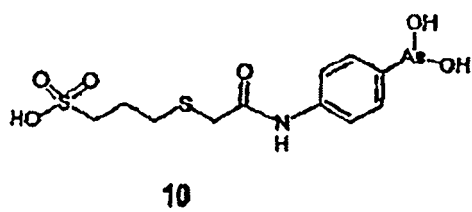
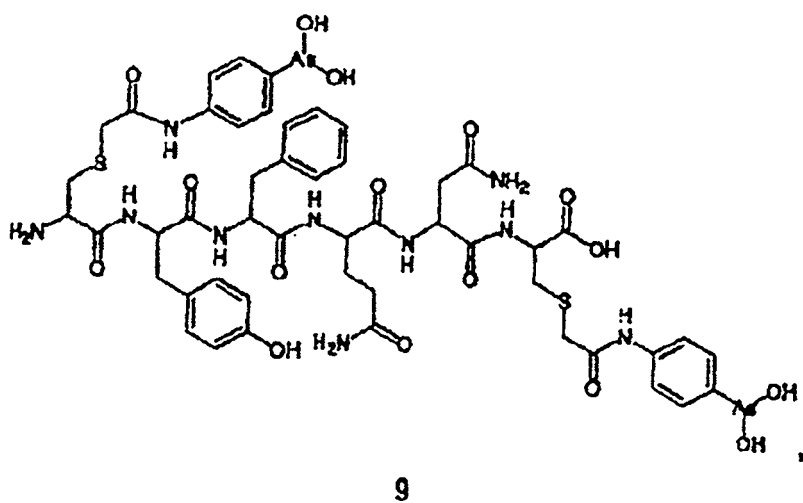
6

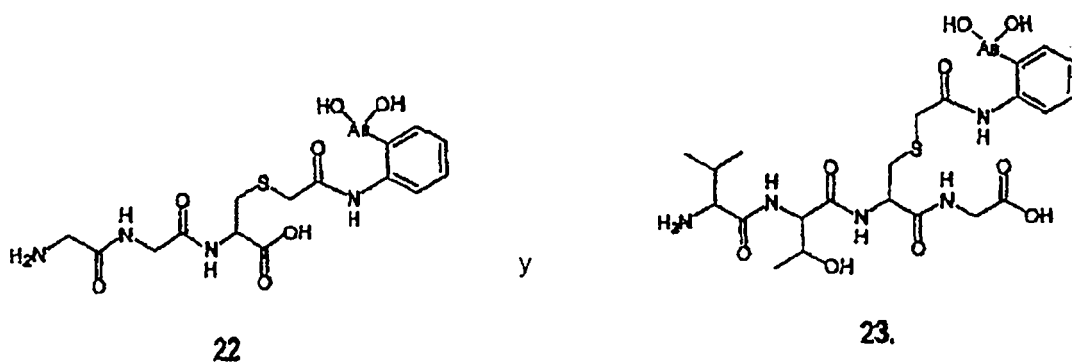


7



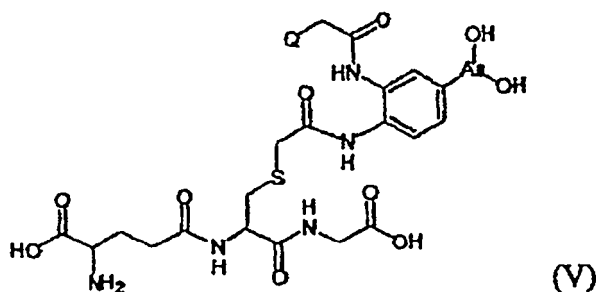
8





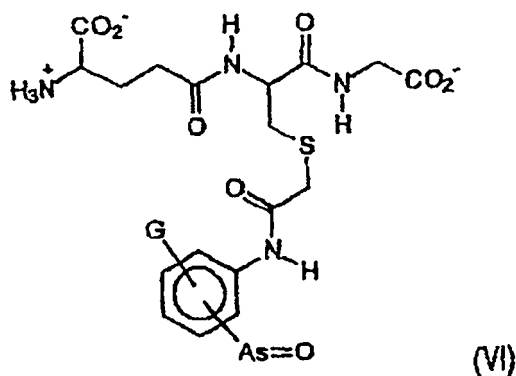
El compuesto "GSAO" (4-(*N*-(*S*-glutathionilacetil)amino)-fenilarsenóxido) se ha descrito previamente en la solicitud de patente internacional WO 01/21628.

Otros compuestos que pueden interactuar con ANT incluyen compuestos de acuerdo con la fórmula (V) que se ilustra a continuación:



en la que Q es cualquier halógeno.

Otra forma de un compuesto de arsenóxido que puede interactuar con ANT es un compuesto de acuerdo con la Fórmula (VI):



en al que G se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi, alcoxi C_1-C_5 , alquilo C_1-C_5 y arilo C_6-C_{12} y $-NHC(O)CH_2Q$, donde Q es halógeno, $-OS(O)_2CH_3$, $-OS(O)_2C_6H_5$ o $-OS(O)_2-p$ -tolilo.

Típicamente, G se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C_1-C_5 , metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo y $-NHC(O)CH_2Q$, donde Q es el grupo que consiste en halógeno, $-OS(O)_2CH_3$, $-OS(O)_2C_6H_5$ y $-OS(O)_2-p$ -tolilo.

En una realización, en un compuesto de Fórmula VI, G es hidroxilo, flúor, amino o nitro.

En otra realización, el grupo G está en una relación orto-, meta- o para- con el grupo arsenóxido. Por ejemplo, en otra realización, G está en una relación orto- o para- con el grupo arsenóxido.

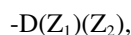
5 Típicamente, la actividad del átomo de arsénico puede modificarse por el grupo G, cuando G y el átomo de arsénico están en una relación orto o para entre sí. Por ejemplo, cuando G es un grupo donador de electrones tal como OH (ionizado en O⁻ a pH fisiológico), el átomo de arsénico puede desactivarse hacia ditioles y puede hacerse más selectivo, por ejemplo, únicamente reaccionando con ditioles muy reactivos. Como alternativa, cuando G es un grupo de extracción de electrones, tal como NO₂, la densidad de electrones puede apartarse del átomo de arsénico, haciendo que sea más reactivo a los ditioles. La inhibición selectiva de algunas proteínas redox y no de otras puede conseguirse
10 por manipulación de G.

Típicamente, en los compuestos de arsenóxido capaces de interactuar con ANT, el grupo arsenóxido ($-\text{As}=\text{O}$) puede reemplazarse por un equivalente de arsenóxido

15 Un equivalente de arsenóxido se define en la presente memoria como cualquier especie reactiva a ditiol que muestra esencialmente la misma afinidad para ditiolos que para -As=O . Típicamente, el equivalente de arsenóxido incluye entidades reactivas a ditiol, tales como especies As, Ge, Sn y Sb. Más típicamente, un equivalente de arsenóxido puede representarse por $\text{-D(Z}_1\text{)(Z}_2\text{)}$. Se espera que los equivalentes de arsenóxido muestren una actividad idéntica o sustancialmente idéntica a la del arsenóxido correspondiente.

Típicamente, para equivalentes de arsenóxido de la forma $-D(Z_1)(Z_2)$, D será, por ejemplo, As, RSn, Sb o RGe, y Z_1 y Z_2 serán grupos lábiles (es decir, grupos desplazados fácilmente en condiciones fisiológicas). Z_1 y Z_2 pueden ser iguales o diferentes, y pueden estar conectados o ser independientes entre sí (unidos sólo al átomo de arsénico).

25 Los equivalentes de arsenóxido adecuados incluyen los siguientes:

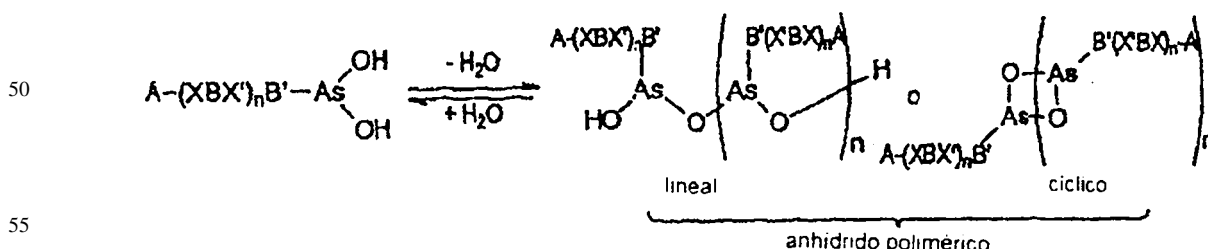


30 donde Z₁ y Z₂ se seleccionan entre el grupo que consiste en OH, alcoxi C₁-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₁₀, ariltio C₆-C₁₀, alquilseleno C₁-C₁₀, arilseleno C₆-C₁₀, F, Cl, Br e I;

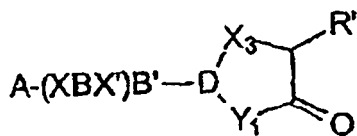


40 donde $E_1 = E_2 = O$, $E_1 = O$ y $E_2 = S$ o $E_1 = E_2 = S$; M es R''' y R'''' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halógeno, alcoxi C_1-C_{10} , ariloxi C_6-C_{10} , hidroxí y carboxi; y $n = 1$ a 10 .

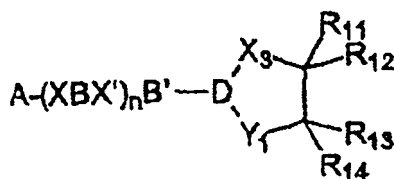
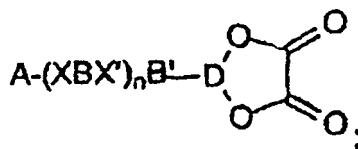
Para equivalentes de arsenóxido de la forma $D(Z_1)(Z_2)$, cuando D es As y Z_1 y Z_2 son OH, el equivalente de arsenóxido puede estar en equilibrio con especies poliméricas, como se representa a continuación.



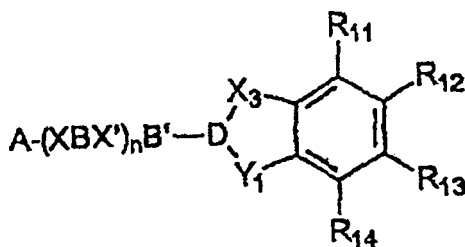
Con respecto al equilibrio representado anteriormente, el arsénico es uno de muchos elementos cuyas especies hidroxí existen en equilibrio con los anhídridos poliméricos correspondientes (Doak & Freedman, 1970). Por lo tanto, los compuestos de arsenóxido pueden existir en realidad como polímeros de bajo o medio peso molecular (por ejemplo, $n = 3$ a 6). Sin embargo, la reacción de deshidratación es reversible, y por lo tanto se espera que los anhídridos poliméricos solubles se comporten como equivalentes de arsenóxido, es decir, se espera que se unan a ditioles muy espaciados sustancialmente de la misma manera que las especies monoméricas $-AS(OH)_2$.



donde $X_3 = NH$, $Y_1 = O$; $X_3 = Y_1 = O$ o $X_3 = S$, $Y_1 = O$, y R' se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} y carboxi, o es una de las cadenas laterales de veinte aminoácidos:



donde $X_3 = Y_1 = O$; $X_3 = NH$, $Y_1 = O$; $X_3 = S$, $Y_1 = O$; $X_3 = Y_1 = NH$; o $X_3 = S$, $Y_1 = NH$; o $X_3 = S$, $Y_1 = NH$ y R_{11} a R_{14} se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} y CO_2H ;



donde $X_3 = Y_1 = O$ o $X_3 = NH$, $Y_1 = O$; y R_{11} a R_{14} se seleccionan entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , halógeno, alcoxi C_1-C_{10} y CO_2H . Típicamente, $(XB'X')B'$ es como se ha definido anteriormente.

Abreviaturas y definiciones

En el contexto de esta memoria descriptiva, la abreviatura MPT representa la Transición de Permeabilidad Mitocondrial.

En el contexto de esta memoria descriptiva, la abreviatura MPTP representa el Poro de Transición de Permeabilidad Mitocondrial.

En el contexto de esta memoria descriptiva, la abreviatura ANT representa el translocador de nucleótidos de adenosina.

En el contexto de esta memoria descriptiva, el EGTA es ácido etilenglicol-bis (beta-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético.

En el contexto de esta memoria descriptiva, PAO representa arsenóxido de fenilo.

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

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

En el contexto de esta memoria descriptiva, la expresión "equivalente de arsenóxido" se refiere a cualquier especie reactiva de ditiol que muestra esencialmente la misma afinidad hacia ditiolos que $-As=O$ o $As(OH)_2$, y la expresión incluye, por ejemplo, grupos que comprenden un elemento de transición y cualquier arsenical trivalente que se hidrolice a $-As=O$ o $-As(OH)_2$ cuando se disuelva en un medio acuoso (tal como tampones de cultivo de células y los líquidos contenidos en el organismo que se esté tratando).

ES 2 330 519 T3

En el contexto de esta memoria descriptiva, la expresión “grupo sustancialmente impermeable de membrana celular” se refiere a cualquier grupo que limite la velocidad a la que pasa un compuesto a través de una membrana celular y hacia el interior de la célula. Un grupo sustancialmente impermeable de membrana celular puede limitar la velocidad de entrada de un compuesto en una célula en virtud de una o más propiedades tales como, por ejemplo, carga, tamaño (peso molecular), polaridad, lipofilia, hidrofilia, etc.

El término “arsenical”, como se usa en la presente memoria, incluye cualquier compuesto que contenga arsénico.

El término “acilo”, como se usa en la presente memoria, incluye restos alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo y cicloalquenilo monovalentes y divalentes que poseen un sustituyente carbonilo terminal donde puede producirse la unión en el resto hidrocarburo, el resto carbonilo o ambos.

El término “alquilo”, como se usa en la presente memoria incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes, saturados, de cadena lineal y ramificada.

El término “alquenilo”, como se usa en la presente memoria incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes, de cadena lineal y ramificada, que tienen al menos un doble enlace.

El término “alquinilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes, de cadena lineal y ramificada, que tienen al menos un triple enlace.

El término “alquilenilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo divalentes, saturados, de cadena lineal.

El término “alquenileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo divalentes, de cadena lineal, que tienen al menos un doble enlace.

El término “alquinileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo divalentes, de cadena lineal, que tienen al menos un triple enlace.

El término “arilo” como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo aromáticos monovalentes, sencillos, polinucleares, conjugados y condensados.

El término “arileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo aromáticos divalentes, sencillos, polinucleares, conjugados y condensados.

La expresión “ditioles estrechamente separados”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado tioles que están químicamente próximos así como tioles que se ponen en yuxtaposición espacial en virtud de su conformación molecular.

El término “cicloalquilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados.

El término “cicloalquileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo divalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados.

El término “cicloalquenilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo monovalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados que tienen al menos un doble enlace.

El término “cicloalquenileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales hidrocarburo divalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados que tienen al menos un doble enlace.

El término “halo”, como se usa en la presente memoria, incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El término “heteroarilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales aromáticos monovalentes, sencillos, polinucleares, conjugados y condensados, que tienen de 1 a 12 átomos, donde de 1 a 6 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N y S.

El término “heteroarileno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales aromáticos conjugados y condensados divalentes, sencillos, polinucleares que tienen de 1 a 12 átomos, donde de 1 a 6 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N y S.

El término “heterocicloalquilo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales monovalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o condensados donde de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N o S.

El término “heterocicloalquileo”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales divalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados donde de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N o S.

El término “heterocicloalqueno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales monovalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados que tienen al menos 1 doble enlace y en el que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N o S.

El término “heterocicloalqueno”, como se usa en la presente memoria, incluye en su significado radicales divalentes, saturados, monocíclicos, bicíclicos, policíclicos o policíclicos condensados que tienen al menos un doble enlace y en el que de 1 a 5 átomos son heteroátomos seleccionados de O, N o S.

La expresión “ácido fenilarsénico”, como se usa en la presente memoria, debe considerarse sinónimo al “ácido bencenarsénico”.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. *El GSAO desencadenaba la apertura del MTP por reacción con y alteración del ANT.* A Estructura de GSAO, GSAA y GSCA. B GSAO desencadenó el hinchamiento de la mitocondria. El hinchamiento se midió por control de la disminución asociada de la dispersión de luz a 520 nm a lo largo de 60 min. Las señales son representativas de un mínimo de tres experimentos en al menos dos preparaciones mitocondriales diferentes. En la parte i, se incubaron mitocondrias con nada (●), GSAO 25 (○), 50 (▲), 100 (Δ) o 200 (■) μM . El control positivo para la apertura de poros era Ca^{2+} 150 μM y Pi 6 mM (□). En la parte ii, se incubaron mitocondrias con nada (●), GSCA 100 μM (Δ), GSAA 100 μM (▲) o GSAO 100 μM (■). El control positivo para la apertura de poros era PAO 25 μM (○). En la parte iii, se incubaron mitocondrias con GSAO 100 μM en ausencia (■) o presencia de Mg^{2+} 3 mM (▼), EGTA 100 μM (Δ), BKA 10 μM (▲), CsA 5 μM (▽) o ADP 8 mM (○). Se muestra sin tratamiento (●) para una comparación. C El aumento de la concentración de Ca^{2+} sensibiliza el MPTP a GSAO. Se incubaron mitocondrias con GSAO 50 (●), 75 (○), 100 (■) o 200 μM (□) en ausencia o presencia de una concentración creciente de Ca^{2+} y se midió el tiempo para un hinchamiento semimáximo. D Marcate de ANT con GSAO-B. Se marcaron mitocondrias de rata aisladas con GSAO-B en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de un exceso molar de 4 veces de 2,3-dimercaptopropanol (DMP) y las proteínas marcadas con biotina se recogieron en perlas de estreptavidina-agarosa, se resolvieron en un SDS-PAGE y se sometieron a una transferencia de Western para ANT. E El GSAO competía por la alquilación de Cys^{160} en ANT por eosina-maleimida. Se marcaron partículas submitocondriales de rata con eosina-5-maleimida en ausencia (carril 1) o presencia (carril 2) de GSAO y el ANT marcado con eosina se resolvió en un SDS-PAGE y se detectó por transiluminación.

Figura 2. *El GSAO se concentraba en mitocondrias en células viables.* Microscopía confocal de células BAE incubadas con GSAO-F (i) y Mitotracker Red (II), que muestra la colocalización de los compuestos en las mitocondrias de una célula individual. El GSAO-F no teñía células cuando se incubaban con DMP (iii y iv). El arsenical pentavalente, GSAA-F, tampoco teñía las células (v y vi).

