

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 850**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4365** (2006.01)

**A61K 31/4462** (2006.01)

**C07D 495/04** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2013 PCT/US2013/036790**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013 WO13158649**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2013 E 13779034 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2838533**

54 Título: **Composiciones y métodos de modulación de la actividad de 15-PGDH**

30 Prioridad:

**16.04.2012 US 201261624670 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.12.2017**

73 Titular/es:

**BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (33.3%)  
201 West 7th Street  
Austin, TX 78701, US;  
UNIVERSITY OF KENTUCKY (33.3%) y  
CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY (33.0%)**

72 Inventor/es:

**MARKOWITZ, SANFORD;  
WILLSON, JAMES, K.V.;  
POSNER, BRUCE, A.;  
READY, JOSEPH;  
ZHANG, YONGYOU;  
TAI, HSIN-HSIUNG;  
MOSS, MELISSA;  
ANTCZAK, MONIKA;  
GERSON, STANTON;  
DESAI, AMAR;  
BAE, KIBEOM y  
YANG, SUNG YEUN**

74 Agente/Representante:

**LINAGE GONZÁLEZ, Rafael**

**ES 2 647 850 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

Composiciones y métodos de modulación de la actividad de 15-PGDH

5 **Antecedentes**

La 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) representa la enzima clave en la inactivación de varias prostaglandinas, leucotrienos y ácidos hidroxiicosatetraenoicos (HETE) activos (por ejemplo, catalizando la oxidación de PGE<sub>2</sub> para dar 15-ceto-prostaglandina E2, 15k-PGE). La enzima humana está codificada por el gen HPGD y consiste en un homodímero con subunidades de un tamaño de 29 kDa. La enzima pertenece a la superfamilia conservada de manera evolutiva de enzimas deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (SDR), y según la nomenclatura aprobada recientemente para enzimas humanas, se denomina SDR36C1. Hasta la fecha, se han identificado dos formas de 15-PGDH, 15-PGDH tipo I dependiente de NAD<sup>+</sup> y 15-PGDH dependiente de NADP de tipo II, también conocida como carbonil reductasa 1 (CBR1, SDR21C1). Sin embargo, la preferencia de CBR1 por NADP y los altos valores de Km de CBR1 para la mayor parte de prostaglandinas sugiere que la mayoría de la actividad *in vivo* puede atribuirse a 15-PGDH tipo I.

Algunos estudios recientes sugieren que los inhibidores de 15-PGDH y activadores de 15-PGDH podrían ser valiosos terapéuticamente. Se ha mostrado que hay un aumento de la incidencia de tumores de colon en modelos de ratón atenuados en 15-PGDH. Un estudio más reciente implica la expresión aumentada de 15-PGDH en la protección de la muerte celular mediada por trombina. Se sabe bien que 15-PGDH es responsable de la inactivación de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), que es un producto posterior del metabolismo de COX-2. Se ha hallado que PGE<sub>2</sub> es neurotóxico tanto *in vitro* como *in vivo*; por tanto, inhibidores específicos de COX-2, que disminuyen la liberación de PGE<sub>2</sub>, muestran efectos neuroprotectores. También se ha mostrado que PGE<sub>2</sub> es beneficioso en una variedad de procesos biológicos, tales como densidad capilar, cicatrización de heridas dérmicas y formación de hueso.

Hoon Cho y Hsin-Hsiung Tai: Thiazolidinediones as novel class of NAD<sup>+</sup>-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase inhibitors, Archives of Biochemistry and Biophysics, 405 (2002), 247-251 dan a conocer bencilidén-tiazolidindionas que inhiben 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH).

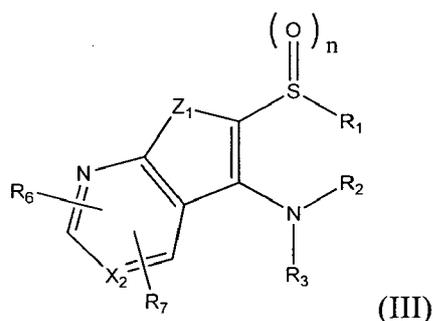
El documento US 2011/0269954 A1 da a conocer bencilidén-tiazolidindionas y una composición farmacéutica que comprende las mismas, usadas para la prevención o el tratamiento de enfermedad cardiovascular, enfermedad gastrointestinal y enfermedad renal mediante la inhibición de la actividad de 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) que descompone prostaglandinas así como es útil para la prevención de la caída del cabello y la estimulación del crecimiento del cabello y estimulación osteogénica y cicatrización de heridas.

**Sumario**

Se describen en el presente documento compuestos y métodos de modulación de las actividades 15-PGDH, modulación de los niveles de prostaglandinas tisulares y/o el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados en los que se desea modular la actividad de 15-PGDH y/o los niveles de prostaglandinas.

Un inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un tejido de un sujeto en una cantidad eficaz para aumentar los niveles de prostaglandinas en el tejido.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de 15-PGDH para su uso en la potenciación del trasplante de células, trasplante de órganos, injerto de injertos de tejidos, regeneración de órganos, regeneración de tejidos, reparación de tejidos, cicatrización de heridas, crecimiento y/o proliferación celular y/o paliación del rechazo de injertos de células y/o tejidos, en la que el inhibidor de 15-PGDH tiene la siguiente fórmula (III):



en la que:

55

n es 0-2;

R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1-8</sub>, que es lineal, ramificado o cíclico y que no está sustituido o está sustituido;

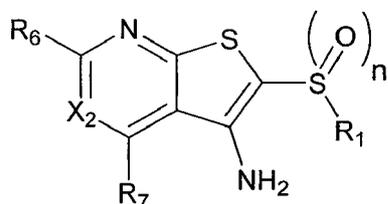
5 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R' y COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior);

Z<sub>1</sub> es NR', O o S (en el que R' es H o un grupo alquilo inferior);

10 X<sub>2</sub> es N o CH;

15 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son opcionales y, si están presentes, son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior); arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo sustituido o no sustituido, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

20 En una realización preferida, la composición farmacéutica que va a usarse comprende el inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula:



en la que:

25 n es 0-2;

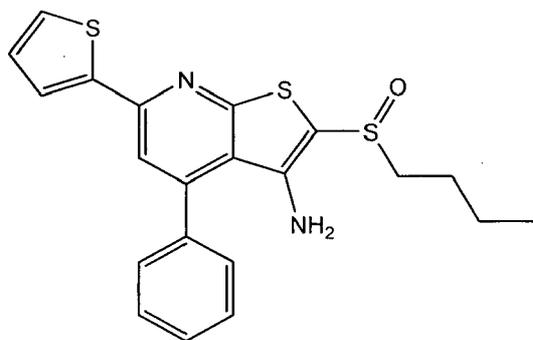
X<sub>2</sub> es N o CH

30 R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1-8</sub>, que es lineal, ramificado o cíclico y que no está sustituido o está sustituido;

35 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son opcionales y, si están presentes, son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior); arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo sustituido o no sustituido, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

40 En otra realización preferida, la composición farmacéutica que va a usarse comprende el inhibidor de 15-PGDH definido por n es 1 y X<sub>2</sub> es CH.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica que va a usarse comprende el inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula:



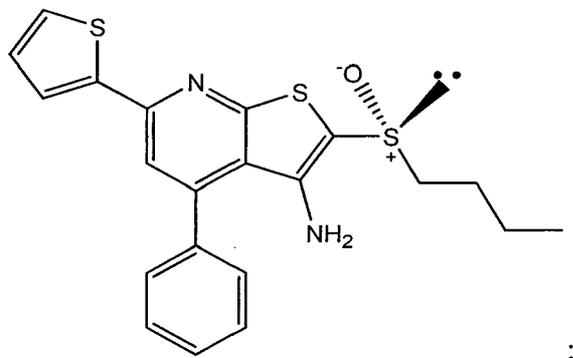
45 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica que va a usarse comprende el inhibidor de 15-PGDH que

incluye más del 99% en peso del isómero R(+) y menos del 1% en peso del isómero S(-)

En otra realización preferida, la composición farmacéutica que va a usarse comprende el inhibidor de 15-PGDH que consiste esencialmente en un compuesto que tiene la fórmula:

5



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar las células madre tisulares en tejido de un sujeto.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar el estado físico de un injerto de médula ósea de donante o un injerto de células madre hematopoyéticas de donante.

15

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar al menos uno de células madre en el sujeto y/o el estado físico de la médula como injerto de donante y/o la regeneración de la médula aumentando al menos uno de células madre en el sujeto y/o el estado físico de la médula como injerto de donante y/o la regeneración de la médula.

20

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar el estado físico de una preparación de células madre como injerto de donante y/o la disminución del número de unidades de células madre requeridas para trasplante.

25 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la paliación del rechazo de injertos de células, células madre, médula ósea, órganos y/o tejidos y/o potenciar el injerto de injertos de células, células madre, médula ósea y/o tejidos.

30 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar la densidad ósea, tratar osteoporosis, fomentar la consolidación de fracturas o fomentar la consolidación de hueso.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para la curación o prevención de lesión intestinal.

35 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para conferir resistencia y/o curación frente a los efectos tóxicos o letales de la exposición a radiación o quimioterapia, o lesión debida a enfermedad inflamatoria del intestino.

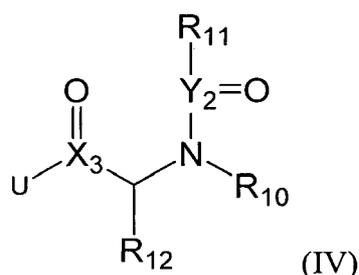
40 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para fomentar la regeneración del hígado en entornos que incluyen después de cirugía hepática o lesión hepática o trasplante de hígado.

En otra realización preferida, la composición farmacéutica se usa para aumentar los recuentos de neutrófilos y/o los recuentos de plaquetas y/o los recuentos de glóbulos rojos y/o hematocrito y/o nivel de hemoglobina y/o células madre de médula ósea.

45 El inhibidor de 15-PGDH puede i) a una concentración de 2,5  $\mu$ M, estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 70 (usando una escala en la que un valor de 100 indica una duplicación de emisión de indicador con respecto al valor inicial); ii) a una concentración de 2,5  $\mu$ M estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 75; iii) a una concentración de 7,5  $\mu$ M estimular una línea celular indicadora LS174T que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 70; iv) a una concentración de 7,5  $\mu$ M, no activa una línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel más de 20; y v) inhibe la actividad enzimática de proteína 15-PGDH recombinante a una CI50 de menos de 1  $\mu$ M.

50

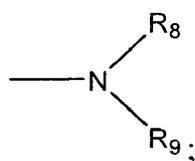
- 5 El inhibidor de 15-PGDH puede i) a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$ , estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; ii) a una concentración de 2,5  $\mu\text{M}$  estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iii) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$  estimular una línea celular indicadora LS174T que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iv) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$ , no activa una línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel de luciferasa más del 20% por encima del fondo; y v) inhibe la actividad enzimática de proteína 15-PGDH recombinante a una CI50 de menos de 1  $\mu\text{M}$ .
- 10 El inhibidor de 15-PGDH puede inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH recombinante a una CI50 de menos de 1  $\mu\text{M}$ , o preferiblemente a una CI50 de menos de 250 nM, o más preferiblemente a una CI50 de menos de 50 nM, o más preferiblemente a una CI50 de menos de 5 nM.
- 15 El inhibidor de 15-PGDH puede aplicarse a la piel de un sujeto para fomentar y/o estimular la pigmentación de la piel y/o el crecimiento del cabello y/o inhibir la caída del cabello. El inhibidor de 15-PGDH también puede administrarse a un sujeto para fomentar la cicatrización de heridas, regenerar tejido y/o tratar al menos una de úlceras bucales, colitis ulcerosa, úlceras gastrointestinales, enfermedad inflamatoria del intestino, insuficiencia vascular, colitis, enfermedad de Raynaud, enfermedad de Buerger, neuropatía diabética, hipertensión de la arteria pulmonar, enfermedad cardiovascular, úlceras diabéticas, enfermedad renal y disfunción eréctil. El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse además a un sujeto en combinación con un agonista de prostanoïdes con el fin de potenciar el efecto terapéutico del agonista en condiciones de sensibilidad a prostaglandinas.
- 20 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un tejido de un sujeto para aumentar las células madre tisulares. El inhibidor de 15-PGDH también puede administrarse a un donante de injerto de médula ósea o un donante de células madre hematopoyéticas para aumentar el estado físico de un injerto de médula ósea de donante o un injerto de células madre hematopoyéticas de donante. El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a la médula ósea de un sujeto para aumentar las células madre en el sujeto. El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse además a la médula ósea de un sujeto para aumentar el estado físico de la médula como injerto de donante.
- 25 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a una preparación de células madre hematopoyéticas de un sujeto para aumentar el estado físico de la preparación de células madre como injerto de donante. El inhibidor de 15-PGDH también puede administrarse a una preparación de células madre hematopoyéticas de sangre periférica de un sujeto para aumentar el estado físico de la preparación de células madre como injerto de donante. El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse además a una preparación de células madre de cordón umbilical para aumentar el estado físico de la preparación de células madre como injerto de donante.
- 30 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto para paliar el rechazo de injertos de médula ósea, para potenciar el injerto de injertos de médula ósea y/o para potenciar el injerto de un injerto de células madre hematopoyéticas o un injerto de células madre de cordón umbilical.
- 35 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto o a un injerto de tejido de un sujeto para paliar el rechazo del injerto o para potenciar el injerto del injerto.
- 40 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto o a un injerto de tejido de un sujeto para paliar el rechazo del injerto o para potenciar el injerto del injerto.
- 45 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto o a un injerto de tejido de un sujeto para paliar el rechazo del injerto o para potenciar el injerto del injerto.
- 50 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto para el tratamiento de osteoporosis, fracturas óseas o fomentar la consolidación después de lesión ósea o artroplastia.
- 55 El inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto o al hígado de un sujeto para fomentar la regeneración del hígado tras resección hepática o tras lesión tóxica en el hígado. En un caso, la lesión tóxica en el hígado puede estar provocada por sobredosis de paracetamol o compuestos hepatotóxicos relacionados.
- Un activador de 15-PGDH puede administrarse a un tejido de un sujeto en una cantidad eficaz para aumentar los niveles de 15-PGDH y disminuir los niveles de prostaglandinas en el tejido. El activador de 15-PGDH puede incluir la fórmula (IV):



en la que:

- 5  $X_3$  e  $Y_2$  son independientemente C o SO;

U es  $OR''$  (en el que  $R''$  es H, un grupo alquilo sustituido o no sustituido o grupo arilo sustituido o no sustituido) o



10

$R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo,  $(CH_2)_{n1}OR'$  (en el que  $n1 = 1, 2$  ó  $3$ ),  $CF_3$ ,  $CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$ ,  $CH_2-CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$  (en los que  $X = F, Cl, Br$  o  $I$ ),  $CN$ ,  $(C=O)-R'$ ,  $N(R')_2$ ,  $NO_2$ ,  $(C=O)N(R')_2$ ,  $O(CO)R'$ ,  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $COOR'$  (en los que  $R'$  es H o un grupo alquilo inferior), un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterociclilo sustituido o no sustituido, y  $R_8$  y  $R_9$  pueden unirse para formar un anillo cíclico o policíclico; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

El activador puede i) a una concentración de  $7,5 \mu M$ , estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50 (usando una escala en la que un valor de 100 indica una duplicación de emisión de indicador con respecto al valor inicial); ii) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50; iii) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicadora LS174T que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50; iv) a una concentración de  $7,5 \mu M$ , no activa la línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel de no más de 25; y v) frente a la proteína 15-PGDH recombinante el compuesto muestra una concentración CI50 para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH de más de o igual a  $2,5 \mu M$ .

20

25

El activador puede i) a una concentración de  $7,5 \mu M$ , estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; ii) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iii) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicadora LS174T que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iv) a una concentración de  $7,5 \mu M$ , no activa la línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel de luciferasa de no más del 25% anterior; y v) frente a la proteína 15-PGDH recombinante el compuesto muestra una concentración CI50 para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH de más de o igual a  $2,5 \mu M$ .

30

35

El activador de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto para tratar una neoplasia, tal como una neoplasia de colon. El activador de 15-PGDH también puede administrarse a un sujeto para prevenir una neoplasia, tal como una neoplasia de colon. El activador de 15-PGDH también puede administrarse a un sujeto para reducir la inflamación y/o el dolor.

40

#### Breve descripción de los dibujos

45 Las figuras 1(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de células que expresan un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa creado mediante inserción génica dirigida de luciferasa de renilla en el último exón codificante de 15-PGDH tratadas con los compuestos SW033291, SW054384 y SW145753 a diversas concentraciones. Se demuestra la actividad en tres líneas celulares de cáncer de colon diferentes todas modificadas por ingeniería para que contengan la fusión 15-PGDH-luciferasa. Estas líneas celulares son Vaco-9m (V9m), LS174T, Vaco503 (V503).

50

La figura 2 ilustra inmunotransferencias de tipo Western que demuestran los niveles de proteína 15-PGDH en las

líneas celulares V9M, LS174T y V503 tratadas con 7,5  $\mu\text{M}$  de SW033291, SW054384 y SW145753 durante 48 horas. Las células FET sin tratar proporcionan un control positivo para la expresión de 15-PGDH.

5 Las figuras 3(A-C) ilustran inmunotransferencias de tipo Western que demuestran los niveles de proteína 15-PGDH en líneas celulares de colon tratadas con SW124531 (se usan células FET tratadas con TGF-13 (10 ng/ml durante 48 horas) como control positivo para la expresión de 15-PGDH en determinados paneles).

10 La figura 4 ilustra inmunotransferencias de tipo Western que demuestran los niveles de proteína 15-PGDH (wt-PGDH) expresadas a partir de un vector de expresión de ADNc en células V400-S3-2-32 tratadas con SW124531 5  $\mu\text{M}$ , y los niveles de proteína de una 15-PGDH mutante catalíticamente inactivada. La ( $\mu$ -PGDH) también expresada a partir de un vector de expresión de ADNc en células V400-M3-2-72 tratadas con SW124531.

15 Las figuras 5(A-B) ilustran los niveles de proteína 15-PGDH en células V503 tratadas con SW124531 tal como se somete a ensayo mediante inmunofluorescencia (dos filas superiores) y mediante inmunotransferencia de tipo Western (panel inferior).

Las figuras 6(A-F) ilustran gráficos que muestran los niveles de ARNm de 15-PGDH en las líneas celulares de cáncer de colon tratadas con SW033291.

20 Las figuras 7(A-C) ilustran gráficos que muestran los niveles de ARNm de 15-PGDH en las líneas celulares de cáncer de colon tratadas con SW033291.

25 Las figuras 8(A-C) ilustran gráficos que muestran los niveles de ARNm de 15-PGDH en las líneas celulares de cáncer de colon tratadas con SW054384 y SW145753.

Las figuras 9(A-I) ilustran gráficos que muestran los niveles de ARNm de 15-PGDH en las líneas celulares de cáncer de colon tratadas con SW124531 5  $\mu\text{M}$ .

30 Las figuras 10(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad de 15-PGDH en las líneas celulares tratadas con SW033291, SW054384 y SW145753. Se mide la actividad como pmol de  $\text{PGE}_2$ /min/millón de células.

35 Las figuras 11 (A-D) ilustran una tabla y representaciones gráficas que muestran la actividad de la proteína 15-PGDH recombinante (una proteína de fusión 15-PGDH-GST) incubada con concentraciones variables de los compuestos de prueba.

40 Las figuras 12(A-D) ilustran representaciones gráficas que muestran la actividad de la proteína 15-PGDH recombinante tratada con SW033291 y SW054384, midiéndose en los paneles 12A y C la transferencia de tritio de un sustrato de  $\text{PGE}_2$  radiomarcado y midiéndose en los paneles 12B y D la generación de NADH mediante fluorescencia.

La figura 13 ilustra una tabla y una representación gráfica que muestran la actividad de 15-PGDH medida mediante tras la transferencia de tritio de un sustrato de  $\text{PGE}_2$  radiomarcado en células tratadas con SW124531 (panel superior) y en proteína 15-PGDH recombinante tratada con SW124531 (panel inferior).

45 Las figuras 14(A-B) ilustran curvas de fusión y una tabla que muestran la diferente capacidad de un compuesto para unirse directamente a la proteína 15-PGDH recombinante tal como se mide mediante el cambio de la temperatura de fusión de la proteína.

50 Las figuras 15(A-B) ilustran curvas de fusión temperatura de proteína 15-PGDH mutante catalíticamente inactiva tratada con los compuestos de prueba.

Las figuras 16(A-B) ilustran gráficos que muestran los niveles de  $\text{PGE}_2$  que se someten a ensayo en el medio de células A549 que se han estimulado por IL1-beta durante 23 horas, con los compuestos de prueba.

55 La figura 17 ilustra un gráfico que muestra el efecto de respuesta a la dosis de SW033291 sobre la producción de  $\text{PGE}_2$  a partir de células A549 tratadas con IL1-beta.

60 Las figuras 18(A-B) ilustran gráficos que muestran las modulaciones *in vivo* por los compuestos (2,5  $\mu\text{M}$ ) de actividad PGDH tal como se refleja en los niveles de  $\text{PGE}_2$  tras adición de  $\text{PGE}_2$  al medio de células Vaco-503.

La figura 19 ilustra imágenes que muestran la actividad de SW033291 en la aceleración de la cicatrización de una herida modelo que consiste en un arañazo en una monocapa de células HaCaT observado a lo largo de 48 horas de tratamiento.

65 La figura 20 ilustra gráficos que muestran la cuantificación de la anchura del arañazo a las 0 y 48 horas en el control,

células tratadas con SW033291 (2,5  $\mu$ M) y las células tratadas con TGF-beta (1 ng/ml).

5 Las figuras 21(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran: (A) la inhibición en porcentaje de PGDH usando titulaciones del inhibidor de 15-PGDH SW033291 llevadas a cabo a diferentes concentraciones de 15-PGDH; y (B) la CI50 del inhibidor de 15-PGDH SW033291 frente a la concentración de 15-PGDH.

10 Las figuras 22(A-B) ilustran gráficos que muestran: (A) la actividad de inhibición de la enzima 15-PGDH y (B) la inhibición en porcentaje de la actividad de inhibición debida a SW033291 tal como se mide antes y después de diálisis de la mezcla de 15-PGDH y SW033291.

Las figuras 23(A-B) ilustran una representación gráfica que muestra tasas de reacción y velocidad de reacción relativa de 15-PGDH a concentraciones variables de SW033291.

15 Las figuras 24(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran: (A) inhibición de 15-PGDH por SW033291 en presencia de PGE-2; y (B) CI50 de SW033291 contra 15-PGDH frente a la concentración de PGE<sub>2</sub>.

La figura 25 ilustra un diagrama esquemático que muestra las relaciones estructura-actividad de análogos de SW033291 frente a su CI50 contra 15-PGDH.

20 La figura 26 ilustra un diagrama esquemático que muestra análogos adicionales de SW033291.

Las figuras 27(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V503, LS174T y V503 tratadas con los compuestos de la figura 26 a 2,5  $\mu$ M y 7,5  $\mu$ M.

25 La figura 28 ilustra un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por los compuestos de la figura 26.

Las figuras 29(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran la CI50 contra 15-PGDH de SW033291 y SW0206980.

30 Las figuras 30(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran los perfiles de fusión de SW0206890 y SW033291 que se unen a 15-PGDH.

35 Las figuras 31(A-C) ilustran representaciones gráficas que muestran la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por SW033291, SW206980 y SW206992.

Las figuras 32(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V503, LS174T y V503 tratadas con diversas concentraciones de SW033291.

40 Las figuras 33(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V503, LS174T y V503 tratadas con diversas concentraciones de SW0206980.

Las figuras 34(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V503, LS174T y V503 tratadas con diversas concentraciones de SW0206992.

45 Las figuras 35(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran los perfiles de fusión de SW206992, SW0206890 y SW033291 que se unen a 15-PGDH.

50 Las figuras 36(A-B) ilustran representaciones gráficas que muestran los perfiles de fusión de SW206992, SW0206890 y SW033291 que se unen a 15-PGDH.

Las figuras 37(A-C) ilustran gráficos que muestran el efecto de SW206992, SW0206890 y SW033291 sobre la regulación de PGE-2 en células A549 estimuladas con IL1-Beta.

55 Las figuras 38(A-C) ilustran gráficos que muestran el efecto de SW206992, SW0206890 y SW033291 sobre los números de células en células A549 después de estimularse con IL1-beta.

La figura 39 ilustra un diagrama esquemático de análogos adicionales de SW033291.

60 Las figuras 40(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V9M, LS174T y V503 tratadas con los compuestos de la figura 39 a 2,5  $\mu$ M y 7,5  $\mu$ M.

La figura 41 ilustra un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por los compuestos de la figura 40.

65 La figura 42 ilustra un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por los

compuestos de la figura 40.

La figura 43 muestra la curva de dosis-respuesta para la inducción de un indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa en el contexto de la línea celular V9m de SW033291, SW208064, SW208065, SW208066 y SW208067.

5 La figura 44 ilustra curvas de titulación de compuestos inhibidores de 15-PGDH en un ensayo que mide los efectos sobre los niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio de células A549 que se han estimulado con IL1-beta.

La figura 45 es una representación gráfica que muestra el cambio de peso de ratones FVB tratados con SW033291.

10 Las figuras 46(A-C) ilustran gráficos que muestran: (A) celularidad de médula ósea total; (B) población de SKL de ratones de tipo natural frente a PGDH<sup>-/-</sup>; y (C) recuentos de UFC promedio en ratones de tipo natural frente a PGDH<sup>-/-</sup> (designados o bien como PGDH<sup>-/-</sup> o bien como PGDH).

15 La figura 47 ilustra un gráfico que muestra recuentos de UFC en médula ósea de tipo natural tratada con SW033291 y PGE-2.