Figura 3. *El GSAO desencadenaba la despolarización mitocondrial y la apoptosis en células endoteliales en proliferación pero no de crecimiento en estado quiescente.* A El GSAO reducía la viabilidad de células endoteliales en proliferación, pero no de crecimiento en estado quiescente. Por el contrario, el PAO era igualmente tóxico para ambos tipos de células. Las células BAE se detuvieron durante 24 h en medio que contenía suero a 0,25%, después se cultivaron durante 48 h adicionales en medio que contenía suero a 0,25% o a 10% con GSAO (i) o PAO (ii). Se midió el número de células unidas después de un tratamiento de 48 h. Los resultados son la media $\pm$ ET de tres experimentos. B El GSAO desencadenaba la despolarización mitocondrial e inducía la apoptosis en células BAE. Las células se cultivaron durante 48 h en medio que contenía suero a 10% y GSAO y después se marcaron con JC-1 o anexina V. El porcentaje de células positivas para despolarización de membrana mitocondrial (fluorescencia verde/roja de JC-1) y se midió la inducción de apoptosis (unión a anexina V). Se observó el mismo resultado en dos experimentos diferentes.

Figura 4. *El GSAO inhibía la producción de ATP y aumentaba los niveles de superóxido en células endoteliales en proliferación pero no de crecimiento en estado quiescente.* A Se cultivaron células BAE durante 24 h en medio que contenía suero a 0,5% o a 10% y después 24 h adicionales en presencia de GSAO. En la parte I, se midieron los niveles de ATP celular usando un ensayo de luciferina/luciferasa. Los resultados son la media $\pm$ ETM de cuatro experimentos. En la parte II, se midió la masa mitocondrial a partir de la captación de naranja de nonil acridina (NAO). Los resultados son la media $\pm$ intervalo de dos experimentos. B. Nivel de superóxido medido con dihidroetidina en células BAE que se habían cultivado durante 24 h en medio que contenía suero a 0,5% o 10% y después durante 24 h adicionales en presencia de GSAO. Los resultados son la media $\pm$ el intervalo de dos experimentos. C Medición simultánea de O_2 (eje y) en células BAE cultivadas en medio que contiene suero a 10% y GSAO durante 24 h. El porcentaje de células en cada cuadrante se muestra en la esquina más externa.

Figura 5. *El GSAO inducía la liberación del citocromo c desde la mitocondria.* Se incubaron mitocondrias de hígado de rata durante 0-60 min con GSAO 100 μM y se midió el citocromo c liberado hacia el medio por transferencia de Western. Se muestra la transferencia de Western y la cuantificación correspondiente. B se incubaron mitocondrias de hígado de rata durante 30 min con nada, GSAO 100 μM , GSAO 100 μM y ciclosporina (CsA) 5 μM , o Ca^{2+} 150 μM y Pi 6 mM como control positivo. Se midió el citocromo c liberado hacia el medio por transferencia de Western.

Figura 6. Comparación de la inducción de MPTP por análogos de GSAO y GSAO.

Figura 7. Correlación de la inducción de MPTP y peso molecular para GSAO y análogos relacionados.

5 Figura 8. Correlación de la inducción de MPTP y Log P para GSAO y análogos relacionados.

Figura 9. Comparación de la actividad antiproliferativa en células BAE e inducción de MPTP.

10 Figura 10. Inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial por GSAO o o-GSAO. Se midió el hinchamiento por disminución de la dispersión de luz a 520 nm. Se incubaron mitocondrias aisladas con diferentes concentraciones de GSAO (parte A) o o-GSAO (parte B). El semi-tiempo para el hinchamiento en función de la concentración de GSAO o o-GSAO en dos experimentos diferentes se muestra en la parte C. El semi-tiempo para el hinchamiento en función de la concentración de GSAO o PAO se muestra en la parte D. El control positivo en las partes A y B era Ca^{2+} 150 μM y Pi 6 mM (■).

15 Figura 11. Dependencia de calcio del efecto de GSAO o o-GSAO sobre la transición de permeabilidad mitocondrial. Se incubaron mitocondrias con diferentes concentraciones de GSAO (parte A) o o-GSAO (parte B) a concentraciones crecientes de Ca^{2+} y se midió el tiempo para un hinchamiento semimáximo.

20 Figura 12. Los ligandos de ANT bloquean la inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial por o-GSAO. Se incubaron mitocondrias con o-GSAO 200 μM en ausencia o presencia de EGTA, Mg^{2+} , CSA o ADP. El control positivo era Ca^{2+} 150 μM y Pi 6 mM (■).

Descripción detallada

25 La presente invención se refiere a procesos *in vitro* para identificar compuestos que se unen a ANT en mitocondrias e inducen selectivamente la MPT en células en proliferación respecto a células que no están en proliferación.

El ANT es una proteína de 30 kD que atraviesa la membrana mitocondrial interna y es fundamental para el MPTP (Crompton *et al.*, 1988). Existen tres cisteínas no emparejadas en el lado de la matriz de ANT-Cys⁵⁷, Cys¹⁶⁰ y Cys²⁵⁷. (Halestrap *et al.*, 1997). La actividad de ANT está controlada por la unión de Ca^{2+} , ciclofilina D y nucleótidos adenina. La ciclofilina D (Crompton *et al.*, 1988) y los nucleótidos de adenina (Haworth y Hunter, 1979a, b; Haworth y Hunter, 2000) se unen al lado de la matriz de ANT mientras que aún no se ha determinado el sitio o sitios para la interacción del Ca^{2+} . Existen varios reguladores conocidos del MPTP que parecen actuar modulando la unión de estos tres compuestos. 30 El desencadenamiento primario para la apertura del MPTP es un aumento en la concentración de Ca^{2+} . La quelación de Ca^{2+} con EGTA bloquea la apertura de poros. La especificidad del sitio de desencadenamiento (presumiblemente en ANT) para Ca^{2+} parece ser absoluta, ya que otros iones de metales divalentes tales como Mg^{2+} actúan como inhibidores (Haworth y Hunter, 1979a). La unión de ciclofilina D a ANT es necesaria para la apertura de poros a concentraciones de Ca^{2+} submilimolares (Halestrap *et al.*, 2002). La ciclosporina A (CsA) bloquea la apertura de 40 poros por unión a ciclofilina D y desplazamiento de la misma del ANT (Crompton *et al.*, 1988). El ADP de la matriz también es un modulador importante de la apertura de poros que se une a ANT y disminuye la sensibilidad del sitio de desencadenamiento a Ca^{2+} (Haworth y Hunter, 1979a, b). El ácido bonkrékico (BKA) también interacciona con ANT y disminuye la sensibilidad a Ca^{2+} (Hunter y Haworth, 1979).

45 Generalmente, el proceso para identificar un compuesto que induzca la MPT en células en proliferación de acuerdo con la invención comprende poner en contacto una célula o extracto celular con un compuesto candidato, determinar si el compuesto se une a ANT y después determinar si el compuesto induce selectivamente la MPT en células en proliferación. La evaluación de si un compuesto induce selectivamente la MPT en las células en proliferación puede determinarse por comparación del efecto de un compuesto que se ha identificado que se une a ANT sobre la MPT 50 en células en proliferación con el efecto del compuesto sobre la MPT en células que no están en proliferación o de crecimiento en estado quiescente.

Puede realizarse el control de la inducción de MPT usando técnicas convencionales conocidas por los especialistas en la técnica. Por ejemplo, controlando espectrofotométricamente el cambio en la dispersión de la luz a una longitud de onda dada para diferentes concentraciones de compuesto. Una longitud de onda adecuada es típicamente de 520 nm. 55

La detección de la captación de un compuesto hacia la mitocondria de una célula puede realizarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden usarse compuestos marcados fluorescentes o puede unirse un fluoróforo a un compuesto. Los ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen fluoresceína y CyTM5.5. La localización subcelular de compuestos puede detectarse por técnicas convencionales, incluyendo microscopía de fluorescencia confocal. Como alternativa, los compuestos pueden unirse a otros grupos detectables, por ejemplo, biotina, y detectarse por tinción con estreptavidina, tal como Estreptavidina-Alexa Fluor 488. 60

65 Puede evaluarse el potencial transmembrana mitocondrial usando técnicas convencionales, incluyendo, por ejemplo, colorantes tales como JC-1 y tinciones, tales como anexina V-FITC. Mediante dichas técnicas es posible determinar si las células han experimentado la MPT y evaluar si se ha inducido la apoptosis.

Se generan especies de oxígeno reactivo tales como anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como subproducto de la producción de ATP y desempeñan un papel importante como intermediarios de señalización en la proliferación celular, pero a elevadas concentraciones detienen la proliferación e inducen la apoptosis dañando los lípidos, proteínas, ADN y ARN (Zanetti *et al.* 2001). El O_2^- se convierte en la mitocondria en H_2O_2 mediante la Mn superóxido dismutasa (SOD) pero también puede liberarse de la mitocondria a través de canales aniónicos, donde se dismuta en H_2O_2 mediante la Cu/Zn SOD citosólica (Vanden Hoek *et al.*, 1998).

La invención se ilustrará ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Síntesis de Compuestos

Métodos

Síntesis de GSAA

Se preparó BRAA por una modificación del método descrito en Donoghue *et al.* (2000) y en el documento WO 01/21628. Se añadió en porciones ácido *p*-arsanílico (20,6 g, 95 mmol) a una solución de carbonato sódico (20 g, 189 mmol) en agua (200 ml). Cuando se disolvieron todos los sólidos, se descubrió que el pH de la solución era 10, y se enfrió a 4°C durante 2 horas. Se añadió en dos porciones bromuro de bromoacetilo (15 ml, 173 mmol) en diclorometano seco (35 ml), cada porción seguida de agitación vigorosa durante 2 a 3 min. La mezcla se dejó en reposo durante unos minutos, y la capa orgánica inferior se retiró por drenaje. Se precipitó ácido 4-(*N*-(bromoacetil)amino)bencenoarsónico (BRAA) por acidificación de la solución a aproximadamente pH 2-3 con la adición gota a gota de ácido sulfúrico al 98%, se recogió por filtración al vacío y se secó, dando BRAA en forma de un sólido de color blanco.

Se mezclaron juntos BRAA (3,38 g, 10 mmol), glutatión reducido (3,23 g, 10,5 mmol) y bicarbonato sódico (3,15 g, 37,5 mmol) y la mezcla sólida se disolvió en porciones en tampón bicarbonato 0,5 M (100 ml). Se descubrió que la solución transparente tenía un valor de pH de 9, se mezcló minuciosamente y se dejó durante una noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la solución se acidificó hasta alcanzar pH neutral con la adición gota a gota de ácido clorhídrico al 32% y el producto se precipitó en etanol absoluto (1 l) mediante la adición gota a gota de la solución acidificada al alcohol bien agitado. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después se dejó durante 3 horas hasta que el precipitado se sedimentó. La solución etanólica transparente se decantó hasta que quedaron ~300 ml y después se agitó vorticialmente y se centrifugó a 2000 g durante 5 min. El producto ácido 4-(*N*-((*S*-glutathionil)acetil)amino)-bencenoarsónico (GSAA) se lavó por re-suspensión en etanol absoluto reciente recién preparado y se centrifugó de nuevo. El lavado se repitió dos veces más y la suspensión final se secó para dar un sólido de color blanco, GSAA, por evaporación rotatoria. El GSAA se caracterizó por 1H RMN (D_2O 300 MHz) y ^{13}C RMN (D_2O , 75 MHz) y tiene un peso molecular de 564.

Síntesis de GSAO

El análisis completo de GSAO se describe en la solicitud de patente internacional WO 01/21628, cuyo contenido entero se incorpora en la presente memoria como referencia cruzada. Se preparó BRAA como se ha descrito anteriormente. Después, BRAA se convirtió en ácido 4-(*N*-(bromoacetil)amino)-bencenoarsonoso (BRAO) usando el método descrito en Donoghue *et al.* (2000). El procedimiento para la conversión de BRAO en GSAO es una modificación del descrito en Donoghue *et al.* (2000), como se indica a continuación. Se disolvió glutatión reducido (16 g, 52 mmol) en agua desoxigenada (1 l) en una atmósfera de nitrógeno (se preparó agua desoxigenada por ebullición seguido de refrigeración a temperatura ambiente, todo el tiempo en una atmósfera de nitrógeno). Se suspendió BRAO (25 g, 77 mmol) en la solución y se aplicó agitación vigorosa de la mezcla hasta que el BRAO no disuelto había perdido toda la tendencia a flotar, momento en el que se disminuyó la velocidad de agitación. Se añadió trietilamina (16 ml, 11,6 g, 115 mmol) y la mezcla se agitó durante al menos 18 horas, todo el tiempo en una atmósfera de nitrógeno. Se retiró algún sólido incoloro por filtración rápida al vacío y el filtrado se concentró para dar un gel viscoso en un evaporador rotatorio. El gel se diluyó con etanol (250 ml), la velocidad de agitación se aumentó y después se añadió acetona (250 ml), con formación de un sólido de color blanco. Después de agitar durante 2 horas en una atmósfera de nitrógeno, el sólido se recogió por filtración al vacío y se secó a temperatura ambiente al vacío hasta alcanzar un peso constante. El análisis del material por 1H RMN permitió determinar la cantidad de trietilamina. Se añadió una cantidad equivalente de hidróxido sódico (es decir, 1 mmol de NaOH por mmol de trietilamina) en forma de una solución acuosa 10 M a una solución del material en la cantidad mínima de agua desoxigenada. La solución se agitó en una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas y se obtuvo GSAO (en forma de la sal sódica) por retirada del disolvente en un evaporador rotatorio. El GSAO se caracterizó por los siguientes métodos: 1H RMN (D_2O 400 MHz), ^{13}C RMN (D_2O , 100 MHz), HPLC y espectroscopía de infrarrojos (nujol mull). El análisis elemental era coherente con una composición de GSAO·2 H_2O , y el espectro de masas dio el ión molecular parental a 549,1 m.u. $[GSAO+H]^+$. La pureza de GSAO fue >94% por HPLC.

Síntesis de GSCA

Se preparó GSCA de una manera similar a GSAA, usando ácido 4-aminobenzoico en lugar de ácido *p*-arsanílico como se indica a continuación. Se preparó una solución alcalina fría de ácido 4-aminobenzoico (13 g, 95 mmol) como se ha descrito anteriormente para *p*-arsanílico y se hizo reaccionar de una manera idéntica con bromuro de bromoacetilo. La capa orgánica inferior se retiró por drenaje y se precipitó ácido 4-(*N*-(bromoacetil)amino)-benzoico (BRCA) directamente de la solución por sí mismo. Siguiendo el resto del procedimiento para GSM de forma exacta usando BRCA (2,58 g, 10 mmol) en lugar de BRAA se dio GSCA en forma de un sólido de color blanco después de la evaporación rotatoria. El GSCA se caracterizó por ¹H RMN (D₂O, 300 MHz) y ¹³C RMN (D₂O 75 MHz) y la sal disódica tiene un peso molecular de 528.

Síntesis de biotina y derivados de fluoresceína de GSAO y GSAA

Se produjo GSAO-B como se describe por Donoghue *et al.* (2000) y tiene un peso molecular de 1001. Se añadió una solución de fluorescein-5-EX succinimidil éster (Molecular Probes, Eugene, OR) (2,4 mg, 4,1 μmol) en DMSO (240 μl) a GSAO o GSM (33,8 mM) en tampón Mes, pH 5,5 (5 mM, 473 μl), la mezcla se diluyó con tampón bicarbonato, pH 9 (0,5 M, 3,287 ml) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 80 min. Después, la reacción se diluyó con glicina (100 mM) en PBS (4 ml) y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante una noche. La solución final contenía arsénico trivalente (2,0 mM) y glicina (50 mM). La proporción molar de fluorescein-5X a GSAO o GSAA era ~1,5:1. Los pesos moleculares de GSAO- y GSAA-fluoresceína (GSAO-F y GSAA-F) son 1024 y 1040, respectivamente.

Síntesis de ácido 2-(2-bromoacetil-o-amino)bencenoarsónico

Se disolvió ácido *o*-arsanílico (4,70 g, 21,7 mmol) en KOH 1,85 M (25 ml) y después se hizo reaccionar con Na₂CO₃ (6 g) y se diluyó con H₂O (25 ml). La solución se enfrió en hielo durante 30 min y después se añadió a un embudo de decantación de 250 ml. Al embudo de decantación se le añadió cuidadosamente una solución de bromuro de bromoacetilo (4 ml, 46,0 mmol) en CH₂Cl₂ (20 ml) durante aproximadamente 30 min con agitación frecuente y liberación de CO₂ (g). Después de que cesara el desprendimiento de CO₂, el CH₂Cl₂ se separó y la capa acuosa se acidificó con H₂SO₄ conc. Se produjo como resultado un precipitado de color blanco que se recogió por filtración (6 g, 82% de rendimiento).

Síntesis de ácido 2-(2-bromoacetil-o-amino)bencenoarsonoso

Se disolvió ácido 2-(2-bromoacetilamino)bencenoarsónico (6 g, 17,8 mmol) en HBr/MeOH (1:1), se añadió NaI (80 mg) y la reacción se purgó con N₂ y se enfrió a 0°C. Se burbujó SO₂ a su través a aprox. 4 burbujas/segundo y después de 15 min comenzó a formarse un precipitado de color blanco. Se burbujó SO₂ a su través durante 2,5 h más según se calentaba la reacción a temperatura ambiente. La reacción se purgó con N₂ durante 10 min y el sólido se recogió por filtración lavando con H₂O (x 3) y éter (x 2) para dar 1,35 g de ácido 2-(2-bromoacetilamino)bencenoarsonoso. Se obtuvieron 0,25 g más a partir del filtrado inicial. Rendimiento total (1,60 g, 28%).

Síntesis de ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsónico

Se disolvió ácido *p*-arsanílico (20 g, 92 mmol) en KOH 1,85 M (100 ml) y después se trató con Na₂CO₃ (30 g) y H₂O (100 ml). La solución se enfrió en hielo durante 30 min y después se añadió a un embudo de decantación de 500 ml. Al embudo de decantación se le añadió cuidadosamente una solución de bromuro de bromoacetilo (18 ml, 184 mmol) en CH₂Cl₂ (60 ml) con agitación frecuente y liberación de CO₂ (g). La adición duró aproximadamente 2 h. Después de que cesara el desprendimiento de CO₂ (g), el CH₂Cl₂ se separó y la capa acuosa se acidificó con H₂SO₄ al 98%. Se produjo como resultado un precipitado de color blanco que se recogió por filtración y se secó durante 18 h en un desecador. Se obtuvieron 24 g (72 mmol, 78% de rendimiento).

Síntesis de ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso

Se disolvió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsónico (15 g, 45 mmol) en 150 ml de HBr al 48% (ac.) / MeOH (1:1). Se añadió NaI (200 mg, 13 mmol) y la reacción se purgó con N₂ y se enfrió sobre hielo. Se burbujó SO₂ (g) a su través a aprox. 2 burbujas/segundo y después de 5 h comenzó a formarse un precipitado de color blanco. Se burbujó SO₂ (g) a su través durante 2 h más según se calentaba la reacción a 25°C. La reacción se purgó con N₂ durante 10 min y el sólido se recogió por filtración lavando con H₂O (x 3) y éter (x 2) para dar 1,35 g de ácido 2-(2-bromoacetilamino)bencenoarsonoso. Se obtuvieron 5,5 g (17 mmol, 38% de rendimiento).