20 Las figuras 48(A-C) ilustran gráficos que muestran: (A) celularidad de médula ósea de ratones tratados con SW033291; (B) % de SKL en médula ósea completa de ratones tratados con SW033291; y (C) recuentos de UFC en ratones tratados con SW033291.

25 Las figuras 49(A-B) ilustran: (A) un diagrama esquemático tras marcarse células con antígeno CD45.2 en ratones C57BL/6J irradiados con dosis letal rescatados con un trasplante de médula ósea de ratones donantes tratados con SW033291 o con vehículo; y (B) gráficos que muestran el quimerismo de células T, células mieloides y células B de donante después de tal tratamiento.

La figura 50 ilustra un diagrama esquemático que muestra el esquema de un estudio en el que se irradian ratones C57BL/6J con 11 GY en el día 0 y seguido por el tratamiento con SW033291.

30 La figura 51 ilustra un diagrama esquemático de una hepatectomía parcial.

Las figuras 52(A-D) ilustran fotografías que muestran una vista preoperatoria y posoperatoria de hígado de ratón.

35 Las figuras 53(A-D) ilustran fotografías que muestran vistas tras hepatectomía del hígado de ratón (a la izquierda) y regeneración de hígado de ratón en el día posoperatorio 7 (a la derecha).

Las figuras 54(A-B) ilustran micrografías de hígados de ratón tras hepatectomía de ratón al que se le administró SW033291 y vehículo de control, designando las flechas figuras mitóticas.

40 La figura 55 ilustra un gráfico que muestra la mitosis en hígado de ratón tratado con SW033291 frente al ratón de control.

La figura 56 ilustra un gráfico que muestra las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones de control frente a C57B1/6J tratados con SW033291.

45 La figura 57 ilustra un gráfico que muestra las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones de control frente a C57B1/6J tratados con SW033291 dos veces al día.

50 La figura 58 ilustra un gráfico que representa las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones de control frente a C57B1/6J tratados con SW033291.

Las figuras 59(A-B) ilustran un gráfico y una representación gráfica que muestran los niveles de ALT tras hepatectomía parcial en un control de ratón frente a un ratón tratado con SW033291.

55 La figura 60 ilustra un gráfico que muestra los niveles de bilirrubina en suero tras hepatectomía parcial en un ratón de control y un ratón tratado con SW033291.

La figura 61 ilustra un gráfico que muestra las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones de control frente a FVB tratados con SW033291.

60 La figura 62 ilustra un gráfico que muestra los pesos corporales preoperatorios en ratones de control frente a FVB tratados con SW033291.

65 La figura 63 ilustra un gráfico que muestra el peso del segmento de hígado resecado de ratones tratados o bien con SW033291 o bien con control de vehículo y sometido a ensayo para determinar la regeneración del hígado.

- La figura 64 ilustra un gráfico que muestra pesos de hígado obtenidos tras hepatectomía parcial en ratones tratados con SW033291 y de control.
- 5 La figura 65 ilustra un gráfico que muestra las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones tratados con SW033291 y de control.
- La figura 66 ilustra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados con SW033291 y de control en el día posoperatorio 4.
- 10 La figura 67 ilustra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados con SW033291 y de control en el día posoperatorio 7.
- 15 La figura 68 ilustra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados con SW033291 y de control en el día posoperatorio 4.
- La figura 69 ilustra fotografías de células en fase S tras hepatectomía parcial en el día posoperatorio 2 en hígados de ratones tratados con SW033291 y de control tratados con vehículo.
- 20 La figura 70 ilustra una fotografía que muestra vistas de alta potencia (40X) de campos representativos del estudio de la figura 69.
- 25 La figura 71 ilustra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara el tanto por ciento de células positivas para BrdU en hígados de ratones tratados con SW033291 frente a tratados con control de vehículo en el día posoperatorio 2 tras hepatectomía parcial.
- La figura 72 ilustra un gráfico que muestra los cambios promedio con respecto al peso inicial de la cohorte de ratones de control frente a tratados con SW033291, todos tratados con dextrano-sulfato de sodio (DSS) al 2% en el agua potable.
- 30 La figura 73 ilustra un gráfico del índice diario de actividad de la enfermedad de la cohorte de ratones de control frente a tratados con SW033291, todos tratados con DSS al 2% en el agua potable.
- 35 La figura 74 ilustra un gráfico que muestra los cambios promedio con respecto al peso inicial de la cohorte de ratones tratados con DSS que reciben un vehículo de control frente a SW033291.
- Las figuras 75(A-B) ilustran: (A) un gráfico que muestra el número de úlceras en el colon de ratones tratados con DSS que reciben un vehículo de control frente a SW033291; y (B) fotografías que muestran úlceras de ratones tratados con DSS que reciben control (izquierda) o SW033291 (derecha).
- 40 La figura 76 ilustra un gráfico que muestra la cuantificación de la carga de úlcera en el día 15 de ratones tratados con DSS.
- 45 Las figuras 77(A-B) ilustran fotografías que muestran hallazgos colonoscópicos y el índice endoscópico de ratón de gravedad de colitis (MEICS) para un ratón tratado con DSS que recibe un vehículo de control o SW033291.
- La figura 78 ilustra un gráfico que muestra la puntuación de MEICS de ratones tratados con DSS que reciben un vehículo de control o SW033291.
- 50 La figura 79 ilustra fotomicrografías de campos de alta potencia de la parte media del colon en el día 8 del protocolo con DSS de ratones de control, ratones tratados con SW033291 (tratamiento) y ratones deficientes en 15-PGDH (KO) y un gráfico que representa la suma del número promedio de células positivas para BrdU por cripta en las partes distal más central del colon de ratones de control (Cn), tratados con SW033219 (Tx) y ratones deficientes en 15-PGDH (KO) en el día 1, el día 8 y el día 15 del protocolo de tratamiento con DSS.
- 55 La figura 80 ilustra un gráfico que muestra la longitud del colon en el día 22 de ratones tratados con DSS que reciben un vehículo de control o SW033291.
- 60 La figura 81 ilustra un diagrama esquemático de análogos de SW054384.
- Las figuras 82(A-C) ilustran gráficos que muestran la actividad luciferasa de líneas celulares de cáncer de colon V9M, LS174T y V503 tratadas con los compuestos de la figura 81 a 2,5  $\mu$ M y 7,5  $\mu$ M.
- 65 La figura 83 ilustra un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por los

compuestos de la figura 74.

Las figuras 84(A-C) ilustran: (A) un gráfico que muestra la actividad en la reducción de los niveles de PGE<sub>2</sub> en medios de células A549 que se estimulan para producir PEG2 mediante tratamiento usando IL1-beta usando compuestos de la figura 81; (B) un gráfico que muestra la toxicidad de células A549 a las que se les administraron los compuestos de la figura 81; y (C) fotografías de células A549 tratadas con compuestos de la figura 81.

La figura 85 ilustra una representación gráfica que muestra la estabilidad metabólica de SW054384 mediante incubación con microsomas S9 de hígado murino.

La figura 86 ilustra una representación gráfica que muestra la estabilidad metabólica de SW0125991 mediante incubación con microsomas S9 de hígado murino.

La figura 87 ilustra un diagrama esquemático de análogos de SW054384.

La figura 88 ilustra un gráfico que muestra la actividad luciferasa de célula de cáncer de colon V9m tratada con los compuestos de la figura 87 a 2,5 μM y 7,5 μM.

La figura 89 ilustra un gráfico que muestra la actividad luciferasa de células de cáncer de colon LS174T tratadas con los compuestos de la figura 87 a 2,5 μM y 7,5 μM.

La figura 90 ilustra un gráfico que muestra la actividad luciferasa de células de cáncer de colon V503 tratadas con los compuestos de la figura 87 a 2,5 μM y 7,5 μM.

La figura 91 ilustra un gráfico que muestra la inhibición en porcentaje de la actividad de 15-PGDH por los compuestos de la figura 87.

La figura 92 es una ilustración esquemática que muestra las estructuras de los activadores de 15-PGDH SW054384, SW125991, SW207997, SW207998 y SW207999.

La figura 93 ilustra un gráfico que muestra las actividades de SW054384, SW125991, SW207997, SW207998, SW207999 en la reducción de los niveles de PGE<sub>2</sub> en medio de células A549 que se han tratado con 2,5 μM de cada compuesto junto con adición de IL1-beta 2,5 ng/ml.

La figura 94 ilustra curvas de titulación de compuestos activadores de 15-PGDH en un ensayo que mide los efectos sobre los niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio de células A549 que se han estimulado con IL1-beta.

La figura 95 ilustra una fotografía que muestra la evaluación de la toxicidad de SW125991 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503).

La figura 96 ilustra una fotografía que muestra la evaluación de la toxicidad de SW207997 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503).

La figura 97 ilustra una fotografía que muestra la evaluación de la toxicidad de SW207998 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503).

La figura 98 ilustra una fotografía que muestra la evaluación de la toxicidad de SW207999 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503).

### Descripción detallada

Por conveniencia, determinados términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas se recopilan aquí. A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta solicitud.

Los artículos “un(o)” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa uno o más elementos.

Los términos “comprenden”, “que comprenden”, “incluyen”, “que incluyen”, “tienen” y “que tienen” se usan en el significado incluyente, abierto que pueden incluirse elementos adicionales. Los términos “tal(es) como”, “por

ejemplo”, tal como se usan en el presente documento no son limitativos y son para fines ilustrativos únicamente. “Incluyendo” y “incluyendo pero sin limitarse a” se usan indistintamente.

5 El término “o” tal como se usa en el presente documento debe entenderse que significa “y/o”, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

10 Se observará que la estructura de algunos de los compuestos de la solicitud incluye átomos de carbono asimétricos (quirales). Por consiguiente, ha de entenderse que los isómeros que surgen de tal simetría están incluidos en el presente documento, a menos que se indique lo contrario. Tales isómeros pueden obtenerse en forma sustancialmente pura mediante técnicas de separación clásicas y mediante síntesis controlada de manera estereomérica. Los compuestos de esta solicitud pueden existir en forma estereoisomérica, por tanto pueden producirse como estereoisómeros individuales o como mezclas.

15 El término “isomería” significa compuestos que tienen fórmulas estructurales idénticas pero que difieren en la naturaleza o la secuencia de enlaces de sus átomos o en la disposición de sus átomos en el espacio. Los isómeros que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio se denominan “estereoisómeros”. Los estereoisómeros que no son imágenes especulares uno de otro se denominan “diastereoisómeros” y estereoisómeros que son imágenes especulares no superponibles se denominan “enantiómeros”, o a veces isómeros ópticos. Un átomo de carbono unido a cuatro sustituyentes no idénticos se denomina “centro quiral”.

20 El término “isómero quiral” significa un compuesto con al menos un centro quiral. Tiene dos formas enantioméricas de quiralidad opuesta y pueden existir o bien como enantiómero individual o como mezcla de enantiómeros. Una mezcla que contiene cantidades iguales de formas enantioméricas individuales de quiralidad opuesta se denomina “mezcla racémica”. Un compuesto que tiene más de un centro quiral tiene  $2^{n-1}$  pares enantioméricos, en el n es el número de centros quirales. Los compuestos con más de un centro quiral pueden existir o bien como diastereómero individual o como mezcla de diastereómeros, se denominan “mezcla diastereomérica”. Cuando está presente un centro quiral, un estereoisómero puede caracterizarse mediante la configuración absoluta (R o S) de ese centro quiral. Alternativamente, cuando están presentes uno o más centros quirales, un estereoisómero puede caracterizarse como (+) o (-). La configuración absoluta se refiere a la disposición en el espacio de los sustituyentes unidos al centro quiral. Los sustituyentes unidos al centro quiral en consideración se clasifican según la regla de secuencia de Cahn, Ingold y Prelog. (Cahn *et al.*, *Angew. Chem. Inter. Edit.* 1966, 5, 385; errata 511; Cahn *et al.*, *Angew. Chem.* 1966, 78, 413; Cahn y Ingold, *J Chem. Soc.* 1951 (Londres), 612; Cahn *et al.*, *Experientia* 1956, 12, 81; Cahn, J., *Chem. Educ.* 1964, 41, 116).

35 El término “isómeros geométricos” significa los diastereómeros que deben su existencia a la rotación impedida alrededor de dobles enlaces. Estas configuraciones se diferencian en sus nombres por los prefijos cis y trans, o Z y E, que indican que los grupos en el mismo lado o en lados opuestos del doble enlace en la molécula según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog. Además, las estructuras y otros compuestos comentados en esta solicitud incluyen todos isómeros atropícos de los mismos.

40 El término “isómeros atropícos” son un tipo de estereoisómero en el que los átomos de dos isómeros se disponen de diferente manera en el espacio. Los isómeros atropícos deben su existencia a una rotación restringida provocada por el impedimento de la rotación de grandes grupos alrededor de un enlace central. Tales isómeros atropícos normalmente existen como mezcla, sin embargo como resultado de avances recientes en las técnicas de cromatografía, ha sido posible separar mezclas de dos isómeros atropícos en casos seleccionados.