ES 2 330 519 T3

Síntesis de NH₂-Glu-Cys-(CH₂CONH-C₆H₄-o-As{OH}₂)-Gly-OH "o-GSAO" (1)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetilamino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (5 ml). Se añadió Net₃ (250 µl, 1,7 mmol) seguido de glutatión (160 mg, 0,521 mmol). Se confirmó que el pH de la mezcla de reacción era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 20 h. La reacción se filtró a través de un filtro vitrificado y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. El sobrenadante se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se decantó y se secó adicionalmente al vacío. El o-GSAO polvoriento seco se disolvió en H₂O (4 ml) y se inyectó en la HPLC semi-preparativa, columna C₁₈ Vydac Protein & Peptide. Tampón A: TFA al 0,1% en agua filtrada y desgasificada, Tampón B: TFA al 0,1% en acetonitrilo filtrado y desgasificado-agua filtrada y desgasificada (9:1). Las fracciones se recogieron y se liofilizaron. La estructura de o-GSAO se confirmó por LC-MS (M⁺ 548,4) y por ¹H RMN. La pureza por HPLC fue de 96,9% a 98,8% para 4 extracciones.

Síntesis de retro-HO-Cys-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-carbonil-Glu-OH (3)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (80 mg, 0,25 mmol) en H₂O desgasificado (2 ml). Se añadió Net₃ (70 µl, 0,5 mmol) seguido de retro-HO-Cys-carbonil-Glu-OH (50 mg, 0,17 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de retro-HO-Cys-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-carbonil-Glu-OH (4)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (80 mg, 0,25 mmol) en H₂O desgasificada (2 ml). Se añadió HEU (70 µl, 0,5 mmol) seguido de retro-HO-Cys-carbonil-Glu-OH (50 mg, 0,17 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 18 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de H-Arg-Gly-Asp-Cys(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-OH (6)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (80 mg, 0,25 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (70 µl, 0,5 mmol) seguido de H-Arg-Gly-Asp-Cys-OH (50 mg, 0,11 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de H-Gly-Gly-Cys(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-OH (7)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (220 µl, 1,6 mmol) seguido de H-Gly-Gly-Cys-OH (141,2 mg, 0,8 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

ES 2 330 519 T3

Síntesis de H-Val-Thr-Cys(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-Gly-OH (8)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (80 mg, 0,25 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (70 µl, 0,5 mmol) seguido de H-Val-Thr-Cys-Gly-OH (50 mg, 0,13 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de H-Cys-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-OH (9)

Reducción de ácido preslonoico: disolver el péptido en 10 ml de bicarbonato sódico 0,1 M, solución de DTT (99 mg, 0,65 mmol) desgasificada con N₂. Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8 y proteger la mezcla con N₂. Después de 2 h, acidificar la solución con AcOH y liofilizar la mezcla. Purificar por RP-HPLC semi-preparativa después de disolver en una solución acuosa al 0,1% de TFA. Liofilizar.

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (26 mg, 0,081 mmol, 14 equiv.) en H₂O desgasificada (3 ml). Se añadió Net₃ (20 µl, 0,14 mmol) seguido de ácido preslonoico (22 mg, 0,028 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 18 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,0 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de ácido 3-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-I-propanosulfónico (10)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (220 µl, 1,6 mmol) seguido de ácido 3-mercaptopropanosulfónico (108,9 mg, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de ácido 3-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-I-propiónico (11)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (210 µl, 1,5 mmol) seguido de ácido mercaptopropiónico (53 µl, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de ácido 1-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-mercaptosuccínico (13)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (210 µl, 1,5 mmol) seguido de ácido mercaptosuccínico (90 mg, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 µM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 15 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

ES 2 330 519 T3

Síntesis de 1-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-β-D-glucosa (14)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (210 μl, 1,5 mmol) seguido de 1-tio-β-D-glucosa (130,9 mg, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 μM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de 3-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-1,2-propanodiol (15)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (4 ml). Se añadió Net₃ (210 μl, 1,5 mmol) seguido de 3-mercapto-1,2-propanodiol (65 μl, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,5 μM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de ácido 5-S-(CH₂CONHC₆H₄-p-As{OH}₂)-1-tetrazolacético (21)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-p-amino)bencenoarsonoso (288 mg, 0,90 mmol) en H₂O desgasificada (5 ml). Se añadió Net₃ (210 μl, 1,5 mmol) seguido de ácido 5-mercapto-tetrazolacético (110 mg, 0,6 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 16 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 μM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de H-Gly-Gly-Cys(CH₂CONHC₆H₄-o-As{OH}₂)-OH (22)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-o-amino)bencenoarsonoso (180 mg, 0,5 mmol) en H₂O desgasificada (1 ml). Se añadió Net₃ (140 μl, 1,0 mmol) seguido de H-Gly-Gly-Cys-OH (61 mg, 0,26 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 20 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 μM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Síntesis de H-Val-Thr-Cys(CH₂CONHC₆H₄-o-As{OH}₂)-Gly-OH (23)

Se suspendió ácido 2-(2-bromoacetil-o-amino)bencenoarsonoso (80 mg, 0,25 mmol) en H₂O desgasificada (1 ml). Se añadió Net₃ (70 μl, 0,50 mmol) seguido de H-Val-Thr-Cys-Gly-OH (50 mg, 0,13 mmol). Se confirmó que el pH de la solución era pH ≥ 8. La suspensión de color blanco se agitó vigorosamente en una atmósfera de N₂ durante 20 h. La reacción se filtró a través de un disco 0,45 μM desechable y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se transfirió a un tubo de plástico y se añadieron 2 ml de EtOH/acetona (1:1), dando como resultado un precipitado de color blanco. El tubo se tapó y se almacenó a 4°C durante 1,5 h. La solución se centrifugó y se decantó, dejando un sólido de color blanco, que se disolvió de nuevo en MeCN-Agua. La muestra en bruto se analizó por RP-HPLC y LCMS. El producto se purificó por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones se secaron en el speed-vac.

Ensayo de concentración de arsénico

Las concentraciones de GSAO, GSAO-B y GSAO-F se midieron por valoración con dimercaptopropanol y calculando los tioles libres restantes con ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (Sigma, St Louis, MO) (Donoghue *et al.*, 2000). Los conjugados se filtraron mientras permanecían estériles y se almacenaron a 4°C en la oscuridad hasta su uso. No hubo ninguna pérdida significativa en la concentración activa de soluciones madre de los arsenicales durante al menos una semana cuando se almacenaron en estas condiciones.

Ejemplo 2

El GSAO desencadenaba la apertura de MTP por reacción con y alteración del ANT

5 Métodos

Ensayo de hinchamiento de mitocondrias

Se aislaron mitocondrias de los hígado de ratas Wistar macho de ~250 g usando centrifugación diferencial como se ha descrito anteriormente (Schnaitman y Greenawalt, 1968). El sedimento mitocondrial final se resuspendió en tampón HEPES-KOH 3 mM, pH 7,0 que contenía manitol 213 mM, sacarosa 71 mM y succinato de sodio 10 mM a una concentración de 30 mg de proteína por ml. La inducción de MPT se evaluó espectrofotométricamente suspendiendo las mitocondrias de hígado a 0,5 mg de proteína por ml a 25°C en tampón HEPES-KOH 3 mM, pH 7,0, que contiene manitol 75 mM, sacarosa 250 mM, succinato de sodio 10 mM y rotenona 2 μ M. Todos los componentes de tampón eran de Sigma, St Louis, MO. Los derivados arsenicales y el GSCA se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene glicina 100 mM. Los compuestos de unión a ANT empleados eran CsA, BKA y ADP (Sigma, St. Louis, MO). Las concentraciones de reactivo se indican en las leyendas de la figuras. Se midió el hinchamiento por control de la disminución asociada de la dispersión de luz a 520 nm usando un lector de microplacas Molecular Devices Thermomax Plus (Palo Alto, CA).

20

Unión de GSAO a ANT

Se suspendieron mitocondrias de hígado de rata a 1 mg de proteína por ml a 25°C en tampón HEPES-KOH 3 mM, pH 7,0 que contenía manitol 213 mM, sacarosa 71 mM y succinato de sodio 10 mM y se incubaron con GSAO-B 100 μ M en ausencia o presencia de 2,3-dimercaptopropanol 400 μ M (Fluka, Buchs, SG, Suiza) a temperatura ambiente en una rueda giratoria durante 1 h. Las mitocondrias marcadas se lavaron tres veces con PBS y se sonicaron en 0,3 ml de tampón Tris 25 mM, pH 7,4 enfriado en hielo que contenía NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Triton X-100 a 0,5%, Tween-20 a 0,05%, leupeptina 10 μ M, aprotinina 10 μ M, fluoruro de 4,2- (aminoetil)-benceno sulfonilo 50 μ g.ml⁻¹ y EDTA 5 mM. El lisado se aclaró por centrifugación a 18000 g durante 10 min a 4°C y se incubó con 30 μ l de estreptavidina-Dynabeads (Dynal, Oslo, Noruega) durante 60 min a 4°C en una rueda giratoria para aislar las proteínas marcadas con biotina. Las perlas se lavaron 5 veces con tampón de sonicación y las proteínas marcadas con biotina se liberaron de las perlas por ebullición en 30 μ l de tampón SDS-Laemmli durante 2 minutos. Las muestras se resolvieron en iGels de gradiente de 8-16% en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas se detectaron mediante transferencia de Western usando una dilución 1:500 de anticuerpo policlonal de cabra anti-ANT humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y una dilución 1:2000 de anticuerpos de conejo anti-cabra conjugados con peroxidasa (Dako, Carpinteria, California).

40 *Marcaje de ANT con eosin-5-maleimida*

Se prepararon partículas submitocondriales de hígado de rata por sonicación y centrifugación diferencial de acuerdo con Majima *et al.* (1998). Las partículas se suspendieron a 20 mg de proteína por ml en tampón Tris 10 mM pH 7,2 que contenía sacarosa 250 mM y EDTA 0,2 mM y se incubaron sin o con GSAO 200 nmol por mg de proteína durante 10 min a 25°C, seguido de 20 nmol de eosin-5-maleimida por mg de proteína durante 1 min a 0°C en la oscuridad. El marcaje se terminó por adición de 10 μ mol de ditiotritol por mg de proteína. Las proteínas se resolvieron en iGels de gradiente de 4-20% y el ANT marcado con eosina se visualizó por transiluminación UV usando un Fluor-S™ Multilmager (Bio-Rad, Hercules, CA).

50

Resultados

El GSAO (Fig. 1A) desencadenaba el hinchamiento de mitocondrias de hígado de rata aisladas (Fig. 1B). La velocidad de hinchamiento aumentaba con el aumento de la concentración de GSAO y del tiempo de incubación. El resto arsenical trivalente de GSAO era responsable de su actividad ya que los compuestos arsenical pentavalente (ácido 4-(N-((S-glutationil)acetil)amino)bencenarsénico, GSAA) o de ácido carboxílico (ácido 4-(N-((S-glutationil)acetil)amino)benzoico, GSCA) correspondientes (Fig. 1A) no tenían efecto (Fig. 1Bii). Los controles positivos para apertura de poros eran iones Ca²⁺ y Pi (Fig. 1Bi) y PAO (Fig. 1Bii).

La actividad de ANT se controla por la unión de Ca²⁺, ciclofilina D y nucleótidos de adenina. La ciclofilina D (Crompton *et al.*, 1988) y los nucleótidos de adenina (Haworth y Hunter, 1979a,b) se unen al lado de la matriz de ANT mientras que aún no se ha determinado el sitio o sitios para la interacción de Ca²⁺. El desencadenamiento primario para la apertura del MPTP es un aumento en la concentración de Ca²⁺ en la matriz. La quelación de Ca²⁺ con EGTA bloquea la apertura del poro. La especificidad del sitio de desencadenamiento para Ca²⁺ parece ser absoluta ya que otros iones de metales divalentes tales como Mg²⁺ actúan como inhibidores (Haworth y Hunter, 1979a). La unión de ciclofilina D a ANT es necesaria para la apertura de poros a concentraciones de Ca²⁺ submilimolares (Halestrap *et al.*, 2002). La ciclosporina A (CsA) bloquea la apertura de poros por unión a ciclofilina D y desplazamiento de la misma del ANT (Crompton *et al.*, 1988). El ADP de la matriz también es un modulador importante de la apertura de poros

que se une a ANT y disminuye la sensibilidad del sitio de desencadenamiento a Ca^{2+} (Haworth y Hunter, 1979a,b). El ácido bonkrékico (BKA) también interacciona con ANT y disminuye la sensibilidad a Ca^{2+} (Hunter y Haworth, 1979).

El Mg^{2+} , EGTA, CsA, ADP y BKA bloquean todos el efecto del GSAO sobre la apertura de poros (Fig. 1Biii). Estas observaciones concuerdan con un efecto específico del GSAO sobre la apertura de poros y confirman al ANT como su diana.

El semi-tiempo para el hinchamiento de la mitocondria mediado por GSAO se redujo por Ca^{2+} añadido (Fig. 1C). Este resultado concuerda con que el GSAO entrecruza dos de los tres restos cisteína en el ANT que sobresalen hacia la matriz mitocondrial.

La interacción directa del ANT con un GSAO marcado con biotina (fenilarsenóxido de 4-(N-(S-(N-(6-((biotinil)amino)hexanoil)amino)hexanoil)-glutathionil)acetil)amino), GSAO-B, se muestra en la Figura 1D. El marcaje de ANT con GSAO-B era específico ya que presentaba competición con un exceso molar de 4 veces del ditiol sintético pequeño, dimercaptopropanol. La eosina-maleimida alquila la Cys^{160} en el ANT (Majima *et al.*, 1998) y bloquea la unión a ADP (Halestrap *et al.*, 1997). El GSAO competía por la alquilación por eosina-maleimida de la Cys^{160} del ANT (Fig. 1E), que implicaba que el GSAO entrecruza Cys^{160} y Cys^{257} .

Ejemplo 3

El GSAO se concentraba en mitocondrias en células viables

Métodos

Cultivo Celular

Se cultivaron células endoteliales aórticas bovinas (BAE) (ATCC, Rockville, MD) en DMEM complementado con suero fetal de ternera a 10% (FCS), L-glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina 5 U.ml⁻¹ (Gibco, Galthersburg, MD). La línea celular endotelial microvascular humana, HMEC-1 (Ades *et al.*, 1992), se cultivó en medio MCDB131 (Gibco) complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina/estreptomicina 5 U.ml⁻¹, factor de crecimiento epidérmico 10 ng.ml⁻¹ (Sigma, St. Louis, MO) e hidrocortisona 1 µg.ml⁻¹ (Sigma). Se adquirió material de plástico de cultivo de células en Coming Costar (Corning, NY). La solución de tripsina/EDTA era de Gibco.

Inmunocitoquímica y microscopía confocal

Se sembraron células BAE a una densidad de 10⁴ células por pocillo en portaobjetos de cámara de vidrio Labtek de 8 pocillos (Nunc, Naperville, IL) y se dejó que se adhirieran durante una noche. Las células se lavaron una vez y el medio se substituyó con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) (Gibco). Las células se incubaron después durante 1 h con GSAO-F 50 µM, GSAO-F 50 µM y dimercaptopropanol 250 µM o GSAA-F 50 µM. Todas las células se contratiñeron con Mitotracker™ Red CMXRos 100 nM (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células se lavaron después tres veces con HBSS, se fijaron durante 10 min con acetona a 80% y metanol a 20% y se lavaron tres veces con HBSS. Los portaobjetos se montaron en agente protector de fluorescencia VectaShield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se sellaron con laca de uñas. Las imágenes se capturaron usando un microscopio invertido Leica DM IRB y un sistema confocal con el programa informático confocal de Leica.

Resultados

Una característica sorprendente del GSAO era que se localizaba rápidamente en mitocondrias en células endoteliales microvasculares aórticas bovinas (BAE) (Figura 2) y dérmicas humanas (HMEC-1) (no se muestran los datos). El GSAO se conjugó con fluoresceína (GSAO-F) y se determinó su localización subcelular por microscopía de fluorescencia confocal. La tinción mitocondrial se confirmó por colocalización de GSAO-F con la sonda Mitotracker roja fluorescente que se acumula en la mitocondria de células con respiración activa (Figuras 2ii, iv y vi). La acumulación mitocondrial de GSAO-F era específica para la reactividad ditiol del GSAO ya que se suprimía en presencia de un exceso molar de cinco veces del ditiol sintético pequeño dimercaptopropanol (Figura 2iii) y el arsenical pentavalente correspondiente, GSAA-F, no teñía las células (Figura 2v). La localización mitocondrial también se observó en células BAE incubadas con GSAO-B seguido de tinción con estreptavidina-Alexa Fluor 488 (no se muestran los datos).

El ANT es abundante en la membrana mitocondrial interna. El secuestro de GSAO en el lado de la matriz del ANT dirigiría la importación entrópica del GSAO hacia la matriz. Este mecanismo se confirma por el descubrimiento de que el GSAA, que tiene de hecho la misma carga y tamaño que el GSAO, no reacciona con el ANT ni se acumula en la mitocondria.

Ejemplo 4

El GSAO inhibía la producción de ATP, aumentaba los niveles de superóxido y desencadenaba la despolarización mitocondrial y la apoptosis en células endoteliales en proliferación pero no de crecimiento en estado quiescente

Métodos

Ensayos de ATP

Se detuvieron células BAE en placas de cultivo de seis pocillos durante 24 h en suero a 0,5% o se dejaron en suero a 10%, después se trataron durante 24 h con GSAO 0, 60 ó 150 μ M. Las células se lavaron una vez, después se resuspendieron en PBS a 0,4 ml que contenía albúmina de suero bovino a 0,3%. Una muestra de 50 μ l de células se mezcló con 50 μ l de agua y 100 μ l de agente liberador de ATP (Sigma) y se midió la concentración de ATP usando una mezcla de ensayo de ATP con luciferina/luciferasa. Las unidades de luz se convirtieron a concentraciones de ATP usando un patrón de ATP en lugar de los 50 μ l de agua. Se realizó un recuento del número de células usando un contador Beckman Coulter y los moles de ATP se expresaron por millón de células.

Ensayos de proliferación celular

Se sembraron células BAE o HMEC-1 a una densidad de 10^4 células por célula en placas de 96 pocillos y se dejó que se adhirieran durante una noche y después se trataron como se indica. Para los experimentos que implicaban la detención de la proliferación celular en suero a 0,25%, las células se sembraron en medio que contenía suero a 10%, se dejó que se adhirieran durante una noche, después se lavaron con PBS y se detuvieron durante 24 h en medio que contenía suero a 0,25%. Las células que permanecían unidas después de los tratamientos se midieron usando azul de metileno (Oliver *et al.*, 1989).

Ensayos de superóxido, potencial de membrana mitocondrial, masa mitocondrial y apoptosis

Para mediciones de niveles de superóxido con dihidroetidina, potencial de membrana mitocondrial con JC-1, masa mitocondrial con naranja de nonil acridina y apoptosis con anexina V, se trataron células BAE en proliferación o de crecimiento en estado quiescente durante 24 o 48 h con GSAO en placas de cultivo de seis pocillos, después se despegaron con tripsina/EDTA, se lavaron una vez y se resuspendieron a 2×10^6 células por ml en medio sin suero. Después las células se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente con dihidroetidina (5 μ M, Molecular Probes) o 30 min a temperatura ambiente con JC-1 (0,5 μ g. ml^{-1} , Molecular Probes), anexina V-FITC (50 μ l. ml^{-1}) (Pharmingen, La Jolla, CA, Estados Unidos) o 10-nonil bromuro de naranja de acridina (5 μ M, Molecular Probes). Después las células se lavaron una vez, se resuspendieron en 0,5 ml de medio sin suero, se transfirieron a hielo y se cuantificó la fluorescencia inmediatamente por citometría de flujo.

Resultados

El GSAO se concentraba en mitocondrias en células viables y alteraba la función mitocondrial y la viabilidad celular. Teniendo las células en proliferación una mayor masa mitocondrial y respiración que las células de crecimiento en estado quiescente. Para ensayar si el GSAO podía tener efectos selectivos sobre células en proliferación, se incubaron células BAE en proliferación o de crecimiento en estado quiescente durante 48 h con concentraciones crecientes de GSAO.

Las CI_{50} de GSAO para la reducción de la viabilidad de células BAE en proliferación era de ~ 75 μ M (Figura 3Ai), mientras que el compuesto tenía escaso efecto sobre células de crecimiento en estado quiescente. Los compuestos de control, GSAA y GSCA, no tenían efectos significativos sobre la viabilidad de células BAE en proliferación a concentraciones de hasta 1,0 mM (no se muestran los datos). El efecto del GSAO sobre la viabilidad células en proliferación dependía del tiempo. La CI_{50} del GSAO disminuía de ~ 75 μ M a ~ 25 μ M cuando el tiempo de incubación aumentaba de 48 a 72 h (no se muestran los datos). El PAO, por el contrario, era igualmente tóxico para células BAE tanto en proliferación como de crecimiento en estado quiescente con una CI_{50} de ~ 200 nM (Figura 3A(ii)). Los mismos resultados se observaron con células HMEC-1 (no se muestran los datos). El efecto del GSAO sobre la viabilidad de células endoteliales en proliferación estaba estrechamente asociado con la pérdida de potencial transmembrana mitocondrial y apoptosis (Figura 3B). Estos parámetros se midieron usando el colorante JC-1 y anexina V conjugada con FITC, respectivamente. La proporción de distribución de JC-1 entre el citosol (fluorescencia verde) y la mitocondria (fluorescencia roja) refleja el potencial transmembrana mitocondrial (Smiley *et al.*, 1991), mientras que la anexina V se une a la fosfatidilserina expuesta en la superficie de células apoptóticas.

La unión de GSAO a ANT en células endoteliales en proliferación afectaba a la producción de ATP. El contenido de ATP de células BAE en proliferación era aproximadamente el doble que el de células de crecimiento en estado quiescente y la incubación con GSAO 150 μ M durante 24 h reducía los niveles de ATP en células en proliferación hasta el de células de crecimiento en estado quiescente (Figura 4ai). Este resultado refleja los efectos selectivos del GSAO sobre la viabilidad de células en proliferación (Figura 4ai). Para confirmar que el ATP celular disminuido se

debía a un efecto del GSAO sobre la síntesis de ATP mitocondrial más que a la biogénesis mitocondrial, se midió la masa mitocondrial usando naranja de nonil acridina. El colorante se une a cardiolipina en la membrana mitocondrial (Petit *et al.*, 1992). La masa mitocondrial de células en proliferación era aproximadamente el doble que la de células de crecimiento en estado quiescente, que no cambiaba por tratamiento con GSAO (Figura 4a_{ii}).

A altas concentraciones, las especies de oxígeno reactivo tales como anión superóxido (O_2^-) pueden detener la proliferación celular e inducir la apoptosis. Para ensayar el efecto del GSAO sobre los niveles celulares de O_2 , se trataron células BAE durante 24 h con GSAO y se midieron los niveles celulares de O_2 y H_2O_2 usando los colorantes dihidroetidio y CM- H_2 -DCFDA, respectivamente. Los niveles celulares de O_2^- aumentaban linealmente con la concentración de GSAO en células BAE en proliferación pero no en las de crecimiento en estado quiescente (Figura 4b). Este efecto del GSAO no se debía a la inhibición de la actividad de la SOD ya que solo había una pequeña disminución en los niveles de H_2O_2 (Figura 4c). Por ejemplo, el tratamiento con GSAO 120 μM durante 24 h dio como resultado una disminución de 30% en H_2O_2 pero un aumento de 100% en el nivel de O_2^- . Este descubrimiento se confirmó usando un análisis citométrico de flujo de dos canales de los niveles celulares de O_2^- y H_2O_2 . Los niveles de O_2^- se aumentaron en la mayoría de las células sin una disminución correspondiente en el H_2O_2 (no se muestran los datos). Por el contrario, el GSAA no tenía efecto sobre los niveles de O_2^- o H_2O_2 . El aumento lineal en los niveles de O_2^- con tratamiento con GSAO concuerda con una alteración de la integridad mitocondrial.

Ejemplo 5

El GSAO desencadena la liberación de Citocromo C desde la mitocondria

Métodos

Se suspendieron mitocondrias de hígado de rata a 1 mg de proteína por ml a 25°C en tampón HEPES 3 mM, pH 7,0 que contenía manitol 75 mM, sacarosa 250 mM, succinato de sodio 10 mM y rotenona 2 μM y se trataron con los compuestos de unión a ANT durante de 0 a 60 min. Las concentraciones de reactivo se indican en las leyendas de las figuras. Las mitocondrias en 0,25 ml de reacción se sedimentaron por centrifugación a 8000 g durante 5 min y los sobrenadantes se concentraron 10 veces por ultrafiltración a través de una membrana Microcon YM-3 (Millipore, Bedford, MA). Los sobrenadantes concentrados se resolvieron en iGels de gradiente de 8-16% de Gradipore (Sydney, Australia) en condiciones no reductoras y se transfirieron a una membrana de PVDF. Las proteínas se detectaron mediante transferencia de Western usando anticuerpos policlonales anti- citocromo c humano (Producto 556433, BD Pharmingen) y anticuerpos anti-conejo conjugados con peroxidasa (Dako, Carpinteria, California). Se analizaron películas de quimioluminiscencia usando un densitómetro de formación de imágenes GS-700 y el programa informático Multi-Analyst (Bio-Rad, Hercules, California).

Resultados

La incubación de mitocondrias aisladas con GSAO desencadenaba la liberación dependiente del tiempo de Citocromo C hacia el medio (Figura 5A). El ligando de ANT, la ciclosporina A, inhibía parcialmente esta liberación (Figura 5B).

Ejemplo 6

Efecto del GSAO y análogos relacionados sobre la inducción de la transición de poro mitocondrial

Métodos

La exploración se realizó usando mitocondrias de hígado de rata congeladas durante 1 ó 2 días a -80°C después del aislamiento. El hinchamiento de las mitocondrias se midió por control de la disminución de la dispersión de luz a 520 nm usando un lector de microplacas.

En todos los experimentos se determinó el tiempo necesario para un hinchamiento semimáximo para cada compuesto. Después, se calcularon las velocidades de hinchamiento y se compararon con el GSAO. El aumento de la velocidad de hinchamiento en comparación con el GSAO se calculó de la forma siguiente:

$$\text{Factor de aumento de hinchamiento} = \frac{\text{Velocidad de hinchamiento}_{(\text{análogo de GSAO})}}{\text{Velocidad de hinchamiento}_{(\text{GSAO})}}$$

Los resultados se resumen en la Tabla 1 y se presentan en la Figura 6.

TABLA 1

Efecto del GSAO y análogos relacionados sobre la inducción de MPTP

Compuesto	Aumento de la velocidad de hinchamiento por MPTP/GSAO*	
	Media	DT
GSAO	1	0
1	16,3	7,2
3	2,4	0,5
4	5,6	1,5
6	4,5	0,8
7	2,2	0,6
8	2,1	0,4
22	6,9	1,1
23	5,4	0,7
10	2,0	0,2
11	1,3	0,4
13	1,6	0,7
14	1,1	0,4
15	1,3	-
21	2,8	0,7

Todos los compuestos se ensayaron al menos 2 veces en preparaciones mitocondriales diferentes para determinar sus propiedades de inducción de MPTP, excepto el compuesto 15 que se ensayó solamente una vez.

Resultados

Todos los compuestos mostraban una actividad de inducción similar o mejor que el GSAO. Los compuestos más activos eran el 1, 4, 22 y 23, que mostraban una actividad aumentada respecto al GSAO que variaba de 5,4 a 16,3 veces (Tabla 1; Figura 6). Para la inducción de MPTP, como para la actividad antiproliferativa sobre células BAE, los compuestos de orto-arsenóxido (1, 4, 22 y 23) tenían una actividad aumentada respecto a los compuestos de para-arsenóxido correspondientes (GSAO, 3, 7 y 8, respectivamente).

Se presenta una comparación de la inducción de MPTP frente al peso molecular de los compuestos en la Figura 7.

Se presenta una comparación de la inducción de MPTP frente al Log P del compuesto ensayado en la Figura 8.

La actividad antiproliferativa del GSAO y análogos relacionados se comparó con la capacidad de esos compuestos para inducir la MPT. Los resultados se presentan en la Figura 9. Los compuestos que mostraban una actividad aumentada respecto al GSAO en ambos ensayos eran los compuestos de orto-arsenóxido 1, 4, 22 y 23.

Ejemplo 8

*Comparación de GSAO y o-GSAO - Ensayo de Hinchamiento Mitocondrial*5 *Método*

Se aislaron mitocondrias a partir de los hígados de ratas Wistar macho de ~250 g usando centrifugación diferencial como se ha descrito anteriormente (Don *et al.*, 2003). El sedimento mitocondrial final se resuspendió en tampón HEPES-KOH 3 mM, pH 7,0 que contenía manitol 213 mM, sacarosa 71 mM y succinato de sodio 10 mM a una
 10 concentración de 30 mg de proteína por ml. Se evaluó la inducción de transición de permeabilidad mitocondrial espectrofotométricamente por suspensión de las mitocondrias de hígado a 0,5 mg de proteína por ml a 25°C en tampón HEPES-KOH 3 mM pH 7,0 que contenía manitol 75 mM, sacarosa 250 mM, succinato de sodio 10 mM y rotenona 2 mM. El hinchamiento se midió por control de la disminución asociada de la dispersión de luz a 520 nm usando un lector de microplacas.

15

Resultados

El semi-tiempo para el hinchamiento máximo de mitocondrias aisladas era 3-5 veces más rápido para una concen-
 20 tración dada de o-GSAO en comparación con GSAO (Figura 10). De hecho, el o-GSAO era casi tan eficaz como el PAO lipófilo en la inducción de la transición de permeabilidad mitocondrial (Figura 17D).

La formación de poros por el ANT está controlada por la unión de Ca^{2+} , ciclofilina D y nucleótidos de adenina en condiciones fisiológicas. El desencadenamiento primario para la apertura del poro de transición de permeabilidad
 25 mitocondrial es un aumento en la concentración de Ca^{2+} en la matriz. La quelación de Ca^{2+} con EGTA bloquea la apertura de poros, al igual que un exceso de otros iones de metales divalentes tales como Mg^{2+} . Tanto el EGTA como el Mg^{2+} bloquearon el hinchamiento dependiente de GSAO (Figura 11). La unión de ciclofilina D a ANT es necesaria para la apertura de poros a concentraciones de Ca^{2+} submilimolares. La ciclosporina A (CsA) bloquea la apertura de
 30 poros por unión a ciclofilina D y desplazamiento de la misma del ANT. Además, el ADP inhibe la apertura de poros por unión a ANT y disminución de la sensibilidad del sitio de desencadenamiento a Ca^{2+} . El CsA y el ADP bloqueaban el efecto del o-GSAO sobre la apertura de poros (Figura 12).

Bibliografía

35

Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S. Bosse, D. C., y Lawley, T. J. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683-890, 1992.

40

Carmeliet, P. y Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257, 2000.

Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-249, 1999.

45

Crompton, M.; Costi, A. y Hayat, L Evidence for the presence of a reversible Ca^{2+} -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* 248, 915-918, 1987.

Crompton, M., Ellinger, H. y Costi, A. inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255, 357-360, 1988.

50

Donoghue, N., Yam, P. T. W., Jiang, X., y Hogg, P. J. Presence of closely spaced protein thiols on the surface of mammalian cells. *Protein Sci.* 9, 2438-2445, 2000. Folkman, J. Angiogenesis and its inhibitors. En *Important Advances in Oncology*, DeVita, V. T., Hellman, S., y Rosenbeig, S., eds. (J. B. Lippincott Company, PD) págs. 42-62, 1985.

55

Halestrap, A. P., McStay, G. P., Clarke, S. J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-66, 2002.

60

Halestrap, A. P., Woodfield, K. Y. y Connem, C. P. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* 272, 3346-3354, 1997.

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

65

Haworth, R. A. y Hunter, D. R. Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 91-96, 2000.

Haworth, R. A. y Hunter, D. R. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca^{2+} trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 460-467, 1979.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., y Folkman, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Med.* 1, 149-153, 1995.

Hunter, D. R., y Haworth, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 195, 453-459, 1979.

Majima, E., Yamaguchi, N., Chuman, H., Shinohara, Y., Ishida, M., Goto, S. y Terada, H. Binding of the fluorescein derivative eosin Y to the mitochondrial ADP/ATP carrier: characterization of the adenine nucleotide binding site. *Biochemistry* 37, 424-432, 1998.

Nguyen, M., Shing, Y., y Folkman, J. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvascular Res.* 47, 31-40, 1994.

Oliver, M. H., Harrison, N. K., Bishop, J. E., Cole, P. J., y Laurent, G. J. A rapid and convenient assay for counting cells cultured in microwell plates: application for assessment of growth factors. *J. Cell Sci.* 92, 513-518, 1989.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vaslos, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., y Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Cell* 88, 277-285, 1997.

Petit, J. M., Maftah, A., Ratinaud, M. H., y Julien, R. 10N-nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 209, 267-273, 1992.

Schnaitman, C. y Greenawalt, J. W. Enzymatic properties of the inner and outer membranes of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.* 38, 158-75, 1968.

Smiley, S. T., Reers, M., Mottola-Hartshom, C., Lin, M., Chen, A., Smith, T. W., Steele, G. D., y Chen, L. B. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3671-3675, 1991.

Vanden Hoek, T. L., Becker, L. B., Shao, Z., Li C., y Schumacker, P. T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 29, 18092-18098, 1998.

Zanetti, M., Zwacka, R. M., Engelhardt, J. F., Katusic, Z. S., y O'Brien, T. Superoxide anions and endothelial cell proliferation in normoglycemia and hyperglycemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 195-200, 2001.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso *in vitro* para identificar un compuesto que induzca selectivamente la transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) en células en proliferación, donde dicho proceso comprende poner en contacto una célula o extracto celular con un compuesto, determinar si el compuesto se une al translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y determinar si el compuesto induce selectivamente la MPT en células en proliferación.

2. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 para explorar una pluralidad de compuestos para identificar un compuesto que induzca selectivamente la MPT en células en proliferación, donde dicho proceso comprende poner en contacto una célula o un extracto celular con la pluralidad de compuestos, determinar si cualquiera de los compuestos se une a ANT y, si es así, determinar por separado para cada uno de la pluralidad de compuestos si el compuesto induce selectivamente la MPT en células en proliferación.

3. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que la selectividad por células en proliferación se determina por comparación del efecto de compuestos que se ha identificado que se unen a ANT sobre la MPT en células en proliferación con el efecto sobre la MPT en células que no están en proliferación o de crecimiento en estado quiescente.

4. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha determinación de la inducción de la MPT implica medir cambios en la liberación de Citocromo C.

5. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha determinación de la inducción de la MPT implica medir cambios en la concentración celular de superóxido.

6. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que el compuesto es un compuesto reactivo de ditiol.

7. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el compuesto tiene un resto arsenóxido (o equivalente de arsenóxido).

8. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el compuesto es de la fórmula (I):



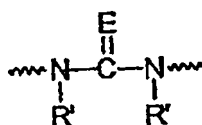
en la que

A comprende al menos un grupo colgante;

(XBX')_nB' comprende un grupo enlazador adecuado, donde X se selecciona entre el grupo que consiste en -NR-, -S(O)-, -S(O)O-, -S(O)₂-, -S(O)₂O-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O-, -C(S)S-, -P(O)(R₁)- y -P(O)(R₁)O-, o está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₁₀, alquenileno C₂-C₁₀, alquinileno C₂-C₁₀, cicloalquileno C₃-C₁₀, cicloalquenileno C₃-C₁₀, heterocicloalquileno C₃-C₁₀, heterocicloalquenileno C₃-C₁₀, arileno C₆-C₁₂, heteroarileno y acilo C₂-C₁₀;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -NR-, -O-, -S-, -Se-, -S-S-, S(O)-, -OS(O)-, OS(O)O-, OS(O)₂-, OS(O)₂O-, -S(O)O-, -S(O)₂-, -S(O)₂O-, -OP(O)(R₁)-, -OP(O)(R₁)O-, -OP(O)(R₁)OP(O)(R₁)O-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O-, -C(S)S-, -P(O)(R₁)-, -P(O)(R₁)O-, y



o está ausente; donde E es O, S, Se, NR o N(R)₂⁺;

B' se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₁₀, alquenileno C₂-C₁₀, alquinileno C₂-C₁₀, cicloalquileno C₃-C₁₀, cicloalquenileno C₃-C₁₀, heterocicloalquileno C₃-C₁₀, heterocicloalquenileno C₃-C₁₀, arileno C₆-C₁₂ y heteroarileno o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₀, alquenilo C₂-C₁₀, alquino C₂-C₁₀, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₃-C₁₀, heterocicloalquilo C₃-C₁₀, heterocicloalquenilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, heteroarilo, OR₂ y acilo C₂-C₁₀;

R' es igual que R o dos R¹ pueden tomarse junto con los átomos de nitrógeno a los que están unidos para formar un anillo heterocíclico saturado o insaturado de 5 ó 6 miembros;

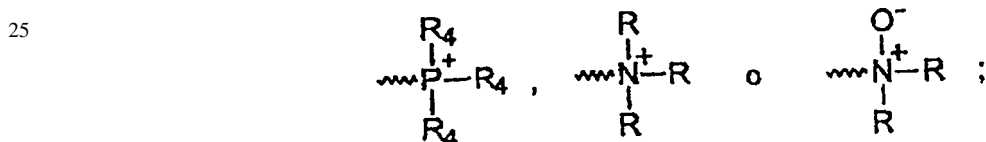
cada R_1 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, halo, OR_2 y $N(R)_2$;

5 cada R_2 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo y $-C(O)R_5$;

10 cada R_5 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alcoxi C_1-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_5-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_3-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_5-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , heteroariloxi, alquiltio C_1-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_5-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_5-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio, OH, SH y $N(R)_2$;

15 donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en una relación para-, meta- u orto-; y

20 donde cada alquilenilo, alquilenilo, alquilenilo, -cicloalquilenilo, cicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, heterocicloalquilenilo, arileno, heteroarileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a} , SR_6 , nitro, arsenóxido, $-S(O)R_3$, $-OS(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-OS(O)_2R_3$, $-P(O)R_4R_4$, $-OP(O)R_4R_4$, $-N(R'')_2$, $-NRC(O)(CH_2)_mQ$, $-C(O)R_5$;



30 donde

R , R_1 y R_5 son como se han definido anteriormente; y

35 R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_5 , alquenilo C_2-C_5 , alquinilo C_2-C_5 , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$, $-P(O)(R_4)_2$, $N(R)_2$ y $-C(O)R_5$;

40 cada R_3 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alcoxi C_1-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_5-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_3-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_5-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , heteroariloxi, alquiltio C_1-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_5-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_5-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio y $N(R)_2$;

45 cada R_4 se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alcoxi C_1-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , alquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_3-C_{10} , cicloalquinoxilo C_5-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_3-C_{10} , heterocicloalquinoxilo C_5-C_{10} , ariloxi C_6-C_{12} , heteroariloxi, alquiltio C_1-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_5-C_{10} , heterocicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_5-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio, halo y $N(R)_2$;

50 R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C_1-C_{10} , alquenilo C_2-C_{10} , alquinilo C_2-C_{10} , cicloalquilo C_3-C_{10} , cicloalquenilo C_5-C_{10} , heterocicloalquilo C_3-C_{10} , heterocicloalquenilo C_5-C_{10} , arilo C_6-C_{12} , heteroarilo, alquiltio C_1-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , alquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_3-C_{10} , cicloalquiltio C_5-C_{10} , tetracicloalquiltio C_3-C_{10} , heterocicloalquiltio C_5-C_{10} , ariltio C_6-C_{12} , heteroariltio, $-S(O)R_3$, $-S(O)_2R_3$ y $-C(O)R_5$;

R'' es igual que R o dos R'' tomados junto con el átomo de N al que están unidos pueden formar un sistema de anillo heterocíclico saturado, insaturado o aromático;

60 Q se selecciona entre halógeno y $-OS(O)_2Q_1$; donde Q_1 se selecciona entre alquilo C_1-C_4 , perfluoroalquilo C_1-C_4 , fenilo, p-metilfenilo; y

m es de 1 a 5,

n es un número entero de 0 a 20

65 Y comprende al menos un arsenóxido o equivalente de arsenóxido;

p es un número entero de 1 a 10, y donde el compuesto de fórmula (I) tiene más de 6 átomos de carbono.

9. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 8, en el que A se selecciona entre

el grupo que consiste en aminoácidos naturales, no naturales y sintéticos, aminas hidrófilas, péptidos, polipéptidos, restos de azúcar, oligosacáridos, y proteínas que contienen tiol, restos de ácidos pequeños, restos que contienen hidroxilo, o una combinación de los mismos.

10. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha amina hidrófila se selecciona entre alquilaminas primarias, arilaminas primarias, aralquilaminas primarias, alquilaminas secundarias, arilaminas secundarias, aralquilaminas secundarias, terciarias alquilaminas, arilaminas terciarias y aralquilaminas terciarias y aminas heterocíclicas.

11. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9 ó 10, en el que A se selecciona entre el grupo que consiste en dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos, pentapéptidos, glutatión, glucosamina, sacáridos, disacáridos, oligosacáridos, donde el átomo de azufre de cada resto que contiene azufre puede estar opcionalmente oxidado para formar un sulfóxido o sulfona.

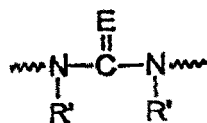
12. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 11, en el que A se selecciona entre un péptido que comprende uno o más de cisteinilglicina, ácido cisteico, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y arginina; glucosa, fructosa, manosa, xilosa, lixosa, galactosa, hexosa, sacarosa, sorbosa, galactosil-sacarosa, sorbitol, manitol y xilitol.

13. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que

X se selecciona entre el grupo que consiste en -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O- y -C(S)S-, o está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenos C₁-C₅, alquenilenos C₂-C₅, alquinilenos C₂-C₅, cicloalquilenos C₃-C₁₀, cicloalquenilenos C₅-C₁₀, arilenos C₆-C₁₂ y a;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -O-, -S-, -NR-, -S-S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -P(O)(R₁)-, -OP(O)(R₁)-, OP(O)(R₁)O-, -OP(O)(R₁)OP(O)(R₁)O-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O-, -C(S)S-,



, o está ausente; donde E es O, S o N(R)₂⁺;

n es 0, 1 ó 2; y

B' se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenos C₁-C₅, alquenilenos C₂-C₅, alquinilenos C₂-C₅, cicloalquilenos C₃-C₁₀, cicloalquenilenos C₅-C₁₀ y arilenos C₆-C₁₂, o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, OR₂ y acilo C₂-C₁₀;

R' es el mismo que R;

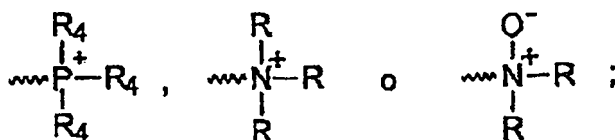
cada R₁ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, OR₂ y N(R)₂;

cada R₂ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂ y -C(O)R₅;

cada R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alquenoiloxi C₃-C₅, alquinoiloxi C₃-C₅, cicloalquiloiloxi C₁-C₁₀, cicloalquenoiloxi C₅-C₁₀, ariloiloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alquenoiltio C₃-C₅, alquinoiltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalquenoiltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, OH, SH y N(R)₂;

donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en una relación para-, meta- u orto-, y

donde cada alquilenos, alquenilenos, alquinilenos, cicloalquilenos, cicloalquenilenos, arilenos y acilos pueden estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alqueno C₂-C₅, alquino C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalqueno C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, ciano, halo, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -OS(O)R₃, -S(O)₂R₃, -OS(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -OP(O)R₄R₄, -N(R'')₂, NRC(O)(CH₂)_mQ, -C(O)R₅,



donde

R, R₁ y R₅ son como se han definido anteriormente; y

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂, N(R)₂ y -C(O)R₅;

cada R₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alqueniloxi C₃-C₅, alquiniloxi C₃-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂ y N(R)₂;

cada R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alqueniloxi C₃-C₅, alquiniloxi C₃-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₅, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, halo y N(R)₂;

R₆ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃ y -C(O)R₅,

R'' es el mismo que R;

Q se selecciona entre el grupo que consiste en halógeno y -OS(O)₂Q₁; donde Q₁ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, perfluoroalquilo C₁-C₄, fenilo, *p*-metilfenilo;

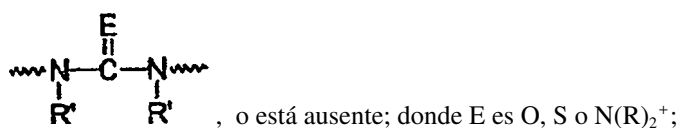
m es de 1 a 5.

14. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 en el que

X está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₅, arilenilo C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -O-, -S-, -NR-, -S-S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -P(O)(R₁)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(O)O-, C(S)O-, -Se- y



n es 0, 1 ó 2; y

B' es alquilenilo C₁-C₅, arilenilo C₆-C₁₂ o está ausente; y donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, OR₂ y acilo C₂-C₅;

R' es el mismo que R;

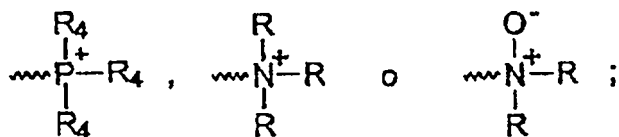
cada R₁ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, OR₂ y N(R)₂;

cada R₂ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂ y -C(O)R₅;

cada R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, alqueniloxi C₃-C₅, alquiniloxi C₃-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, cicloalqueniloxi C₅-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, alqueniltio C₃-C₅, alquiniltio C₃-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, cicloalqueniltio C₅-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, OH, SH y N(R)₂;

donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en una relación para-, meta- u orto-, y

donde cada alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, cicloalquilenilo, cicloalquenilenilo, arileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -OS(O)R₃, -S(O)₂R₃, -OS(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -OP(O)R₄R₄, -N(R'')₂, -NRC(O)(CH₂)_mQ₁, -C(O)R₅,



donde

R, R₁ y R₅ son como se han definido anteriormente; y

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₃, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂ y -C(O)R₅;

cada R₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂ y N(R)₂;

cada R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₃, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, cicloalquiloxi C₃-C₁₀, ariloxi C₆-C₁₂, halo y N(R)₂;

R₆ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, cicloalquiltio C₃-C₁₀, ariltio C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃ y -C(O)R₅,

R'' es el mismo que R;

Q se selecciona entre halógeno y -OS(O)₂Q₁; donde Q₁ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, perfluoroalquilo C₁-C₄, fenilo, *p*-metilfenilo;

m es de 1 a 5.

15. Un proceso *in vitro* de acuerdo con las reivindicaciones 8 a 14 en el que

X está ausente;

B se selecciona entre el grupo que consiste en alquilenilo C₁-C₅, arileno C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

X' se selecciona entre el grupo que consiste en -O-, -S-, -NR-, -C(O)- y -C(O)O-, o está ausente;

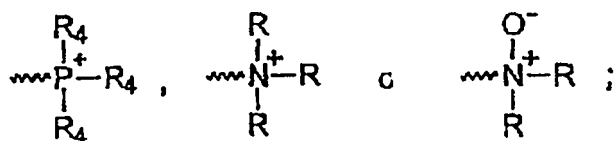
n es 1; y

B' es alquilenilo C₁-C₅, arileno C₆-C₁₂ o está ausente; y

R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

donde para cada caso en el que B y/o B' es arileno, los sustituyentes unidos directamente a los anillos de arileno respectivos (incluyendo arsenóxido o equivalente de arsenóxido) pueden estar en una relación para-, meta- u orto-, y

donde cada alquilenilo, arileno y acilo puede estar sustituido independientemente con hidrógeno, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alquinilo C₂-C₅, cicloalquilo C₃-C₁₀, cicloalquenilo C₅-C₁₀, arilo C₆-C₁₂, halo, ciano, cianato, isocianato, OR_{2a}, SR₆, nitro, arsenóxido, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)R₄R₄, -N(R'')₂, -NRC(O)(CH₂)_mQ, -C(O)R₅,



donde

cada R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂ y acilo C₂-C₅;

R_{2a} se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃, -P(O)(R₄)₂ y -C(O)R₅;

cada R₃ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, y ariltio C₆-C₁₂;

cada R₄ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, ariltio C₆-C₁₂, halo y N(R)₂;

cada R₅ se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, ariltio C₆-C₁₂, OH, SH y N(R)₂;

R₆ se selecciona entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alquiltio C₁-C₅, ariltio C₆-C₁₂, -S(O)R₃, -S(O)₂R₃ y -C(O)R₅,

R'' es el mismo que el R anterior;

Q se selecciona entre halógeno y -OS(O)₂Q₁; donde Q₁ se selecciona entre alquilo C₁-C₄, perfluoroalquilo C₁-C₄, fenilo, *p*-metilfenilo; y

m es 2, 3, 4 ó 5.

16. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 15, en el que

X está ausente

B es acilo C₂-C₅;

X' es NR;

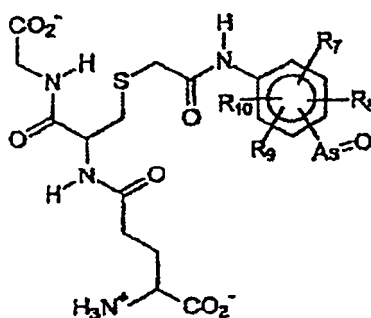
n es 1;

B' es fenileno; y

R es H;

donde los sustituyentes unidos directamente al anillo de fenileno pueden estar en una relación para-, meta u orto-.

17. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 16 en el que dicho compuesto es:

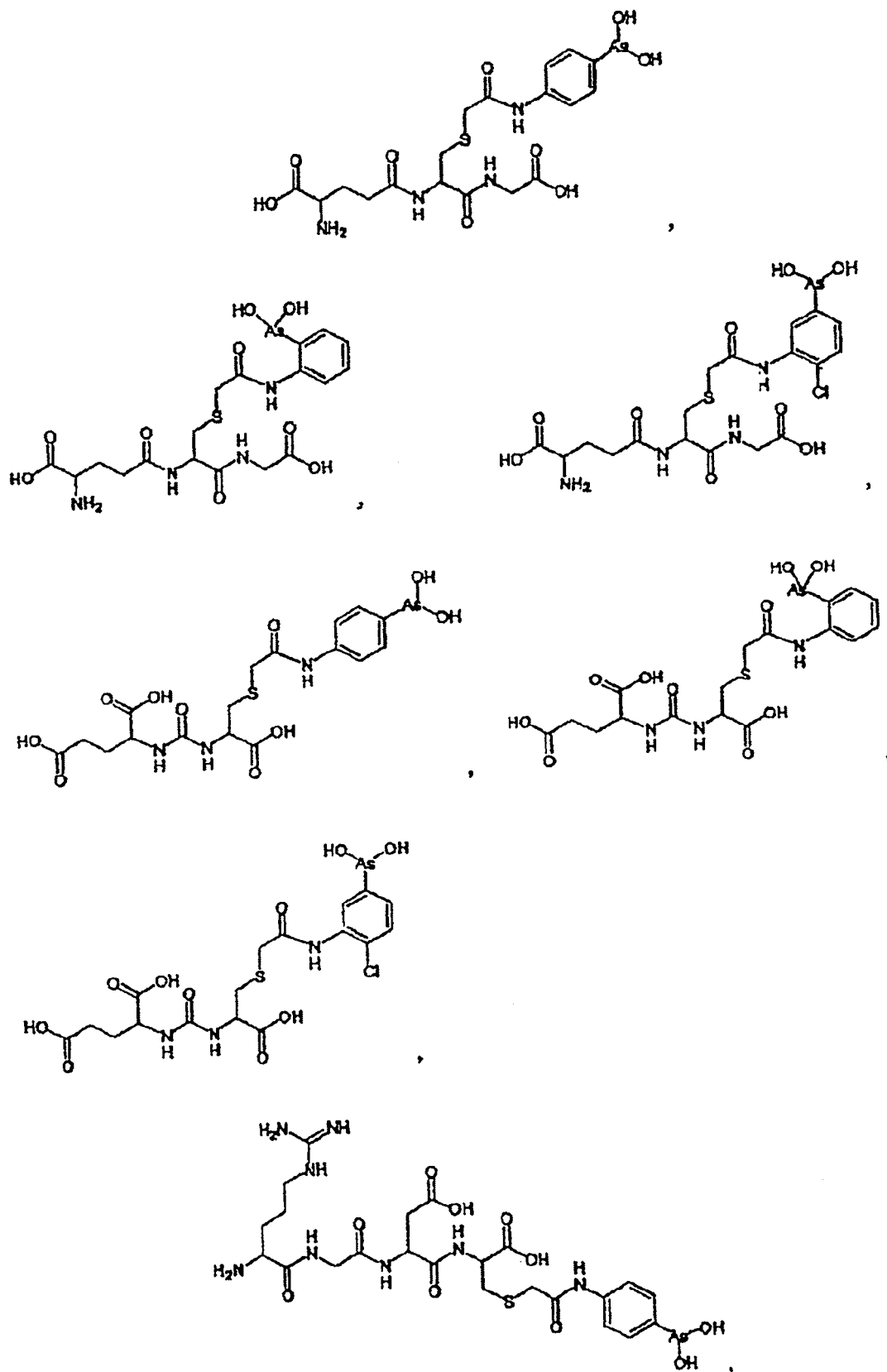


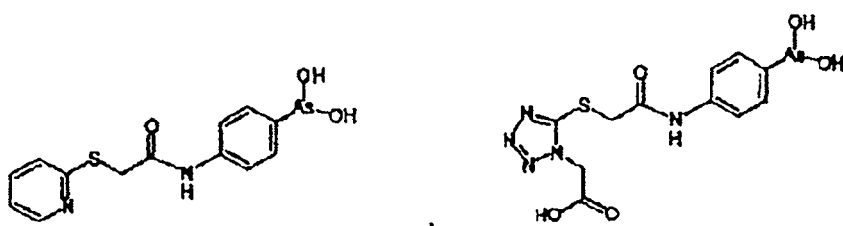
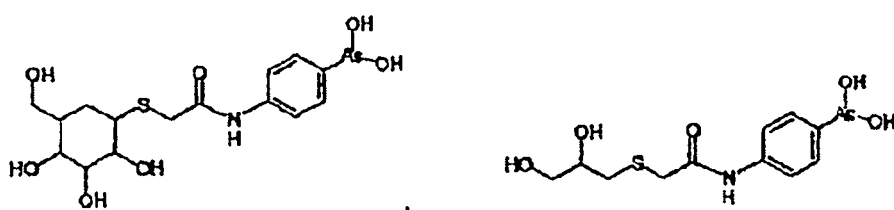
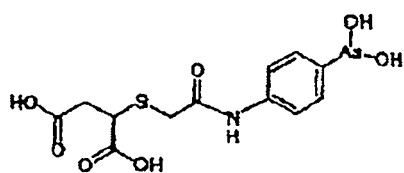
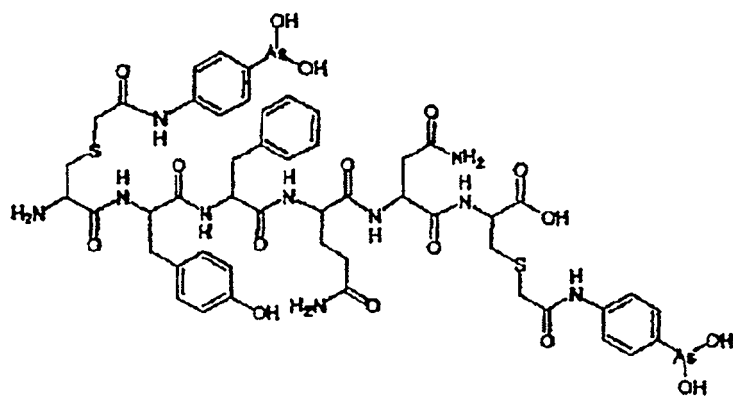
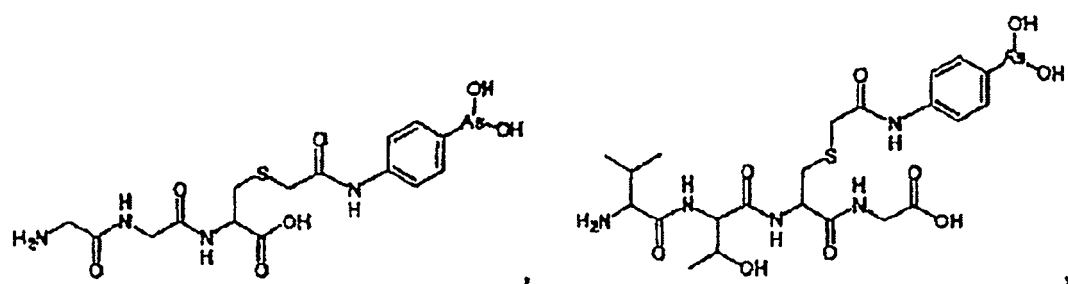
donde R₇ a R₁₀ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, -OS(O)₂R₃ y -NHC(O)CH₂Q donde Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ y -OS(O)₂-*p*-tolilo; y donde, cuando uno cualquiera de R₇ a R₁₀ es alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅, -OS(O)₂R₃, es capaz de formar un anillo condensado con el fenileno; y donde, además, al menos uno de R₇ a R₁₀ es alquilo C₁-C₅, arilo C₆-C₁₂, alcoxi C₁-C₅ o -OS(O)₂R₃, junto con al menos otro cualquiera de R₇ a R₁₀, es capaz de formar un anillo condensado con el fenileno.