50 Los términos “polimorfos cristalinos” o “polimorfos” o “formas cristalinas” significan estructuras cristalinas en las que un compuesto (o sal o solvato del mismo) puede cristalizar en diferentes disposiciones de empaquetamiento cristalino, todas las cuales tienen la misma composición elemental. Diferentes formas cristalinas tienen habitualmente diferentes espectros de difracción de rayos X, espectros de infrarrojos, puntos de fusión, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El disolvente de recristalización, la tasa de cristalización, temperatura de almacenamiento, y otros factores pueden provocar que predomine una forma cristalina. Pueden prepararse polimorfos cristalinos de los compuestos mediante cristalización en diferentes condiciones.

55 El término “derivado” se refiere a compuestos que tienen una estructura de núcleo común, y están sustituidos con diversos grupos tal como se describe en el presente documento.

60 El término “bioisómero” se refiere a un compuesto que resulta del intercambio de átomo o de un grupo de átomos por otro átomo o grupo de átomos ampliamente similar. El objetivo de un reemplazo bioisostérico es crear un nuevo compuesto con propiedades biológicas similares al compuesto original. El reemplazo bioisostérico puede tener una base fisicoquímica o topológica. Los ejemplos de bioisómeros de ácido carboxílico incluyen acil-sulfonimidias, tetrazoles, sulfonatos y fosfonatos. Véase, por ejemplo, Patani y LaVoie, *Chem. Rev.* 96, 3147-3176 (1996).

65 Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” son términos reconocidos en la técnica, e incluyen modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, tales como inyecciones, e

incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intrapleural, intravascular, intrapericárdica, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaranoidea, intraespinal e intraesternal.

5 El término “tratar” está reconocido en la técnica e incluye inhibir una enfermedad, un trastorno o estado en un sujeto, por ejemplo, impedir su evolución; y aliviar la enfermedad, el trastorno o estado, por ejemplo, provocando la regresión de la enfermedad, el trastorno y/o estado. Tratar la enfermedad o el estado incluye mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o el estado particular, aunque no se vea afectada la fisiopatología subyacente.

10 El término “prevenir” está reconocido en la técnica e incluye detener que se produzca una enfermedad, un trastorno o estado en un sujeto, que puede estar predispuesto a la enfermedad, el trastorno y/o estado pero al que no se le ha diagnosticado aún que lo tenga. Prevenir un estado relacionado con una enfermedad incluye detener que se produzca un estado después de haberse diagnosticado la enfermedad pero antes de que se haya diagnosticado el estado.

15 El término “composición farmacéutica” se refiere a una formulación que contiene los compuestos dados a conocer en una forma adecuada para la administración a un sujeto. En una realización preferida, la composición farmacéutica está en una forma a granel o de dosificación unitaria. La forma de dosificación unitaria es cualquiera de una variedad de formas, incluyendo, por ejemplo, una cápsula, una bolsa i.v., un comprimido, una única bomba en un inhalador de aerosol o un vial. La cantidad de principio activo (por ejemplo, una formulación del compuesto dado a conocer o sales del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y se varía según el tratamiento particular implicado. Un experto en la técnica apreciará que a veces es necesario para realizar variaciones de rutina a la dosificación dependiendo de la edad y el estado del paciente. La dosificación también dependerá de la vía de administración. Una variedad de vías se contemplan, incluyendo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, y similares. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto descrito en el presente documento incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches, compuestos nebulizados e inhalantes. En una realización preferida, el compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que se requiera.

30 El término “dosis instantánea” se refiere a formulaciones de compuestos que son formas de dosificación de dispersión rápida.

35 El término “liberación inmediata” se define como una liberación de compuesto desde una forma de dosificación en un periodo de tiempo relativamente breve, en general de hasta aproximadamente 60 minutos. El término “liberación modificada” se define que incluye liberación retardada, liberación prolongada y liberación pulsada. El término “liberación pulsada” se define como una serie de liberaciones de fármaco desde una forma de dosificación. El término “liberación sostenida” o “liberación prolongada” se define como la liberación continua de un compuesto desde una forma de dosificación a lo largo de un periodo prolongado.

40 La expresión “farmacéuticamente aceptable” está reconocida en la técnica. En determinadas realizaciones, el término incluye composiciones, polímeros y otros materiales y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico fundado, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, en consonancia con una relación riesgo/beneficio razonable.

45 La expresión “portador farmacéuticamente aceptable” está reconocida en la técnica, e incluye, por ejemplo, materiales, composiciones o vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como una carga, un diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación líquido o sólido, implicados en portar o transportar cualquier composición objeto de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás componentes de una composición objeto y no ser nocivo para el paciente. En determinadas realizaciones, un portador farmacéuticamente aceptable no tiene pirógenos. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa, y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) goma tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de tampón fosfato; y (21) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas.

65 Los compuestos de la solicitud además pueden formar sales. Todas estas formas también se contemplan en el presente documento.

“Sal farmacéuticamente aceptable” de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que presenta la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Por ejemplo, la sal puede una sal de adición de ácido. Una realización de una sal de adición de ácido es una sal de clorhidrato. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir de un compuesto original que contiene un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. En general, tales sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o el ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de ambos; en general, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Se encuentran listas de sales en Remington’s Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (Mack Publishing Company, 1990).

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden prepararse como ésteres, por ejemplo ésteres farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, un grupo con función ácido carboxílico en un compuesto puede convertirse en su éster correspondiente, por ejemplo, un éster metílico, etílico, u otro. Además, un grupo alcohol en un compuesto puede convertirse en su éster correspondiente, por ejemplo, un acetato, propionato, u otro éster.

Los compuestos descritos en el presente documento también pueden prepararse como profármacos, por ejemplo profármacos farmacéuticamente aceptables. Los términos “pro-fármaco” y “profármaco” se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a cualquier compuesto, que libera un fármaco activo original *in vivo*. Puesto que se sabe que los profármacos potencian las numerosas cualidades deseables de los productos farmacéuticos (por ejemplo, solubilidad, biodisponibilidad, fabricación, etc.) los compuestos pueden administrarse en forma de profármaco. Por tanto, los compuestos descritos en el presente documento pretenden cubrir los profármacos de los compuestos reivindicados en el presente documento, métodos de administración de los mismos y composiciones que contienen los mismos. “Profármacos” pretenden incluir cualquier portador unido covalentemente que libere un fármaco activo original *in vivo* cuando se administra tal profármaco a un sujeto. Se preparan profármacos modificando grupos funcionales presentes en el compuesto de tal manera que las modificaciones se escinden, o bien en la manipulación de rutina o bien *in vivo*, para dar el compuesto original. Los profármacos incluyen compuestos en los que un grupo hidroxilo, amino, sulfhidrilo, carboxilo o carbonilo se une a cualquier grupo que pueda escindirse *in vivo* para formar un grupo hidroxilo libre, amino libre, sulfhidrilo libre, carboxilo libre o carbonilo libre, respectivamente.

Los ejemplos de profármacos incluyen, pero no se limitan a, ésteres (por ejemplo, acetato, dialquilaminoacetatos, formiatos, fosfatos, sulfatos y derivados de benzoato) y carbamatos (por ejemplo, N,N-dimetilaminocarbonilo) de grupos funcionales hidroxilo, grupos éster (por ejemplo, ésteres etílicos, ésteres de morfolinoetanol) de grupos funcionales carboxilo, derivados de N-acilo (por ejemplo, N-acetilo) bases de N-Mannich, bases de Schiff y enamionas de grupos funcionales amino, oximas, acetales, cetales y ésteres enólicos de grupos funcionales cetona y aldehído en compuestos de fórmula I, y similares, véase Bundegaard, H. “Design of Prodrugs” págs. 1-92, Elsevier, Nueva York-Oxford (1985).

El término “grupo protector” se refiere a una agrupación de átomos que cuando se une a un grupo reactivo en una molécula enmascara, reduce o impide esa reactividad. Pueden encontrarse ejemplos de grupos protectores en Green y Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, (Wiley, 2ª ed. 1991); Harrison y Harrison *et al.*, Compendio of Synthetic Organic Methods, Vols. 1-8 (John Wiley and Sons, 1971-1996); y Kocienski, Protecting Groups, (Verlag, 3ª ed. 2003).

El término “grupo protector de amina” pretende significar un grupo funcional que convierte un resto de amina, amida, u otro resto que contiene nitrógeno en un grupo químico diferente que es sustancialmente inerte frente a las condiciones de una reacción química particular. Los grupos protectores de amina se eliminan preferiblemente de manera fácil y selectiva con buen rendimiento en condiciones que no afectan a otros grupos funcionales de la molécula. Los ejemplos de los grupos protectores de amina incluyen, pero no se limitan a, formilo, acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, t-butiloxycarbonilo (Boc), p-metoxibencilo, metoximetilo, tosilo, trifluoroacetilo, trimetilsililo (TMS), fluorenil-metiloxycarbonilo, 2-trimetilsilil-etoxycarbonilo, 1-metil-1-(4-bifenilil)etoxycarbonilo, aliloxycarbonilo, benciloxycarbonilo (CBZ), 2-trimetilsilil-etanosulfonilo (SES), grupos tritilo y tritilo sustituido, 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc), nitro-veratriloxycarbonilo (NVOC), y similares. Los expertos en la técnica pueden identificar otros grupos protectores de amina adecuados.

Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen aquellos en los que el grupo hidroxilo o bien se acila o bien se alquila tal como bencil y tritil éteres así como alquil éteres, tetrahidropiranil éteres, trialkilsilil éteres y alil éteres.

Adicionalmente, las sales de los compuestos descritos en el presente documento, pueden existir en forma o bien hidratada o bien no hidratada (anhidra) o como solvatos con otras moléculas de disolvente. Los ejemplos no limitativos de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Los ejemplos no limitativos de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

El término “solvatos” significa formas de adición de disolvente que contienen cantidades o bien estequiométricas o bien no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen tendencia a atrapar una razón molar fija de

moléculas de disolvente en el estado sólido cristalino, formando de ese modo un solvato. Si el disolvente es agua el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Se forman hidratos mediante la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en la que el agua conserva su estado molecular como H<sub>2</sub>O, pudiendo formar tal combinación uno o más hidratos.

5 Los compuestos, las sales y los profármacos descritos en el presente documento pueden existir en varias formas tautoméricas, incluyendo la forma de enol e imina y la forma ceto y de enamina e isómeros geométricos y mezclas de los mismos. Los tautómeros existen como mezclas de un grupo tautomérico en disolución. En forma sólida, habitualmente predomina un tautómero. Aunque puede describirse un tautómero, la presente solicitud incluye todos  
10 los tautómeros de los presentes compuestos. Un tautómero es uno de dos o más isómeros estructurales que existen en equilibrio y se convierten fácilmente de una forma isomérica a la otra. Esta reacción da como resultado la migración formal de un átomo de hidrógeno acompañado de un cambio de dobles enlaces conjugados adyacentes. En disoluciones en las que es posible tautomerización, se alcanzará un equilibrio químico de los tautómeros. La razón exacta de los tautómeros depende de varios factores, incluyendo temperatura, disolvente y pH. El concepto de  
15 tautómeros que son interconvertibles mediante tautomerizaciones se denomina tautomería.

De los diversos tipos de tautomería que son posibles, dos se observan comúnmente. En la tautomería ceto-enólica se produce un cambio simultáneo de electrones y un átomo de hidrógeno.

20 Las tautomerizaciones pueden estar catalizadas por: Base: 1. desprotonación; 2. formación de un anión deslocalizado (por ejemplo, un enolato); 3. protonación en una posición diferente del anión; Ácido: 1. protonación; 2. formación de un catión deslocalizado; 3. desprotonación en una posición diferente adyacente al catión.

El término “análogo” se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro pero que difiere ligeramente en la composición (como en el reemplazo de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en presencia de un grupo funcional particular, o el reemplazo de un grupo funcional por otro grupo funcional). Por tanto, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en cuanto a la función y el aspecto, pero no en cuanto a la estructura o el origen con respecto al compuesto de referencia.

30 Un “paciente”, “sujeto” o “huésped” que va a tratarse mediante el método objeto puede significar o bien un ser humano o bien un animal no humano, tal como un mamífero, un pez, un ave, un reptil o un anfibio. Por tanto, el sujeto de los métodos dados a conocer en el presente documento pueden ser un ser humano, primate no humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, vaca, gato, cobaya o roedor. El término no indica una edad o un sexo particular. Por tanto, se pretende que estén cubiertos sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean de  
35 sexo masculino o femenino. En un aspecto, el sujeto es un mamífero. Un paciente se refiere a un sujeto aquejado de una enfermedad o un trastorno.

Los términos tratamiento “profiláctico” o “terapéutico” están reconocidos en la técnica e incluyen la administración al huésped de una o más de las composiciones objeto. Si se administra antes de la manifestación clínica del estado no deseado (por ejemplo, enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) entonces el tratamiento es profiláctico, es decir, protege al huésped contra el desarrollo del estado no deseado, mientras que si se administra después de la manifestación del estado no deseado, el tratamiento es terapéutico (es decir, pretende disminuir, mejorar o estabilizar el estado no deseado existente o los efectos secundarios del mismo).