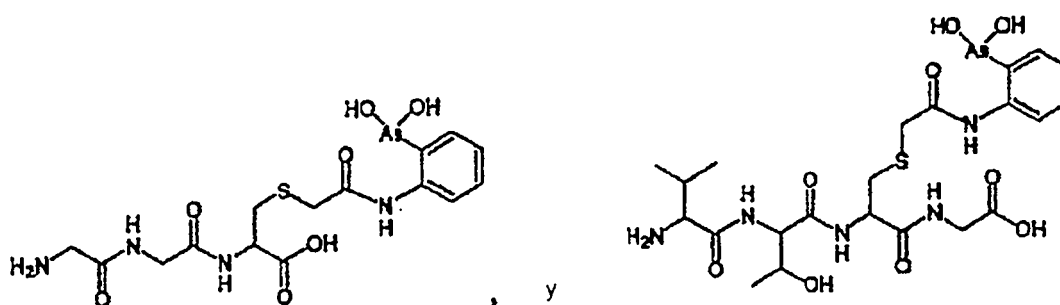
18. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 17 en el que R₇ a R₁₀ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, ciano, carboxi, alcoxi C₁-C₅, metilo, etilo, isopropilo, terc-butilo, fenilo y -NHC(O)CH₂Q donde Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ y -OS(O)₂-*p*-tolilo.

19. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 16 ó 17 en el que el grupo arsenóxido (-As=O) está en la posición 4 del anillo de fenileno.

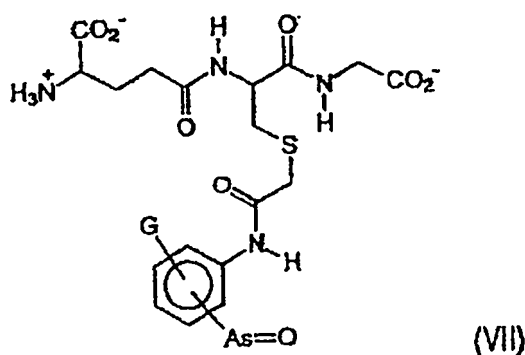
20. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en el que el compuesto se selecciona entre el grupo que consiste en:







21. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 en el que el compuesto se representa por la Fórmula VII:



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

22. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 21 en el que G se selecciona entre hidrógeno, halógeno, hidroxilo, amino, nitro, carboxi, alcoxi C₁-C₅, metilo, etilo, iso-propilo, terc-butilo, fenilo y -NHC(O)CH₂Q donde Q es halógeno, -OS(O)₂CH₃, -OS(O)₂C₆H₅ o -OS(O)₂-*p*-tolilo.

23. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 21 ó 22, en el que G se selecciona entre hidroxilo, flúor, amino y nitro.

24. Un proceso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en el que el grupo arsenóxido (-As=O) se reemplaza por un equivalente de arsenóxido como se define en la presente memoria.

25. Un proceso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 24, en el que el equivalente de arsenóxido es cualquier especie reactiva de ditio que muestra esencialmente la misma afinidad para ditioles que para -As=O.

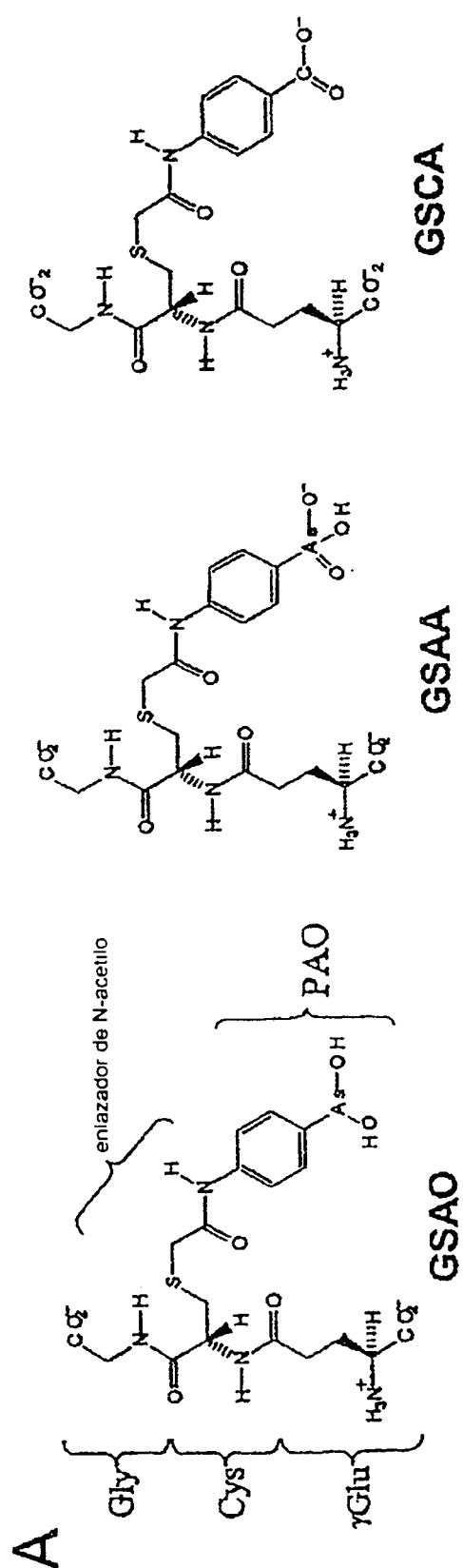


FIGURA 1A

B

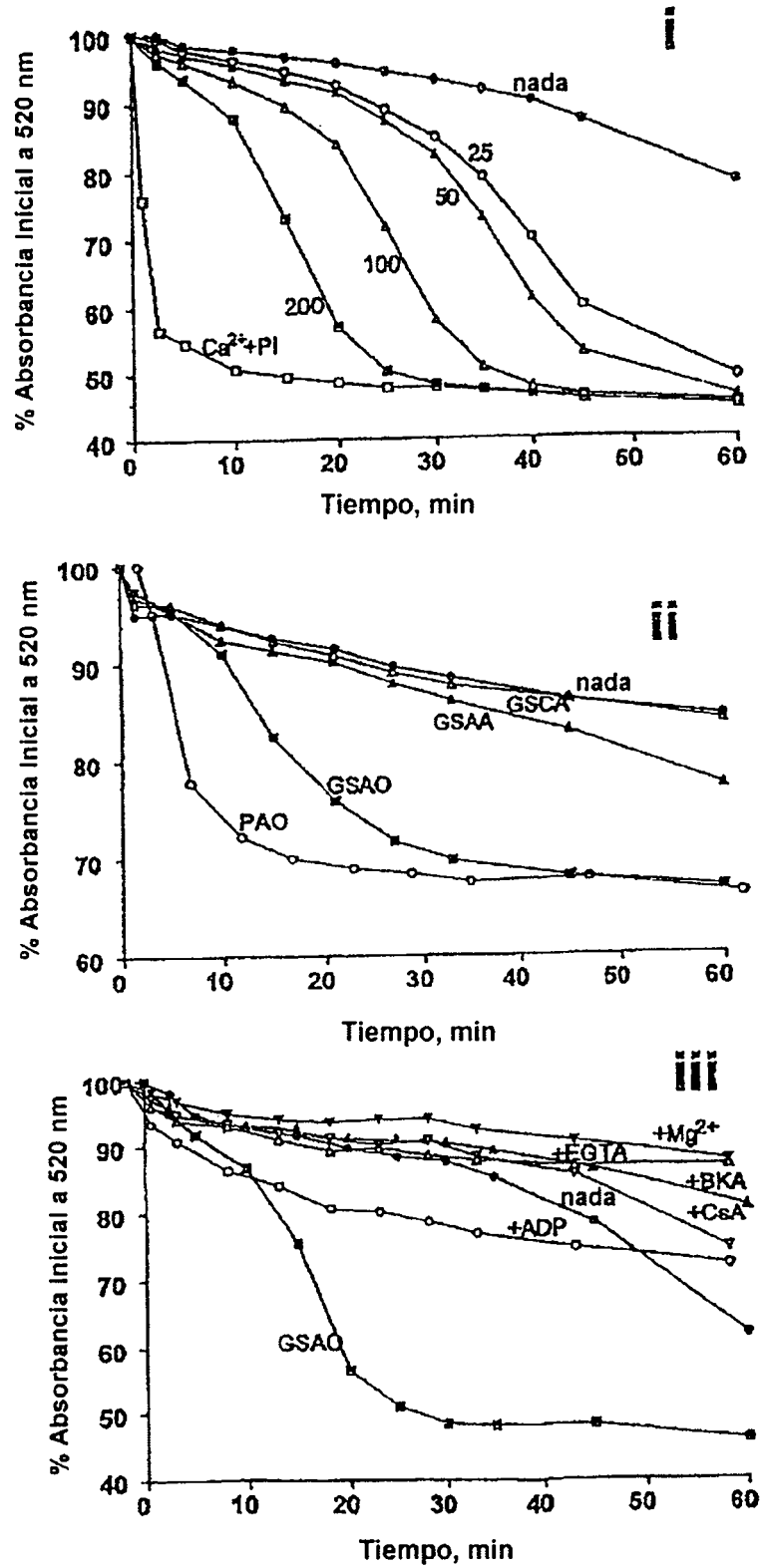
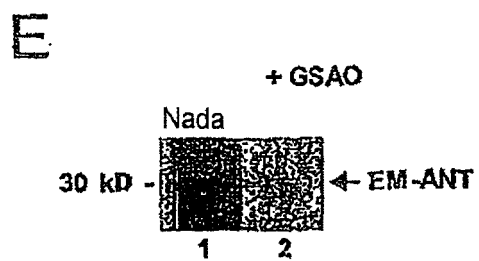
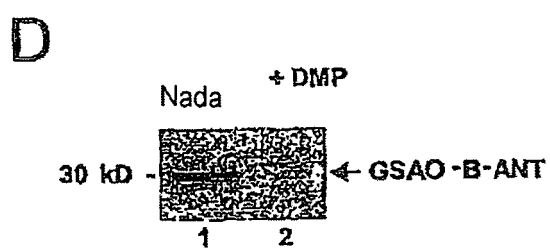
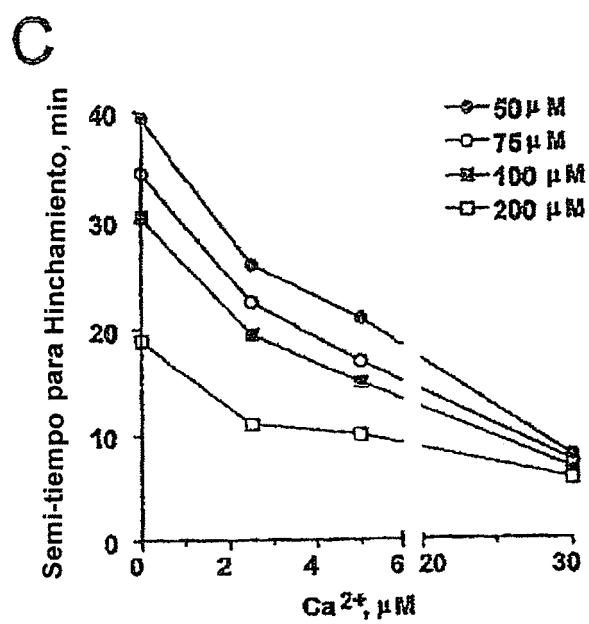


FIGURA 1B



FIGURAS 1C, 1D y 1E

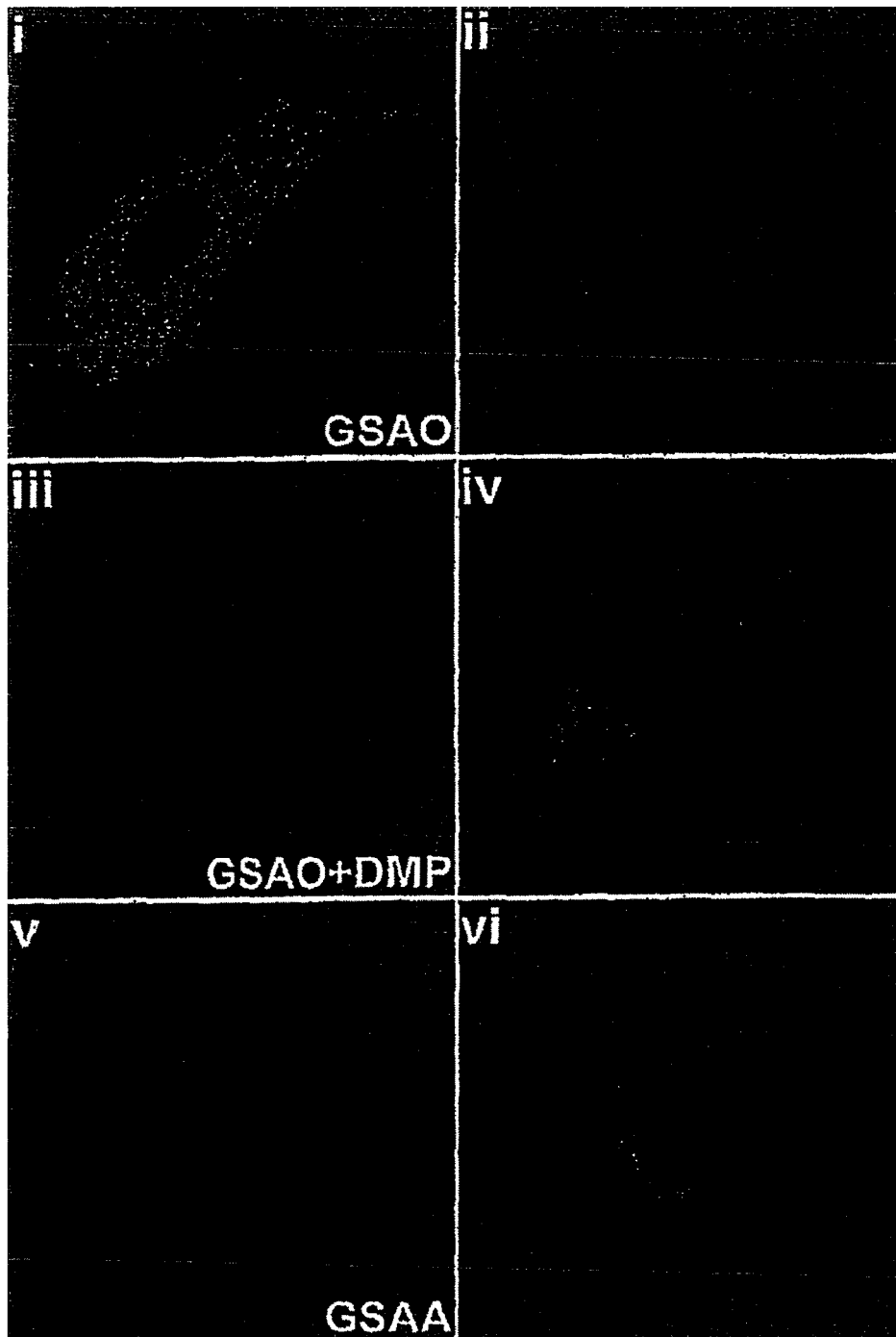
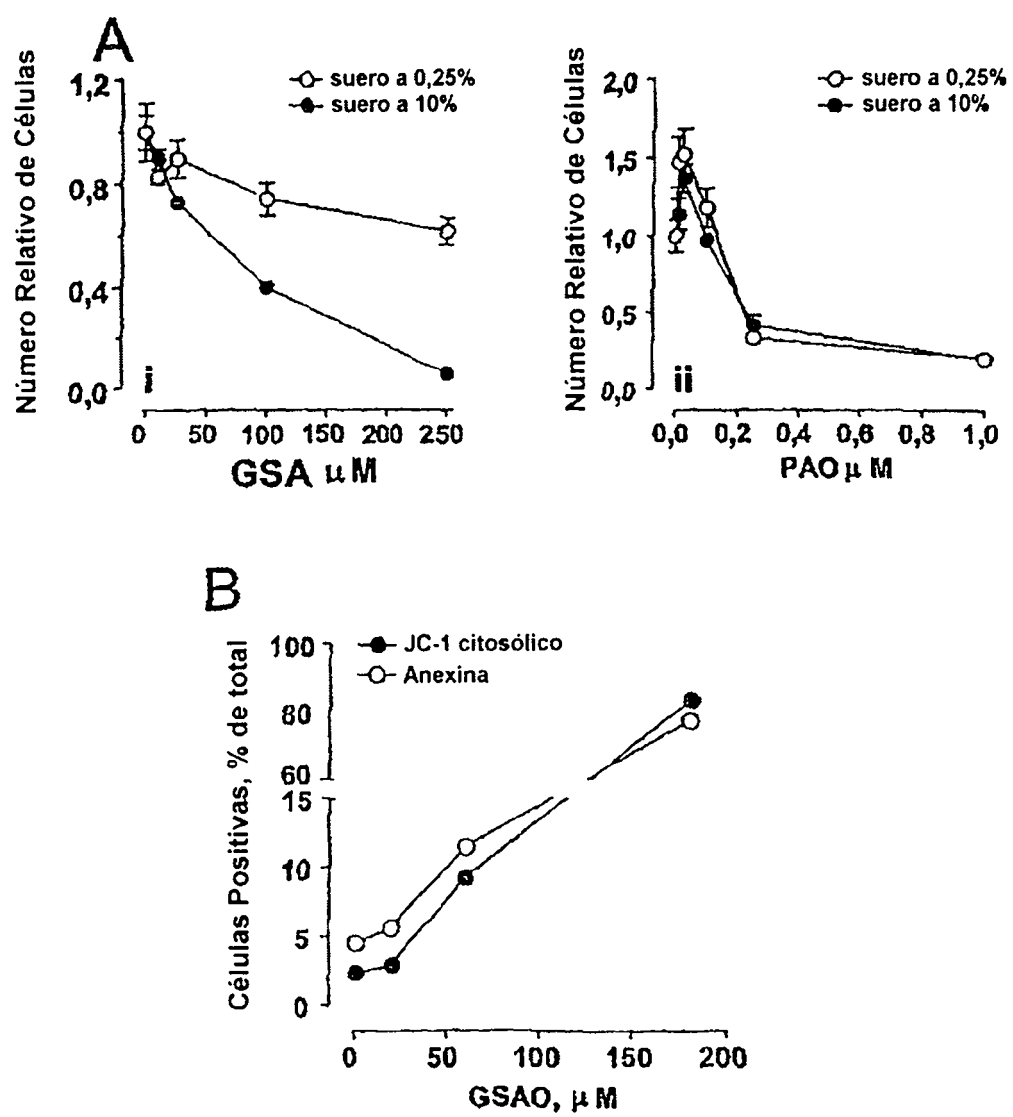
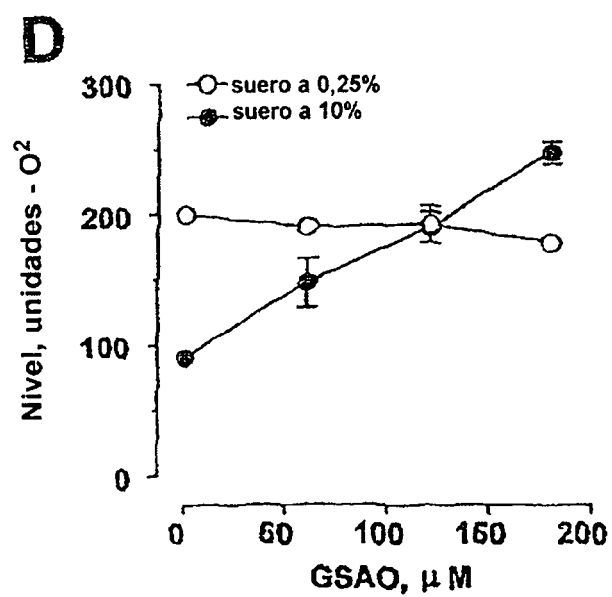
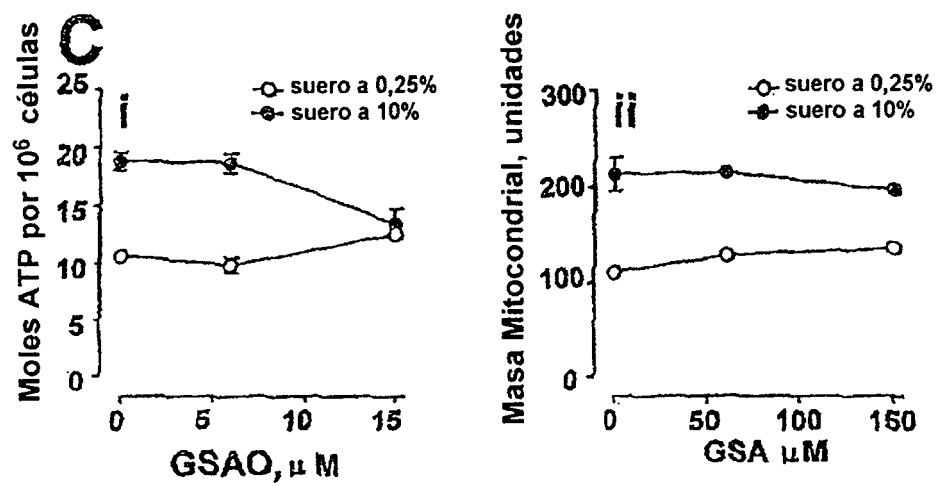


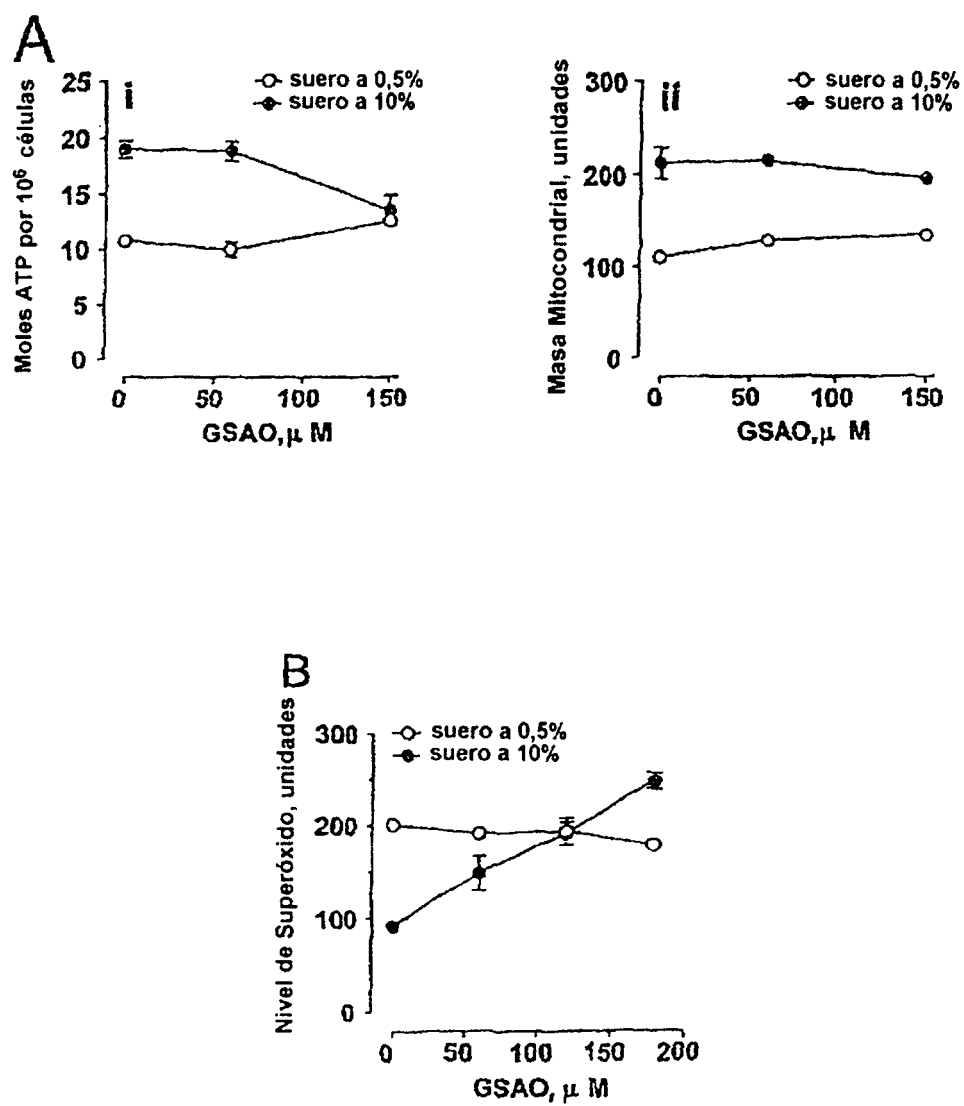
FIGURA 2



FIGURAS 3A y 3B



FIGURAS 3C y 3D



FIGURAS 4A y 4B

C

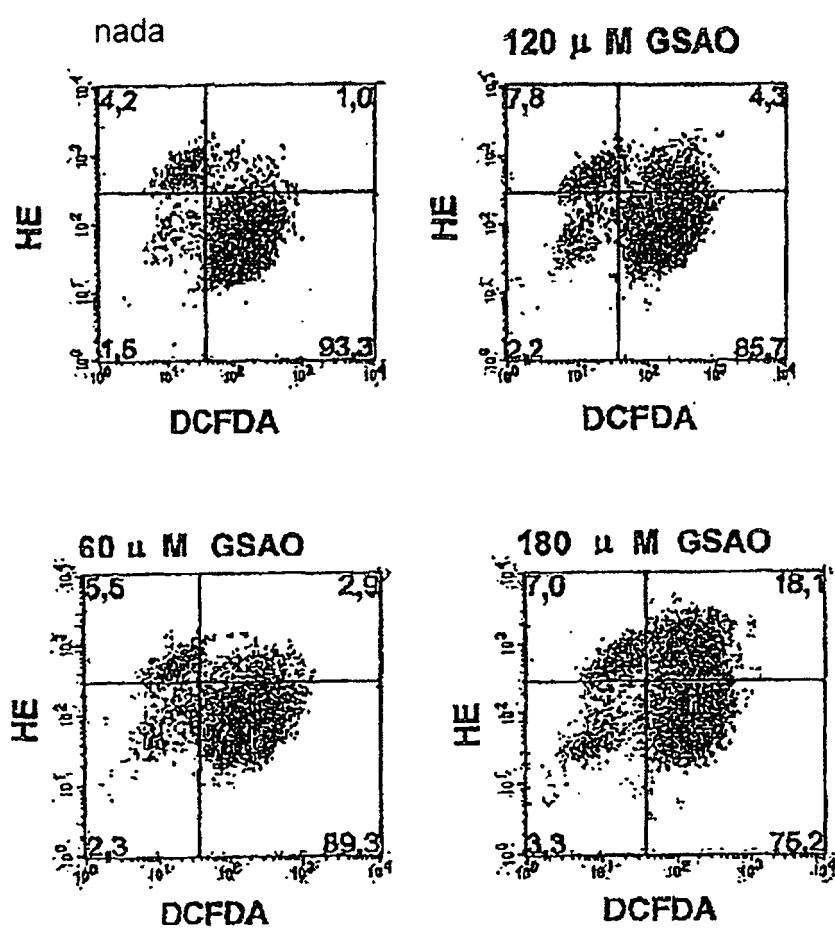


FIGURA 4C

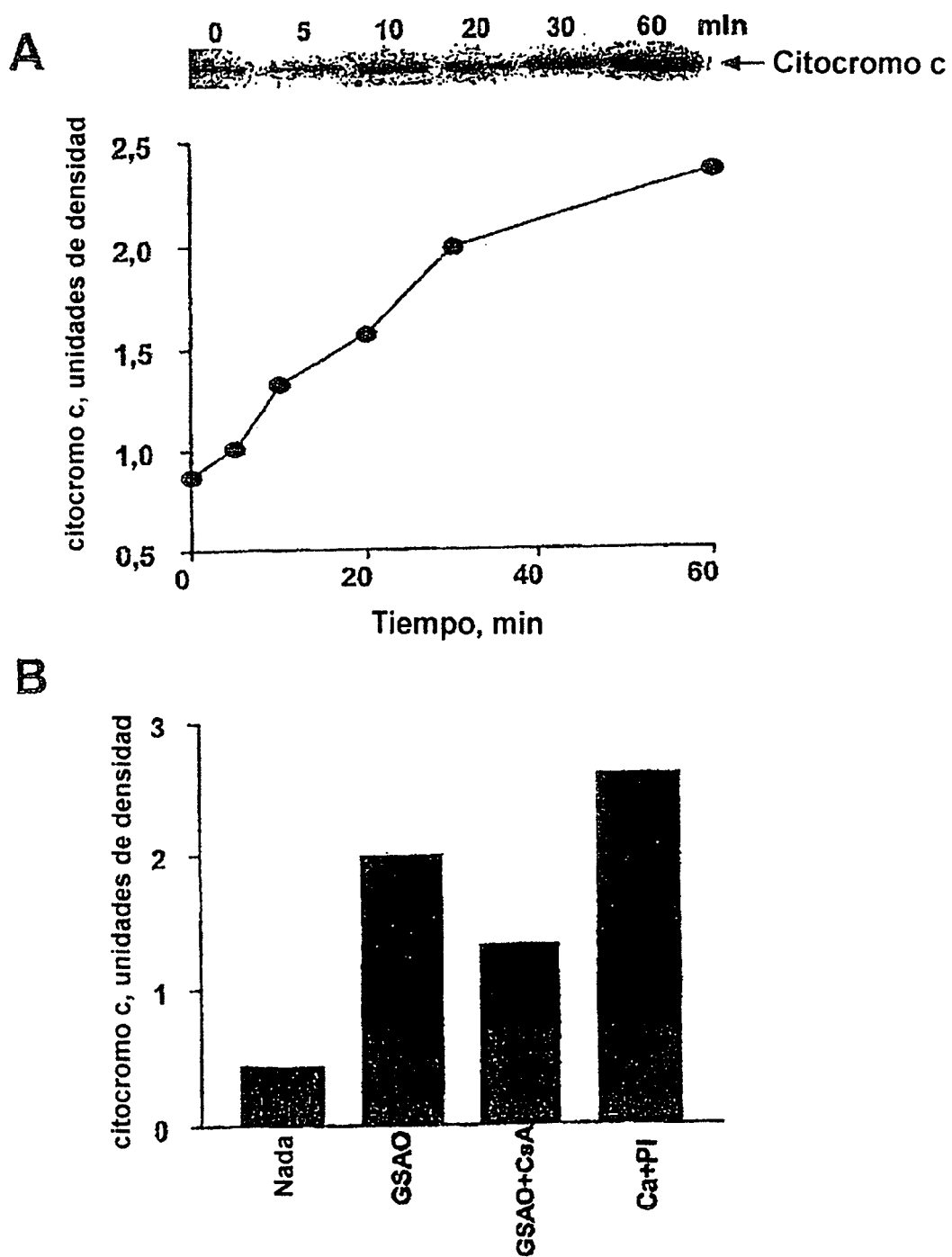


FIGURA 5

Inducción de Hinchamiento de Mitocondria de Hígado de Rata por derivados de GSAO

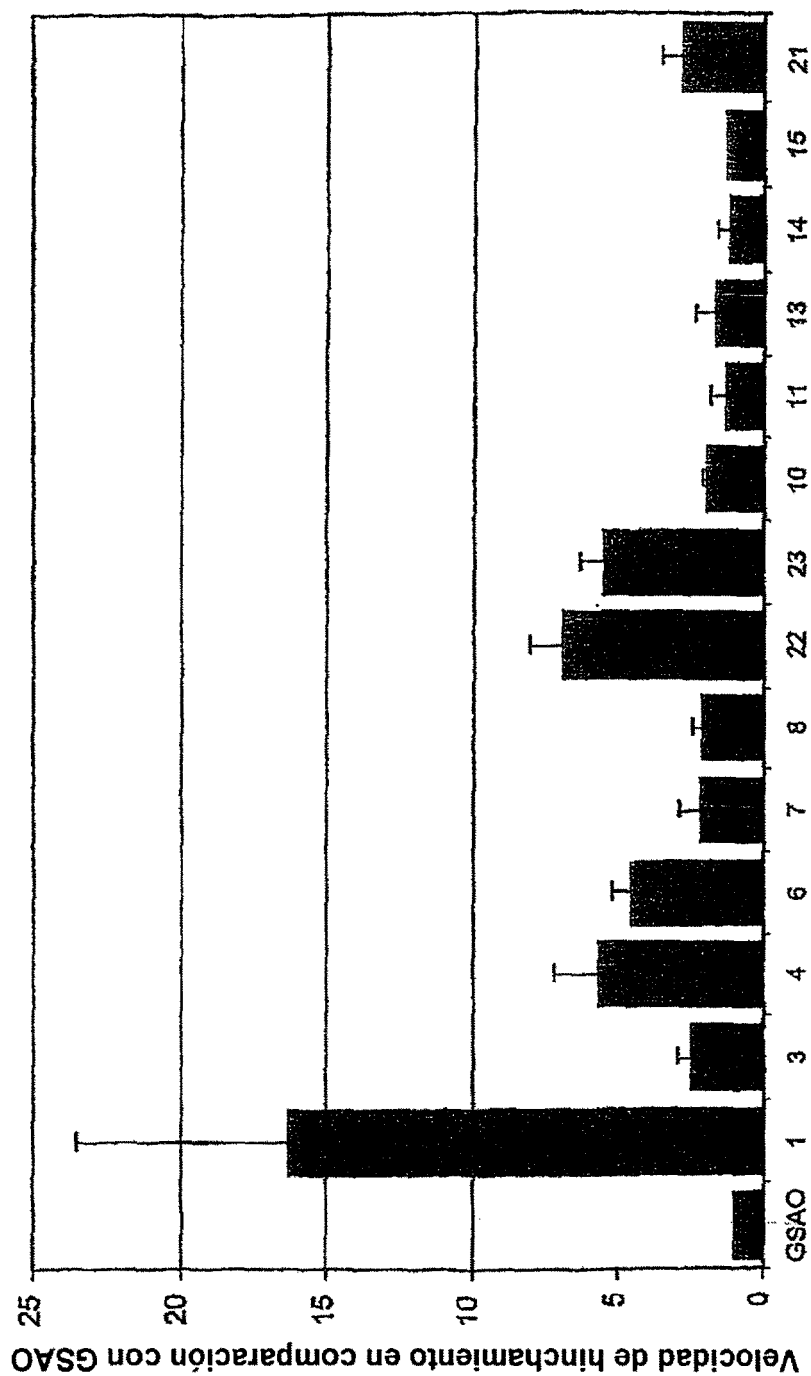


FIGURA 6