45 Los términos “agente terapéutico”, “fármaco”, “medicamento” y “sustancia bioactiva” están reconocidos en la técnica e incluyen moléculas y otros agentes que son sustancias biológicas, fisiológicas o farmacológicamente activas que actúan localmente o de manera sistémica en un paciente o sujeto para tratar una enfermedad o un estado. Los términos incluyen sin limitación sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y profármacos. Tales agentes pueden ser ácidos, básicos o sales; pueden ser moléculas neutras, moléculas polares o complejos moleculares que  
50 pueden presentar enlaces de hidrógeno; pueden ser profármacos en forma de éteres, ésteres, amidas y similares que se activan biológicamente cuando se administran a un paciente o sujeto.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad farmacéuticamente eficaz” es un término reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el término se refiere a una cantidad de un agente terapéutico que produce  
55 cierto efecto deseado a una relación riesgo/beneficio razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. En determinadas realizaciones, el término se refiere a aquella cantidad necesaria o suficiente para eliminar, reducir o mantener un objetivo de un régimen terapéutico particular. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o el estado que esté tratándose, los constructos dirigidos particulares que se administren, la talla del sujeto o la intensidad de la enfermedad o el estado. Un experto habitual en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un compuesto particular sin requerir excesiva experimentación. En  
60 determinadas realizaciones, es probable que una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico para su uso *in vivo* use dependa de varios factores, incluyendo: la tasa de liberación de un agente desde una matriz de polímero, lo que dependerá en parte de las características químicas y físicas del polímero; la identidad del agente; el modo y método de administración; y cualquier otro material incorporado en la matriz de polímero además del agente.

65 El término “DE50” está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, DE50 significa la dosis de un

fármaco, que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo, o alternativamente, la dosis, que produce una respuesta predeterminada en el 50% de las preparaciones o los sujetos de prueba. El término "DL50" está reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, DL50 significa la dosis de un fármaco, que es letal en el 50% de los sujetos de prueba. El término "índice terapéutico" es un término reconocido en la técnica, que se refiere al índice terapéutico de un fármaco, definido como DL50/DE50.

Los términos "CI50" o "concentración inhibidora a la mitad del máximo" pretenden referirse a la concentración de una sustancia (por ejemplo, un compuesto o un fármaco) que se requiere para el 50% de inhibición de un proceso biológico, o componente de un proceso, incluyendo una proteína, subunidad, un orgánulo, una ribonucleoproteína, etc.

Con respecto a cualquier compuesto químico, la presente solicitud pretende incluir todos los isótopos de átomos que aparecen en los presentes compuestos. Los isótopos incluyen aquellos átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números másicos. A modo de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio, y los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

Cuando se muestra que un enlace a un sustituyente cruza un enlace que conecta dos átomos en un anillo, entonces tal sustituyente puede unirse a cualquier átomo en el anillo. Cuando un sustituyente se enumera sin indicar el átomo mediante el que se une tal sustituyente a la parte restante del compuesto de una fórmula dada, entonces tal sustituyente puede unirse mediante cualquier átomo en tal sustituyente. Son admisibles combinaciones de sustituyentes y/o variables, pero solo si tales combinaciones dan como resultado compuestos estables.

Cuando un átomo o un resto químico va seguido por un intervalo numérico en subíndice (por ejemplo, C<sub>1-6</sub>), pretende englobar cada número dentro del intervalo así como todos los intervalos intermedios. Por ejemplo, "alquilo C<sub>1-6</sub>" pretende incluir grupos alquilo con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 3-6, 3-5, 3-4, 4-6, 4-5 y 5-6 carbonos.

El término "alquilo" pretende incluir tanto grupos ramificados (por ejemplo, isopropilo, terc-butilo, isobutilo), como de cadena lineal por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo) y cicloalquilo (por ejemplo, alicíclico) (por ejemplo, ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. Tales grupos hidrocarbonados alifáticos tienen un número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C<sub>1-6</sub> pretende incluir grupos alquilo C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>. Tal como se usa en el presente documento, "alquilo inferior" se refiere a grupos alquilo que tienen desde 1 hasta 6 átomos de carbono en la estructura principal de la cadena carbonada. "Alquilo" incluye además grupos alquilo que tienen átomos de oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo que reemplazan uno o más átomos de carbono de la estructura principal hidrocarbonada. En determinadas realizaciones, un alquilo de cadena lineal o de cadena ramificada tiene seis o menos átomos de carbono en su estructura principal (por ejemplo, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> para cadena lineal, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> para cadena ramificada), por ejemplo cuatro o menos. Asimismo, determinados cicloalquilos tienen desde tres hasta ocho átomos de carbono en su estructura de anillo, tal como cinco o seis carbonos en la estructura de anillo.

El término "alquilos sustituidos" se refiere a restos alquilo que tienen sustituyentes que reemplazan un hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal hidrocarbonada. Tales sustituyentes pueden incluir, por ejemplo, alquilo, alqueno, alquino, alquino, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcocarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, alcocarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcóxido, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarbonilato, sulfatos, alquilsulfonilo, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los cicloalquilos pueden estar sustituidos además, por ejemplo, con los sustituyentes descritos anteriormente. Un resto "alquilarilo" o "aralquilo" es un alquilo sustituido con un arilo (por ejemplo, fenilmetilo (bencilo)). Si no se indica de otro modo, los términos "alquilo" y "alquilo inferior" incluyen alquilo o alquilo inferior lineal, ramificado, cíclico, no sustituido, sustituido y/o que contiene heteroátomo, respectivamente.

El término "alqueno" se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal, ramificado o cíclico de 2 a aproximadamente 24 átomos de carbono que contiene al menos un doble enlace, tal como etenilo, n-propenilo, isopropenilo, n-butenilo, isobutenilo, octenilo, decenilo, tetradecenilo, hexadecenilo, eicosenilo, tetracosenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclooctenilo y similares. En general, aunque de nuevo no necesariamente, los grupos alqueno pueden contener de 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono, y más particularmente de 2 a 12 átomos de carbono. El término "alqueno inferior" se refiere a un grupo alqueno de 2 a 6 átomos de carbono, y el término específico "cicloalqueno" pretende ser un grupo alqueno cíclico, preferiblemente que tiene de 5 a 8 átomos de carbono. El término "alqueno sustituido" se refiere a alqueno sustituido con uno o más grupos sustituyentes, y los términos "alqueno que contiene heteroátomo" y "heteroalqueno" se refieren a alqueno o heterocicloalqueno (por ejemplo, heterociclohexenilo) en los que al menos un átomo de carbono se reemplaza por un heteroátomo. Si no se indica de otro modo, los términos "alqueno" y "alqueno inferior" incluyen alqueno y alqueno inferior lineales, ramificados, cíclicos, no sustituidos, sustituidos y/o que contienen heteroátomo, respectivamente.

El término "alquinilo" se refiere a un grupo hidrocarbonado lineal o ramificado de 2 a 24 átomos de carbono que contiene al menos un triple enlace, tal como etinilo, n-propinilo, y similares. En general, aunque de nuevo no necesariamente, los grupos alquinilo pueden contener de 2 a aproximadamente 18 átomos de carbono, y más particularmente pueden contener de 2 a 12 átomos de carbono. El término "alquinilo inferior" pretende ser un grupo alquinilo de 2 a 6 átomos de carbono. El término "alquinilo sustituido" se refiere a alquinilo sustituido con uno o más grupos sustituyentes, y los términos "alquinilo que contiene heteroátomo" y "heteroalquinilo" se refieren a alquinilo en el que al menos un átomo de carbono se reemplaza por un heteroátomo. Si no se indica de otro modo, los términos "alquinilo" y "alquinilo inferior" incluyen alquinilo y alquinilo inferior lineales, ramificados, no sustituidos, sustituidos y/o que contienen heteroátomo, respectivamente.

Los términos "alquilo", "alquenilo" y "alquinilo" pretenden incluir restos que son dirradicales, es decir, que tienen dos puntos de unión. Un ejemplo no limitativo de tal resto alquilo que es un dirradical es  $--CH_2CH_2--$ , es decir, un grupo alquilo  $C_2$  que se une covalentemente mediante cada átomo de carbono terminal a la parte restante de la molécula.

El término "alcoxilo" se refiere a un grupo alquilo unido a través de una única unión éter terminal; es decir, un grupo "alcoxilo" puede representarse como  $--O-$ alquilo en el que alquilo es tal como se definió anteriormente. Un grupo "alcoxilo inferior" pretende ser un grupo alcoxilo que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, e incluye, por ejemplo, metoxilo, etoxilo, n-propoxilo, isopropoxilo, t-butiloxilo, etc. Sustituyentes preferidos identificados como "alcoxilo  $C_1-C_6$ " o "alcoxilo inferior" en el presente documento contienen de 1 a 3 átomos de carbono, y tales sustituyentes particularmente preferidos contienen 1 ó 2 átomos de carbono (es decir, metoxilo y etoxilo).

El término "arilo" se refiere a un sustituyente aromático que contiene un único anillo aromático o múltiples anillos aromáticos que se condensan entre sí, se unen directamente o se unen indirectamente (de tal manera que los diferentes anillos aromáticos se unen a un grupo común tal como un resto metileno o etileno). Los grupos arilo pueden contener de 5 a 20 átomos de carbono, y grupos arilo particularmente preferidos pueden contener de 5 a 14 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos arilo incluyen benceno, fenilo, pirrol, furano, tiofeno, tiazol, isotiazol, imidazol, triazol, tetrazol, pirazol, oxazol, isooxazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Además, el término "arilo" incluye grupos arilo multicíclicos, por ejemplo, tricíclicos, bicíclicos, por ejemplo, naftaleno, benzoxazol, benzodioxazol, benzotiazol, benzimidazol, benzotiofeno, metilendioxifenilo, quinolina, isoquinolina, naftridina, indol, benzofurano, purina, benzofurano, desazapurina o indolizina. Aquellos grupos arilo que tienen heteroátomos en la estructura de anillo también pueden denominarse "heterociclos de arilo", "heterociclos", "heteroarilos" o "compuestos heteroaromáticos". El anillo aromático puede estar sustituido en una o más posiciones de anillo con tales sustituyentes tal como se describió anteriormente, como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alcoxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alquilaminocarbonilo, aralquilaminocarbonilo, alquenilaminocarbonilo, alquilcarbonilo, arilcarbonilo, aralquilcarbonilo, alquenilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, fosfato, fosfonato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y ureido), amidino, imino, sulfhidrilo, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, alquilsulfino, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, alquilarilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos arilo también pueden condensarse o unirse en puente con anillos alicíclicos o heterocíclicos, que no son aromáticos de modo que se forme un sistema multicíclico (por ejemplo, tetralina, metilendioxifenilo). Si no se indica de otro modo, el término "arilo" incluye sustituyentes aromático no sustituidos, sustituidos y/o que contienen heteroátomo.

El término "alcarilo" se refiere a un grupo arilo con un sustituyente alquilo, y el término "aralquilo" se refiere a un grupo alquilo con un sustituyente arilo, en los que "arilo" y "alquilo" son tal como se definieron anteriormente. Los grupos aralquilo a modo de ejemplo contienen de 6 a 24 átomos de carbono, y grupos aralquilo particularmente preferidos contienen de 6 a 16 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos aralquilo incluyen, sin limitación, bencilo, 2-feniletilo, 3-fenilpropilo, 4-fenilbutilo, 5-fenilpentilo, 4-fenilciclohexilo, 4-bencilciclohexilo, 4-fenilciclohexilmetilo, 4-bencilciclohexilmetilo, y similares. Los grupos alcarilo incluyen, por ejemplo, p-metilfenilo, 2,4-dimetilfenilo, p-ciclohexilfenilo, 2,7-dimetilnaftilo, 7-ciclooctilnaftilo, 3-etil-ciclopenta-1,4-dieno, y similares.

Los términos "heterociclilo" o "grupo heterocíclico" incluyen estructuras de anillo cerradas, por ejemplo, anillos de 3 a 10 miembros, o de 4 a 7, que incluyen uno o más heteroátomos. "Heteroátomo" incluye átomos de cualquier elemento distinto de carbono o hidrógeno. Los ejemplos de heteroátomos incluyen nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo.

Los grupos heterociclilo pueden ser saturados o insaturados e incluyen pirrolidina, oxolano, tiolano, piperidina, piperazina, morfolina, lactonas, lactamas, tales como azetidionas y pirrolidinonas, sultamas y sultonas. Los grupos heterocíclicos tales como pirrol y furano pueden tener carácter aromático. Estos incluyen estructuras de anillo condensadas, tales como quinolina e isoquinolina. Otros ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen piridina y purina. El anillo heterocíclico puede estar sustituido en una o más posiciones con tales sustituyentes tal como se describió anteriormente, como por ejemplo, halógeno, hidroxilo, alquilcarboniloxilo, arilcarboniloxilo, alcoxicarboniloxilo, ariloxicarboniloxilo, carboxilato, alquilcarbonilo, alcoxicarbonilo, aminocarbonilo, alquiltiocarbonilo, alcoxilo, fosfato, fosfonato, fosfinato, ciano, amino (incluyendo alquilamino, dialquilamino, arilamino, diarilamino y alquilarilamino), acilamino (incluyendo alquilcarbonilamino, arilcarbonilamino, carbamoilo y

ureido), amidino, imino, sulfhidrido, alquiltio, ariltio, tiocarboxilato, sulfatos, sulfonato, sulfamoilo, sulfonamido, nitro, trifluorometilo, ciano, azido, heterociclilo, o un resto aromático o heteroaromático. Los grupos heterocíclicos también pueden estar sustituidos en uno o más átomos constituyentes con, por ejemplo, un alquilo inferior, un alquenilo inferior, un alcóxilo inferior, un alquiltio inferior, un alquilamino inferior, un alquilcarboxilo inferior, un nitro, un hidroxilo,  $-CF_3$  o  $-CN$ , o similar.