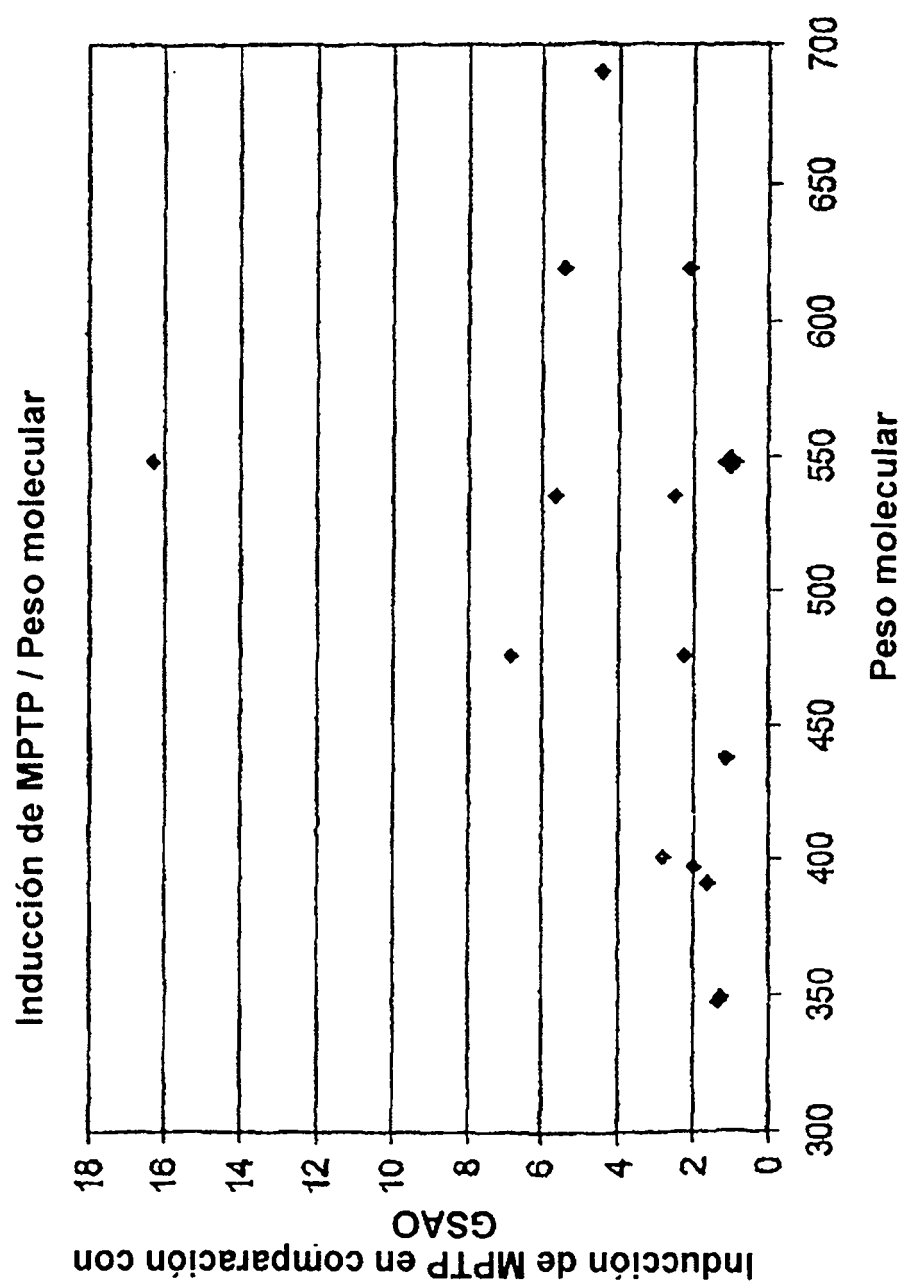


FIGURA 7

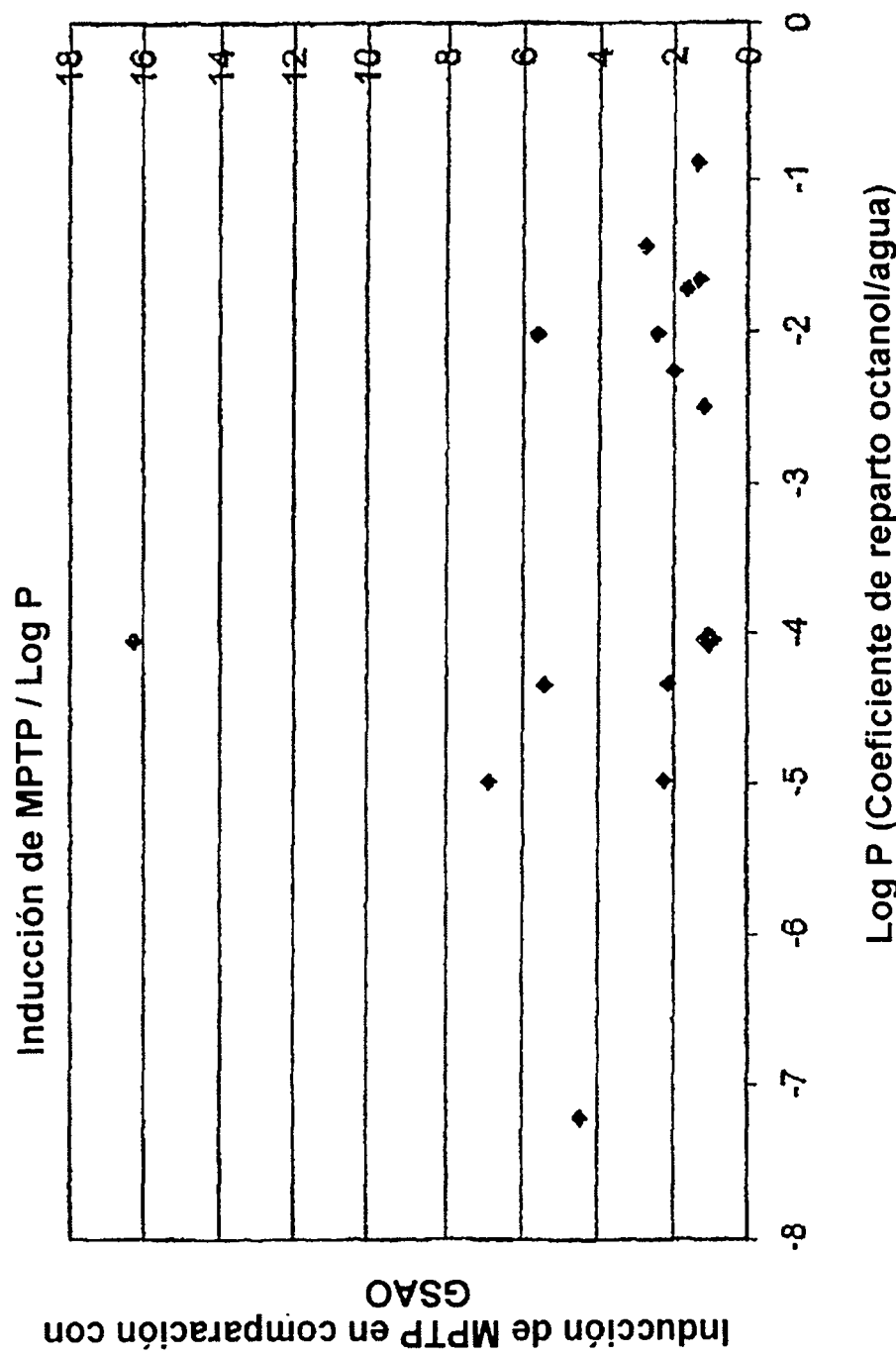


FIGURA 8

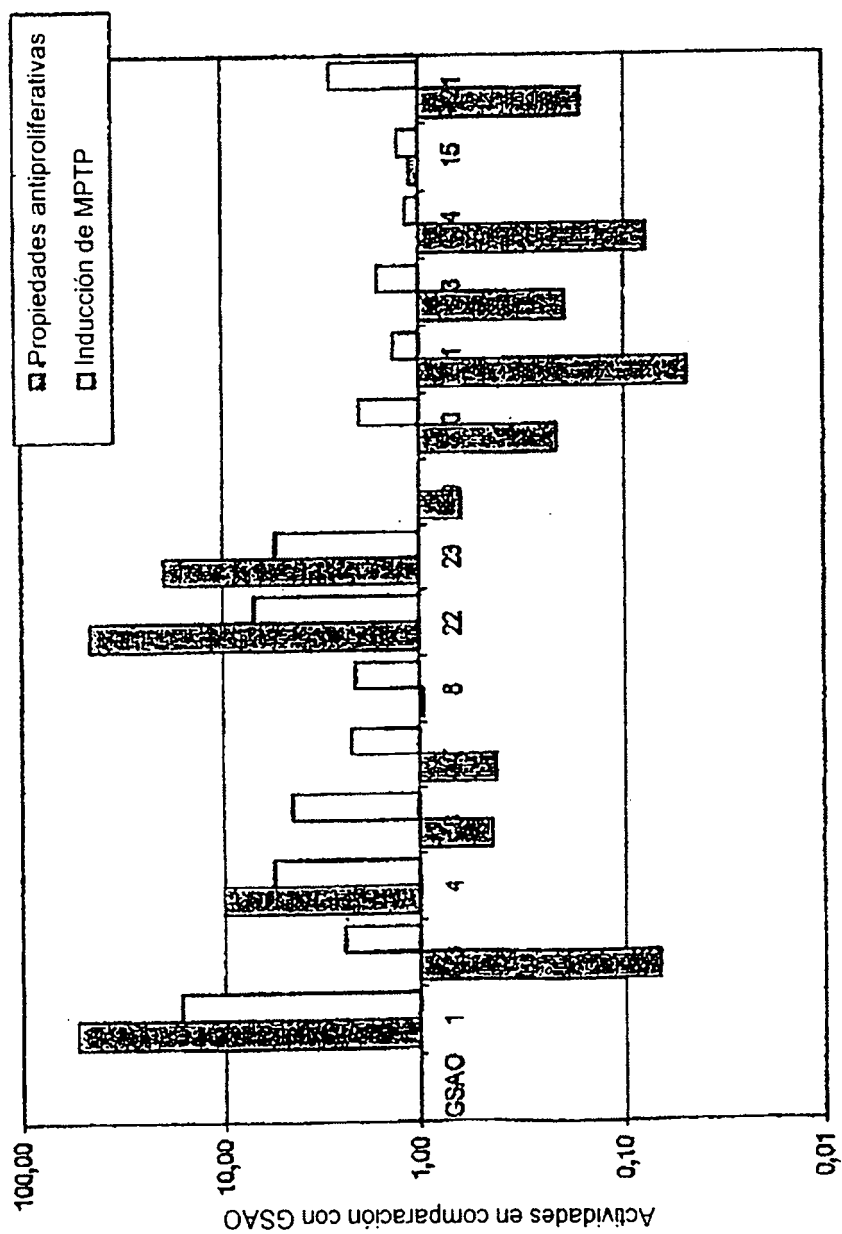
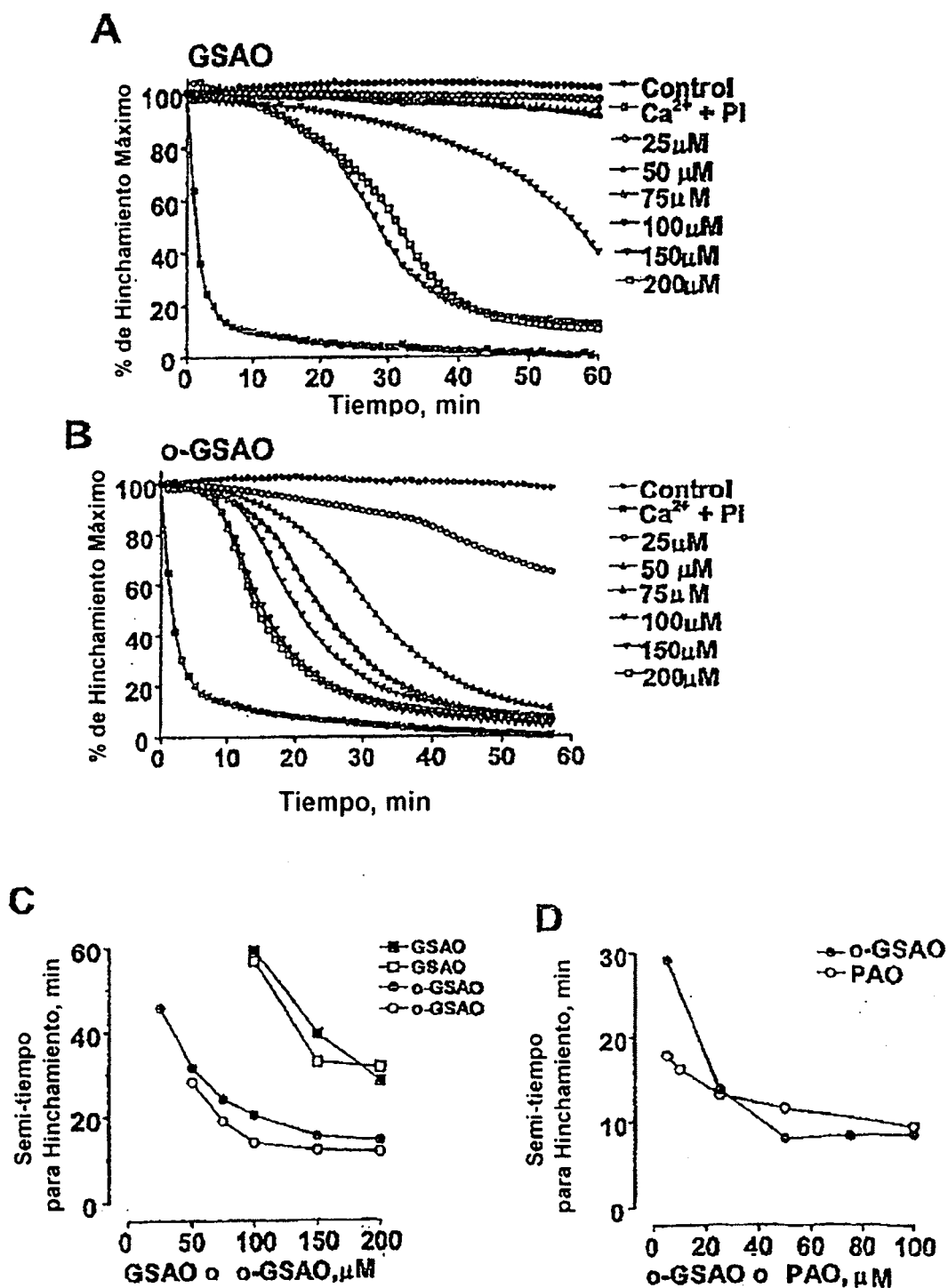
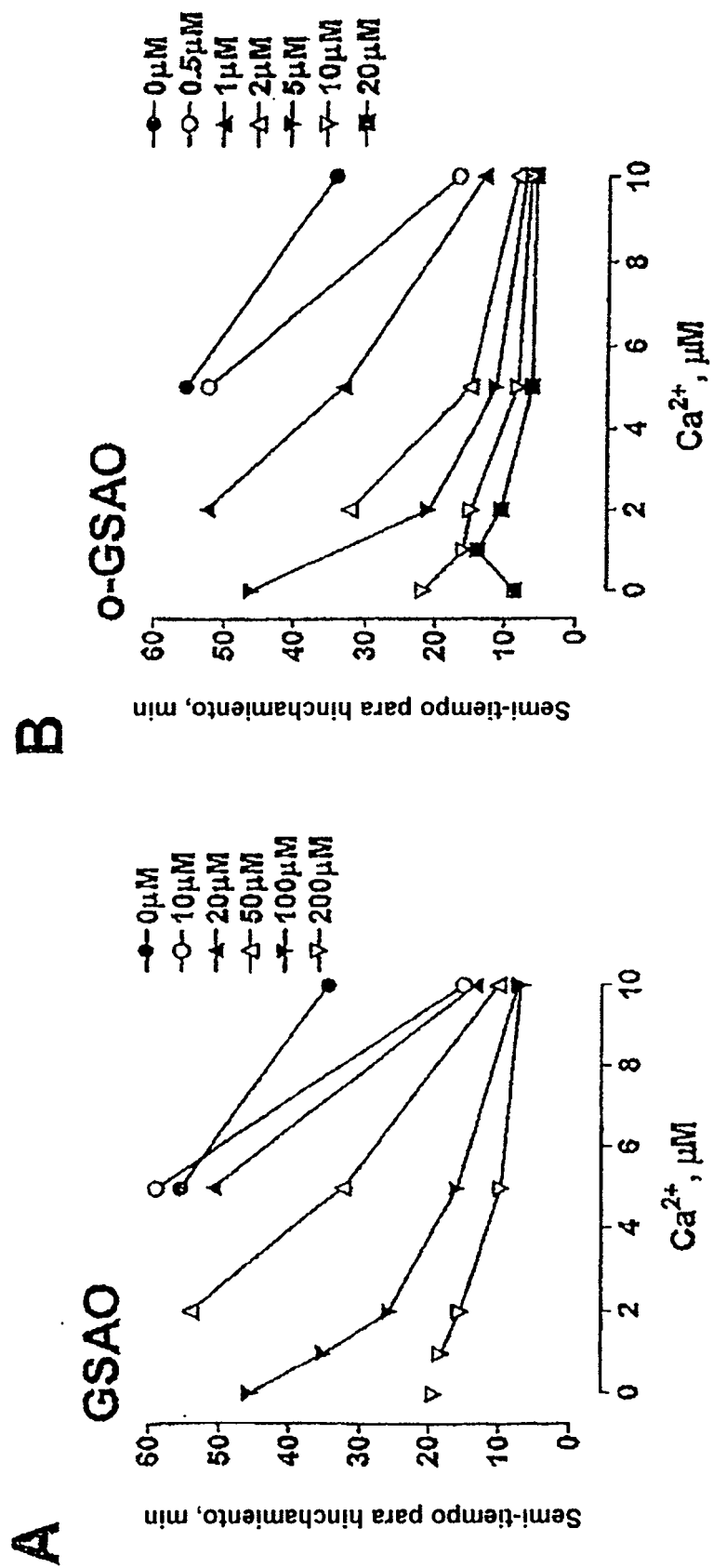


FIGURA 9



FIGURAS 10A, 10B, 10C y 10D



FIGURAS 11A y 11B

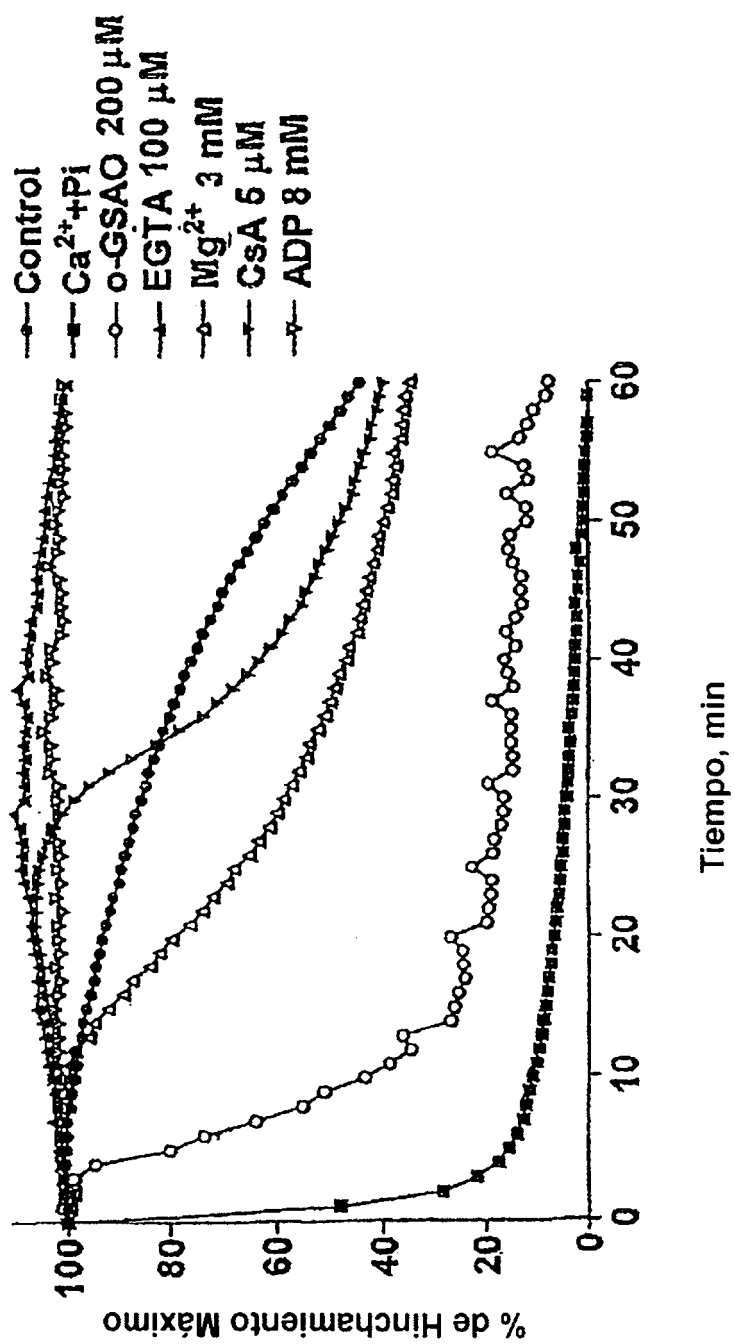


FIGURA 12