El término “halo” o “halógeno” se refiere a fluoro, cloro, bromo y yodo. “Contraión” se usa para representar una especie pequeña cargada negativamente tal como fluoruro, cloruro, bromuro, ioduro, hidróxido, acetato y sulfato.

Los términos “sustituido” como en “alquilo sustituido”, “arilo sustituido”, y similares, tal como se aludió en algunas de las definiciones anteriores pretenden que en el resto alquilo, arilo u otro, al menos un átomo de hidrógeno unido a un átomo de carbono (u otro) se reemplace por uno o más sustituyentes distintos de hidrógeno. Los ejemplos de tales sustituyentes incluyen, sin limitación: grupos funcionales tales como halo, hidroxilo, sililo, sulfhidrido, alcóxilo  $C_1-C_{24}$ , alqueniloxilo  $C_2-C_{24}$ , alquiloxilo  $C_2-C_{24}$ , ariloxilo  $C_5-C_{20}$ , acilo (incluyendo alquilcarbonilo  $C_2-C_{24}$  ( $-CO$ -alquilo) y arilcarbonilo  $C_6-C_{20}$  ( $-CO$ -arilo)), aciloxilo ( $-O$ -acilo), alcóxicarbonilo  $C_2-C_{24}$  ( $-(CO)$ - $O$ -alquilo), ariloxicarbonilo  $C_6-C_{20}$  ( $-(CO)$ - $O$ -arilo), alquilcarbonato  $C_2-C_{24}$  ( $-O$ - $(CO)$ - $O$ -alquilo), arilcarbonato  $C_6-C_{20}$  ( $-O$ - $(CO)$ - $O$ -arilo), carboxilo ( $-COOH$ ), carboxilato ( $-COO-$ ), carbamoilo ( $-(CO)$ - $NH_2$ ), carbamoilo sustituido con mono-(alquilo  $C_1-C_{24}$ ) ( $-(CO)$ - $NH$ (alquilo  $C_1-C_{24}$ )), carbamoilo sustituido con di-(alquilo  $C_1-C_4$ ) ( $-(CO)$ - $N$ (alquilo  $C_1-C_{24}$ ) $_2$ ), arilcarbamoilo monosustituido ( $-(CO)$ - $NH$ -arilo), tiocarbamilo ( $-(CS)$ - $NH_2$ ), carbamido ( $-NH$ - $(CO)$ - $NH_2$ ), ciano( $-CN$ ), isociano ( $-N+C-$ ), cianato ( $-O$ - $CN$ ), isocianato ( $-ON+C-$ ), isotiocianato ( $-S$ - $CN$ ), azido ( $-N=N^+=N$ ), formilo ( $-(CO)$ - $H$ ), tioformilo ( $-(CS)$ - $H$ ), amino ( $-NH_2$ ), amino sustituido con mono y di-(alquilo  $C_1-C_{24}$ ), amino sustituido con mono y di-(arilo  $C_5-C_{20}$ ),  $C_2-C_{24}$  alquilamido ( $-NH$ - $(CO)$ -alquilo), arilamido  $C_6-C_{20}$  ( $-NH$ - $(CO)$ -arilo), imino ( $-CR=NH$  en el que  $R$  = hidrógeno, alquilo  $C_1-C_{24}$ , arilo  $C_5-C_{20}$ , alcarilo  $C_6-C_{24}$ , aralquilo  $C_6-C_{24}$ , etc.), alquilimino ( $-CR=N$ (alquilo), en el que  $R$  = hidrógeno, alquilo, arilo, alcarilo, etc.), arilimino ( $-CR=N$ (arilo), en el que  $R$  = hidrógeno, alquilo, arilo, alcarilo, etc.), nitro ( $-NO_2$ ) nitroso ( $-NO$ ), sulfo ( $-SO_2-OH$ ), sulfonato ( $-SO_2-O-$ ), alquilsulfanilo  $C_1-C_{24}$  ( $-S$ -alquilo; también denominado “alquiltio”), arilsulfanilo ( $-S$ -arilo; también denominado “ariltio”), alquilsulfinilo  $C_1-C_{24}$  ( $-(SO)$ -alquilo), arilsulfinilo  $C_5-C_{20}$  ( $-(SO)$ -arilo), alquilsulfonilo  $C_1-C_{24}$  ( $-SO_2$ -alquilo), arilsulfonilo  $C_5-C_{20}$  ( $-SO_2$ -arilo), fosfono ( $-P(O)(OH)_2$ ), fosfonato ( $-P(O)(O-)_2$ ), fosfinato ( $-P(O)(O-)$ ), fosfo ( $-PO_2$ ) y fosfino ( $-PH_2$ ); y los restos hidrocarbilo alquilo  $C_1-C_{24}$ , alquenilo  $C_2-C_{24}$ , alquilino  $C_2-C_{24}$ , arilo  $C_5-C_{20}$ ,  $C_6-$  alcarilo  $C_{24}$  y aralquilo  $C_6-C_{24}$ .

Además, los grupos funcionales mencionados anteriormente pueden estar además, si un grupo particular lo permite, sustituidos con uno o más grupos funcionales adicionales o con uno o más restos hidrocarbilo tales como los enumerados antes específicamente. De manera análoga, los restos hidrocarbilo mencionados anteriormente pueden estar sustituidos además con uno o más grupos funcionales o restos hidrocarbilo adicionales tales como los enumerados específicamente.

Cuando el término “sustituido” aparece previo a una lista de posibles grupos sustituidos, se pretende que el término se aplique a cada miembro de ese grupo. Por ejemplo, la expresión “alquilo, alquenilo y arilo sustituido” ha de interpretarse como “alquilo sustituido, alquenilo sustituido y arilo sustituido”. De manera análoga, cuando el término “que contiene heteroátomo” aparece previo a una lista de posibles grupos que contienen heteroátomo, se pretende que el término se aplique a cada miembro de ese grupo. Por ejemplo, la expresión “alquilo, alquenilo y arilo que contienen heteroátomo” ha de interpretarse como “alquilo, alquenilo sustituido y arilo sustituido que contienen heteroátomo”.

“Opcional” o “opcionalmente” significa que la circunstancia descrita posteriormente puede producirse o no, de modo que la descripción incluye casos en los que se produce la circunstancia y casos en los que no. Por ejemplo, la expresión “opcionalmente sustituido” significa que un sustituyente distinto de hidrógeno puede estar presente o no en un átomo dado, y, por tanto, la descripción incluye estructuras en las que está presente un sustituyente distinto de hidrógeno y estructuras en las que no está presente un sustituyente distinto de hidrógeno.

Los términos “compuesto estable” y “estructura estable” pretenden indicar un compuesto que es suficientemente robusta como para sobrevivir al aislamiento, y según sea apropiado, a la purificación desde una mezcla de reacción, y a la formulación para dar un agente terapéutico eficaz.

El término “compuesto libre” se usa en el presente documento para describir un compuesto en el estado no unido.

En la totalidad de la descripción, en la que se describen composiciones como que tienen, que incluyen o que comprenden, componentes específicos, se contempla que las composiciones también consistan esencialmente en, o consistan en, los componentes citados. De manera similar, cuando se describen métodos o procedimientos como que tienen, que incluyen o que comprenden etapas de procedimiento específicas, los procedimientos también consisten esencialmente en, o consisten en, las etapas de procesamiento citadas. Además, debe entenderse que el orden de etapas u orden para realizar determinadas acciones es inmaterial siempre que las composiciones y los métodos descritos en el presente documento sigan siendo operativos. Además, dos o más etapas o acciones pueden llevarse a cabo simultáneamente.

El término “molécula pequeña” es un término reconocido en la técnica. En determinadas realizaciones, este término

se refiere a una molécula, que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 uma, o menos de aproximadamente 1000 uma, e incluso menos de aproximadamente 500 uma.

5 Todos los porcentajes y razones usados en el presente documento, a menos que se indiquen de otro modo, son en peso.

El término "neoplasia" se refiere a cualquier masa anómala de células o tejido como resultado de neoplasia. La neoplasia puede ser benigna, potencialmente maligna (precancerosa) o maligna (cancerosa). Un adenoma es un ejemplo de una neoplasia.

10 Los términos "adenoma", "adenoma de colon" y "pólipo" se usan en el presente documento para describir cualquier neoplasia precancerosa de colon.

15 El término "colon" tal como se usa en el presente documento pretende englobar el color derecho (incluyendo el ciego), el colon transverso, el colon izquierdo y el recto.

Los términos "cáncer colorrectal" y "cáncer de colon" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier neoplasia cancerosa de colon (incluyendo el recto, tal como se definió anteriormente).

20 Los términos "expresión génica" o "expresión de proteína" incluyen cualquier información referente a la cantidad de transcrito génico o proteína presente en una muestra, así como información sobre la tasa a la que se producen esos genes o proteínas o se acumulan o se degradan (por ejemplo, datos de genes indicadores, datos de experimentos de precipitación nuclear, datos de captación de impulsos, etc.). Determinadas clases de datos podrían considerarse relacionados con la expresión de tanto de genes como de proteínas. Por ejemplo, los niveles de proteína en una  
 25 célula reflejan el nivel de proteína así como el nivel de transcripción, y tales datos pretenden incluirse mediante la expresión "información de expresión de genes o proteínas". Tal información puede proporcionarse en forma de cantidades por célula, cantidades relativas a un gen o una proteína de control, en medidas sin unidades, etc.; el término "información" no ha de limitarse a ningún medio particular de representación y pretende significar cualquier representación que proporcione información relevante. El término "niveles de expresión" se refiere a una cantidad  
 30 reflejada en o derivable de los datos de expresión de genes o proteínas, ya se refieran los datos a tasas de acumulación de transcrito génico o de acumulación de proteína o de síntesis de proteína, etc.

35 Los términos "sano" y "normal" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un sujeto o célula o tejido particular que carece (al menos hasta el límite de detección) de una enfermedad o un estado.

El término "ácido nucleico" se refiere a polinucleótidos tales como ácido desoxirribonucleico (ADN), y, cuando sea apropiado, ácido ribonucleico (ARN). El término también incluye análogos de cualquiera de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos, y tal como puede aplicarse a la realización que está describiéndose, polinucleótidos monocatenarios (sentido o antisentido) y bicatenarios. En algunas realizaciones, "ácido nucleico" se  
 40 refiere a ácidos nucleicos inhibidores. Algunas categorías de compuestos de ácido nucleico inhibidores incluyen ácidos nucleicos antisentido, constructos de iARN y constructos de ácidos nucleicos catalíticos. Tales categorías de ácidos nucleicos se conocen bien en la técnica.

45 Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a compuestos y métodos de modulación de la actividad de 15-PGDH, modulación de los niveles de prostaglandinas tisulares y/o el tratamiento de enfermedades, trastornos o estados en los que se desea modular la actividad de 15-PGDH y/o los niveles de prostaglandinas. "Inhibidores", "activadores" y "moduladores" de la expresión de 15-PGDH o de la actividad de 15-PGDH se usan para referirse a moléculas inhibitoras, activadoras o moduladoras, respectivamente, identificadas usando ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la expresión de 15-PGDH o actividad de 15-PGDH, por ejemplo, ligandos, agonistas, antagonistas, y sus homólogos y miméticos. El término "modulador" incluye inhibidores y activadores. Los  
 50 inhibidores son agentes que, por ejemplo, inhiben la expresión de 15-PGDH o se unen a, bloquean parcial o totalmente la estimulación, disminuyen, impiden, retardan la activación, inactivan, desensibilizan o regulan por disminución la actividad de 15-PGDH, por ejemplo, antagonistas. Los activadores son agentes que, por ejemplo, inducen o activan la expresión de una 15-PGDH o se unen a, estimulan, estabilizan, aumentan, abren, activan,  
 55 facilitan o potenciar la activación, sensibilizan o regulan por incremento la actividad de 15-PGDH, por ejemplo, agonistas. Los moduladores incluyen ligandos que se producen de manera natural y sintéticos, moléculas químicas pequeñas, y similares.

60 Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden proporcionar un método farmacológico para elevar los niveles de prostaglandinas tisulares. Las actividades conocidas de las prostaglandinas incluyen fomentar el crecimiento del cabello, fomentar la pigmentación de la piel y fomentar el oscurecimiento de la piel o la aparición de bronceado de la piel. Las actividades conocidas de las prostaglandinas también incluyen mejorar la hipertensión de la arteria pulmonar. Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento también pueden utilizarse para aumentar los números de células madre tisulares con fines que incluirán aumentar la  
 65 resistencia a daño tisular por radiación, aumentar la resistencia a exposiciones ambientales a radiación, aumentar los números de células madre para aumentar el estado físico de médula ósea u otros tipos de trasplante (o bien a

través la exposición *in vivo* a los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento para aumentar los números de células madre antes de la extracción de un tejido trasplantado, o bien a través de exposición *ex vivo* de un tejido extraído antes del trasplante en un huésped receptor). Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento también pueden utilizarse con fines que incluirán fomentar la regeneración del hígado, incluyendo regeneración del hígado después de resección hepática y regeneración del hígado después de ataques tóxicos, que por ejemplo pueden ser el ataque tóxico de una sobredosis de paracetamol. También se sabe que la señalización de prostaglandinas fomenta la cicatrización de heridas, protege el estómago frente a ulceración, y fomenta la curación de úlceras de estómago e intestino. Adicionalmente, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden fomentar la actividad de queratinocitos humanos en la "curación" de arañazos a través de cultivos de células de tipo queratinocito. Así, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden utilizarse también para curar úlceras de otros tejidos, incluyendo, pero sin limitarse a la piel, e incluyendo pero sin limitarse a úlceras diabéticas. Además, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden utilizarse para el tratamiento de disfunción eréctil.

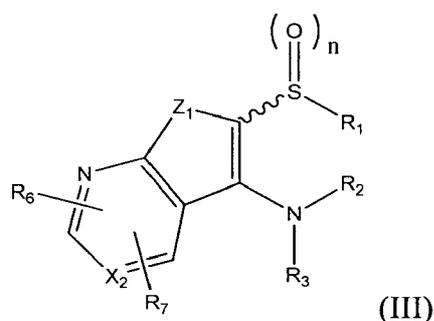
Los activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden aumentar los niveles de proteína 15-PGDH en células y aumentar los niveles de actividad enzimática de 15-PGDH en células. El aumento de los niveles de 15-PGDH tisulares puede disminuir los niveles de prostaglandinas tisulares. Las actividades asociadas con compuestos que disminuyen las prostaglandinas tisulares incluyen reducir el desarrollo de tumores humanos, particularmente reducir el desarrollo de tumores de colon humanos. Por consiguiente, los compuestos que aumentan la actividad de 15-PGDH tisular pueden disminuir el riesgo de desarrollo de tumores de colon y otros. Los compuestos que aumentan la actividad de 15-PGDH también pueden usarse para tratar tumores de colon y otros. Los compuestos que aumentan la 15-PGDH pueden usarse para tratar o para prevenir tumores cuando se administran individualmente, o cuando se administran en combinación con inhibidores de las enzimas ciclooxigenasa-1 y/o ciclooxigenasa-2, o cuando se administran en combinación con otros agentes terapéuticos.

Los inhibidores y activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden identificarse usando ensayos en los que se aplican supuestos compuestos moduladores a células que expresan 15-PGDH y entonces se determinan los efectos funcionales sobre la actividad de 15-PGDH. Se comparan muestras o ensayos que comprenden 15-PGDH que se tratan con un posible activador, inhibidor o modulador se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar la extensión del efecto. A las muestras de control (sin tratar con moduladores) se les asigna un valor relativo de actividad de 15-PGDH del 100%. Se logra la inhibición de 15-PGDH cuando el valor de actividad de 15-PGDH con relación al control es de aproximadamente el 80%, opcionalmente el 50% o el 25%, el 10%, el 5% o el 1%. Se logra la activación de 15-PGDH cuando el valor de expresión o actividad de 15-PGDH con relación al control es del 105%, opcionalmente el 110%, opcionalmente el 125%, opcionalmente el 150%, opcionalmente el 200%, el 300%, el 400%, el 500% o el 1000-3000% o mayor.

Los agentes sometidos a prueba como moduladores de 15-PGDH pueden ser cualquier molécula o compuesto químico pequeño. Normalmente, los compuestos de prueba serán moléculas químicas pequeñas, productos naturales o péptidos. Los ensayos se diseñan para examinar grandes bibliotecas químicas mediante la automatización de las etapas de ensayo y proporcionar compuestos de cualquier fuente conveniente a los ensayos, que se ejecutan normalmente en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Los moduladores también incluyen agentes diseñados para aumentar el nivel de ARNm de 15-PGDH o el nivel de traducción de un ARNm.

El inhibidor de 15-PGDH puede inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH recombinante a: ic) una CI50 de menos de 1  $\mu$ M, o preferiblemente iic) a una CI50 de menos de 250 nM, o más preferiblemente iiic) a una CI50 de menos de 50 nM, o más preferiblemente iv) a una CI50 de menos de 5 nM.

El inhibidor de 15-PGDH incluye un compuesto que tiene la siguiente fórmula (III):



en la que:

n es 0-2;

R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1-8</sub>, que es lineal, ramificado o cíclico y que no está sustituido o está sustituido;

5 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior);

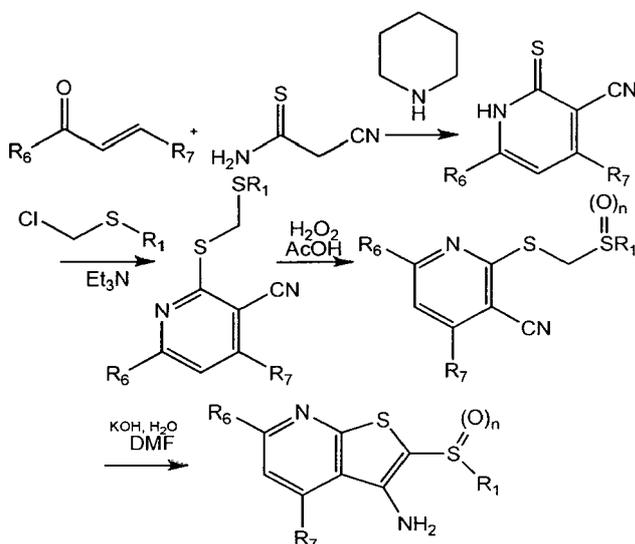
Z<sub>1</sub> es NR', O o S (en el que R' es H o un grupo alquilo inferior);

10 X<sub>2</sub> es N o C;

R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son opcionales y, si están presentes, son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior); arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido y un heterociclilo sustituido o no sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Los inhibidores de 15-PGDH que tienen la fórmula (III) pueden sintetizarse tal como se muestra:

20



25 Puede usarse cualquier disolvente de reacción en el procedimiento de preparación anterior siempre que no participe en la reacción. Por ejemplo, el disolvente de reacción incluye éteres tales como dietil éter, tetrahydrofurano y dioxano; hidrocarburos halogenados, tales como diclorometano y cloroformo; aminas tales como piridina, piperidina y trietilamina; alquilcetonas, tales como acetona, metiletilcetona y metilisobutilcetona; alcoholes, tales como metanol, etanol y propanol; disolvente polar no protónico, tal como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetilacetamida, acetonitrilo, dimetilsulfóxido y triamida del ácido hexametilfosfórico. Entre los disolventes orgánicos no reactivos que se usan habitualmente en la síntesis orgánica, son disolventes preferibles aquellos de los que puede retirarse el agua

30 generada en la reacción mediante una trampa de Dean-Stark. Los ejemplos de tales disolventes incluyen, pero no se limitan a benceno, tolueno, xileno y similares. El producto de reacción así obtenido puede aislarse y purificarse mediante condensación, extracción y similares, lo que se lleva a cabo habitualmente en el campo de la síntesis orgánica, si se desea, mediante cromatografía en columna de gel de sílice. Los enantiómeros individuales de inhibidores de PGDH que tienen la fórmula III pueden separarse mediante una HPLC preparativa usando columnas

35 de cromatografía que contienen fases estacionarias quirales.

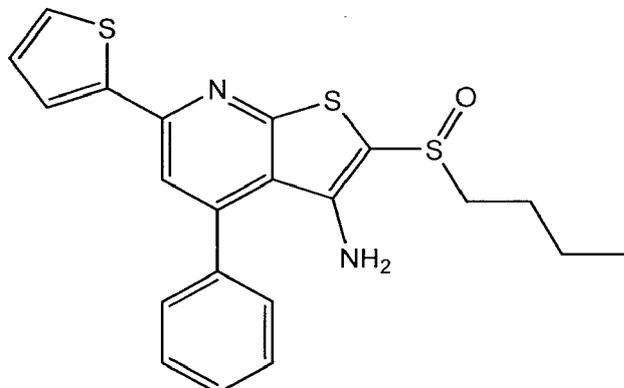
Además, realizaciones de esta solicitud incluyen cualquier modificación para el método de preparación de los inhibidores de 15-PGDH descritos anteriormente. A este respecto, cualquier producto intermedio que puede obtenerse a partir de cualquier etapa del método de preparación puede usarse como material de partida en las

40 demás etapas. Tal material de partida puede formarse *in situ* en determinadas condiciones de reacción. También pueden usarse reactivos de reacción en forma de sus sales o isómeros ópticos.

Dependiendo de las clases de los sustituyentes que van a usarse en la preparación de los inhibidores de 15-PGDH, y el producto intermedio y el método de preparación seleccionados, los inhibidores de 15-PGDH novedosos pueden

45 estar en forma de cualquier posible isómero tal como, isómeros geométricos (cis o trans) sustancialmente puros, isómeros ópticos (enantiómeros) y racematos.

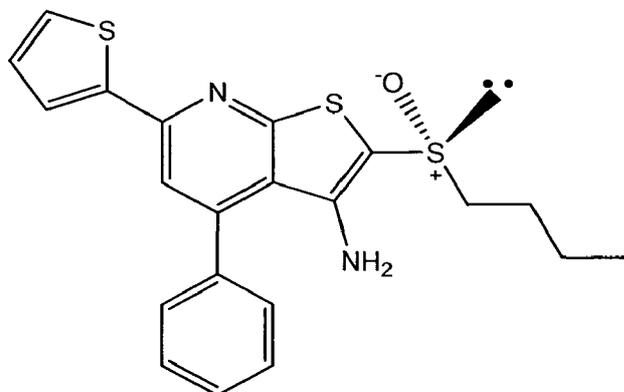
En algunas realizaciones, un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) puede incluir un compuesto con la siguiente fórmula:



5 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

Ventajosamente, el inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) se halló que: i) inhibe 15-PGDH recombinante a una concentración de 1 nM; ii) inhibe 15-PGDH en las líneas celulares a una concentración de 100 nM, iii) aumenta la producción de PGE<sub>2</sub> por las líneas celulares; iv) es químicamente estable en disoluciones acuosas en un amplio intervalo de pH; v) es químicamente estable cuando se incuba con extractos de hepatocitos, vi) es químicamente estable cuando se incuba con líneas celulares de hepatocitos; vii) muestra una semivida de 253 minutos cuando se inyecta por vía i.p. a ratones; y viii) no muestra toxicidad inmediata a lo largo de 24 horas cuando se inyecta por vía i.p. a ratones a 0,6 μmoles/por ratón y a 1,2 μmoles/por ratón y tampoco muestra toxicidad cuando se inyecta por vía i.p. a ratones a 0,3 μmoles/por ratón dos veces al día durante 21 días.

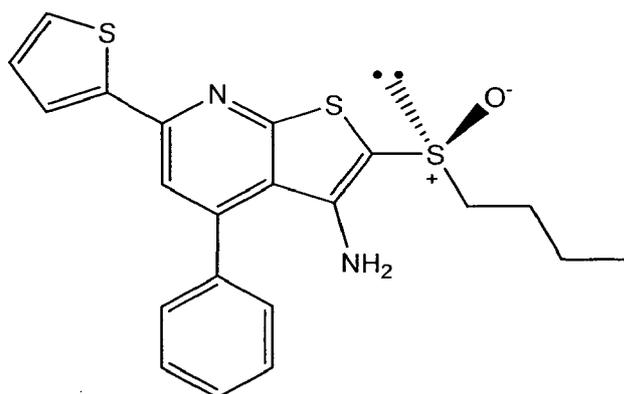
En otras realizaciones, un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) puede incluir un compuesto con la siguiente fórmula:



20 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

En todavía otras realizaciones, un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) puede incluir un compuesto con la siguiente fórmula:

25



y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

- 5 En otras realizaciones, el inhibidor de 15-PDHG puede comprender un isómero óptico (+) o (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III). En todavía otras realizaciones, el inhibidor de 15-PDHG puede comprender una mezcla al menos uno de un isómero óptico (+) o (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III). Por ejemplo, el inhibidor de 15-PGDH puede comprender una mezcla de: menos de aproximadamente el 50% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y más de aproximadamente el 50% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), menos de aproximadamente el 25% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y más de aproximadamente el 75% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), menos de aproximadamente el 10% en peso del isómero óptico (=) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y más de aproximadamente el 90% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), menos de aproximadamente el 1% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y más de aproximadamente el 99% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), más de aproximadamente el 50% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y menos de aproximadamente el 50% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), más de aproximadamente el 75% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y menos de aproximadamente el 25% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), más de aproximadamente el 90% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y menos de aproximadamente el 10% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III), o más de aproximadamente el 99% en peso del isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III) y menos de aproximadamente el 1% en peso del isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III).

En una realización todavía adicional, el inhibidor de 15-PDHG puede consistir esencialmente en o consistir en el isómero óptico (+) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III). En aún otra realización, el inhibidor de PDGH puede consistir esencialmente en o consistir en el isómero óptico (-) de un inhibidor de 15-PGDH que tiene la fórmula (III).

Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades que están asociadas con 15-PGDH y/o niveles reducidos de prostaglandinas y/o en las que se desea aumentar los niveles de prostaglandinas en el sujeto. Por ejemplo, tal como se comentó anteriormente, se sabe que las prostaglandinas desempeñan un papel importante en el crecimiento del cabello. Específicamente, se ha mostrado que el almacenamiento interno de diversos tipos ( $A_2$ ,  $F_{2a}$ ,  $E_2$ ) de prostaglandinas en los diversos compartimentos de los folículos pilosos o sus entornos cutáneos adyacentes es esencial en el mantenimiento y el aumento de la densidad capilar (Colombe L *et. al.*, 2007, Exp. Dermatol, 16(9), 762-9). Se ha notificado que 15-PGDH, que participa en la degradación de prostaglandinas, está presente en las papilas dérmicas de folículo piloso, inactiva las prostaglandinas, especialmente,  $PGF_{2a}$  y  $PGE_2$ , que provocan daño del cuero cabelludo y alopecia (Michelet J F *et. al.*, 2008, Exp. Dermatol, 17(10), 821-8). Por tanto, los compuestos descritos en el presente documento, que tienen una actividad supresora o inhibidora contra 15-PGDH que degrada prostaglandinas, pueden mejorar el daño del cuero cabelludo, prevenir la alopecia y fomentar el crecimiento del cabello y usarse en una composición farmacéutica para la prevención de alopecia y el fomento del crecimiento del cabello.

En otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse en una composición farmacéutica para fomentar y/o inducir y/o estimular la pigmentación de la piel y/o anejos cutáneos y/o como agente para prevenir y/o limitar la despigmentación y/o el blanqueo de la piel y/o anejos cutáneos, en particular como agente para prevenir y/o limitar la canicie.

En todavía otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse en una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedad cardiovascular y/o enfermedades de insuficiencia vascular, tales como enfermedad de Raynaud, enfermedad de Buerger, neuropatía diabética e

- hipertensión de la arteria pulmonar. Se ha mostrado que las prostaglandinas, incluyendo homólogos de prostaglandina producidos en el organismo, mantienen la acción apropiada de la pared de vaso sanguíneo, especialmente para contribuir a la vasodilatación para el flujo sanguíneo, prevenir la agregación plaquetaria y modular la proliferación de músculo liso que rodea las paredes de vaso sanguíneo (Yan. Cheng *et al.*, 2006, J. Clin. Invest). Además, la inhibición de la producción de prostaglandinas o la pérdida de su actividad provoca la degeneración del endotelio en las paredes de vaso sanguíneo, agregación plaquetaria y la disfunción del mecanismo celular en el músculo liso. Entre otras cosas, se mostró que la producción de prostaglandinas en vasos sanguíneos estaba disminuida en pacientes con hipertensión, incluyendo hipertensión de la arteria pulmonar.
- En otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse en una composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de enfermedades bucales y/o gastrointestinales, tales como úlceras bucales, enfermedad gingival, gastritis, colitis, colitis ulcerosa y úlceras gástricas. La gastritis y la úlcera gástrica, representativas de las enfermedades gastrointestinales, se definen como los estados en los que la membrana de mucosidad gastrointestinal se digiere por el ácido gástrico para formar una úlcera. En las paredes del estómago que consisten en general en mucosa, submucosa, capa muscular y serosa, la úlcera gástrica daña incluso la submucosa y capa muscular, mientras que la gastritis solo daña la mucosa. Aunque las tasas de morbilidad de gastritis y úlcera gástrica son relativamente altas, las causas de las mismas no se han aclarado aún. Hasta ahora, se sabe que están provocadas por un desequilibrio entre factores agresivos y factores defensivos, es decir, el aumento de factores agresivos tales como el aumento de la secreción pepsina o ácido gástrico, o la disminución de factores defensivos tales como déficit estructural o morfológico de la membrana de mucosidad gástrica, la disminución de mucosidad y la secreción de iones bicarbonato, la disminución de la producción de prostaglandinas, o similar.
- Los agentes terapéuticos disponibles actualmente para gastritis y úlcera gástrica comprenden diversos fármacos para reforzar los factores defensivos tales como un antiácido, que no afecta a la secreción de ácido gástrico pero neutraliza el ácido gástrico que ya se haya producido, un inhibidor de la secreción de ácido gástrico, un promotor de la secreción de prostaglandinas y un agente de recubrimiento para las paredes del estómago. Especialmente, se sabe que las prostaglandinas son esenciales en el mantenimiento del mecanismo para proteger y defender la membrana de mucosidad gástrica (Wallace J L., 2008, *Physiol Rev.*, 88(4), 1547-65, S. J. Konturek *et al.*, 2005, *Journal of Physiology and Pharmacology*, 56(5)). En vista de lo anterior, puesto que los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento muestran una actividad supresora o inhibidora contra 15-PGDH, que degrada las prostaglandinas que protegen la membrana de mucosidad gástrica, pueden ser eficaces para la prevención o el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, entre otras, gastritis y úlcera gástrica.
- En el riñón, las prostaglandinas modulan el flujo sanguíneo renal y pueden servir para regular la formación de orina mediante efectos tanto renovasculares como tubulares. En estudios clínicos, se ha usado PGE<sub>1</sub> para mejorar el aclaramiento de creatinina en pacientes con enfermedad renal crónica, para prevenir el rechazo de injerto y la toxicidad de ciclosporina en pacientes con trasplante renal, para reducir la tasa de excreción de albúmina en orina y los niveles de N-acetil-beta-D-glucosaminidasa en pacientes con nefropatía diabética (véase Porter, Am., 1989, J. Cardiol., 64: 22E-26E). Además, la patente estadounidense n.º 5.807.895 da a conocer un método de prevención de disfunción renal mediante administración intravenosa de prostaglandinas tales como PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>. Además, se ha notificado que las prostaglandinas sirven como vasodilatadores en el riñón, y, por tanto, la inhibición de la producción de prostaglandinas en el riñón da como resultado disfunción renal (Hao. C M, 2008, *Annu Rev Physiol*, 70, 357.aproximadamente.77).
- Por tanto, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento, que tienen una actividad supresora o inhibidora contra 15-PGDH que degrada prostaglandinas, pueden ser eficaces en la prevención o el tratamiento de enfermedad renales que están asociadas con disfunción renal.
- El término "disfunción renal" tal como se usa en el presente documento incluye manifestaciones tales como las siguientes: aclaramiento de creatinina menor de lo normal, aclaramiento de agua libre menor de lo normal, niveles de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina en sangre mayores de lo normal, actividad alterada de enzimas renales tales como gamma glutamil sintetasa, alanina fosfatidasa, N-acetil-beta-D-glucosaminidasa o beta-w-microglobulina; y aumento con respecto a los niveles normales de macroalbuminuria.
- También se ha mostrado que las prostaglandinas, incluyendo PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2a</sub>, estimulan la resorción ósea y formación ósea para aumentar el volumen y la resistencia del hueso (H. Kawaguchi *et al.*, *Clinical Orthop. Rel. Res.*, 313, 1995; J. Keller *et al.*, *Eur. Jr. Exp. Musculoskeletal Res.*, 1, 1992, 8692). Considerando que 15-PGDH inhibe las actividades de prostaglandinas mencionadas en lo anterior, la inhibición de 15-PGDH puede conducir al fomento de la resorción ósea y formación ósea que se inhiben por 15-PGDH. Por tanto, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden ser eficaces para el fomento de la resorción ósea y formación ósea mediante la inhibición de la actividad de 15-PGDH. Los inhibidores de 15-PGDH también pueden usarse para aumentar la densidad ósea, tratar osteoporosis, fomentar la consolidación de fracturas o fomentar la consolidación después de cirugía ósea o artroplastia.
- En aún otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden ser eficaces para tratar cánceres que expresan 15-PGDH. La inhibición de 15-PGDH puede inhibir el crecimiento, la proliferación

y metástasis de cánceres que expresan 15-PGDH.

En todavía otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden ser eficaces para la cicatrización de heridas. Entre las diversas prostaglandinas, se sabe que PGE<sub>2</sub> sirve como mediador para la cicatrización de heridas. Por tanto, cuando se produce una lesión en la piel por heridas o quemaduras, la inhibición de la actividad de 15-PGDH puede producir el efecto de tratamiento de las heridas o las quemaduras mediante PGE<sub>2</sub>.

Adicionalmente, tal como se comentó anteriormente, se ha mostrado que los niveles aumentados de prostaglandinas estimulan la señalización a través de la ruta de señalización de Wnt mediante actividad transcripcional mediada por beta-catenina aumentada. Se sabe que la señalización de Wnt es una ruta clave empleada por las células madre tisulares, y se ha mostrado en organismos modelo que el aumento de la señalización de PGE<sub>2</sub> aumenta los números de células madre hematopoyéticas. Así, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden utilizarse para aumentar los números de células madre tisulares con fines que incluirán aumentar la resistencia a daño tisular por radiación, aumentar la resistencia a exposiciones ambientales a radiación, aumentar los números de células madre para aumentar el estado físico de médula ósea u otros tipos de trasplante (o bien a través de la exposición *in vivo* a los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento para aumentar los números de células madre antes de la extracción de un tejido trasplantado, o bien a través de exposición *ex vivo* de un tejido extraído antes del trasplante en un huésped receptor, o bien a través de tratamiento del huésped receptor o bien antes, durante o bien después de la recepción del trasplante).

En algunas realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un donante de injerto de médula ósea o un donante de células madre hematopoyéticas para aumentar el estado físico de un injerto de médula ósea de donante o un injerto de células madre hematopoyéticas de donante.

En otras realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH también puede administrarse a la médula ósea de un sujeto para aumentar las células madre en el sujeto o para aumentar el estado físico de la médula como injerto de donante.

En todavía otras realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a una preparación de células madre hematopoyéticas, células madre hematopoyéticas de sangre periférica o células madre de cordón umbilical del sujeto para aumentar el estado físico de la preparación de células madre como injerto de donante o para disminuir el número de unidades de sangre de cordón umbilical requeridas para trasplante.

En aún otras realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto para paliar el rechazo de injertos de médula ósea, para potenciar el injerto de injertos de médula ósea, para potenciar el injerto de un injerto de células madre hematopoyéticas o un injerto de células madre de cordón umbilical, para potenciar el injerto de un injerto de células madre hematopoyéticas o un injerto de células madre de cordón umbilical y/o para disminuir el número de unidades de sangre de cordón umbilical requeridas para trasplante en el sujeto. La administración puede ser, por ejemplo, tras el tratamiento del sujeto o la médula del sujeto con radioterapia, quimioterapia o terapia de inmunosupresión.

En otras realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un receptor de un trasplante de médula ósea, de un trasplante de células madre hematopoyéticas o de un trasplante de células madre de cordón umbilical, con el fin de disminuir la administración de otros tratamientos o factores de crecimiento.

En realizaciones adicionales, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse a un sujeto o a un injerto de tejido de un sujeto para paliar el rechazo del injerto, para potenciar el injerto del injerto, para potenciar el injerto del injerto tras el tratamiento del sujeto o la médula del sujeto con radioterapia, quimioterapia o terapia de inmunosupresión, para conferir resistencia frente a los efectos tóxicos o letales de la exposición a radiación, conferir resistencia al efecto tóxico de Cytoxan, el efecto tóxico de fludarabina, el efecto tóxico de quimioterapia o el efecto tóxico de terapia de inmunosupresión, para disminuir la infección y/o para disminuir la toxicidad pulmonar de la radiación.

Adicionalmente, en el organismo modelo la señalización de PGE<sub>2</sub> estimula la regeneración del hígado y aumenta la supervivencia después de la exposición a agentes hepatotóxicos, tales como paracetamol. Así, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden utilizarse para aumentar la regeneración del hígado después de resección hepática, o para aumentar la regeneración del hígado y aumentar la supervivencia después de exposiciones a agentes hepatotóxicos, incluyendo pero sin limitarse a paracetamol y compuestos similares.

También se han usado análogos de PGE<sub>1</sub> en el tratamiento de disfunción eréctil. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse o bien solos o bien en combinación con una prostaglandina para el tratamiento de disfunción eréctil.

Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden proporcionarse en una composición farmacéutica o composición cosmética dependiendo del estado o trastorno patológico o cosmético que esté tratándose. Una composición farmacéutica que contiene los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento como principio activo puede fabricarse mezclando el derivado con un(os) portador(es)

farmacéuticamente aceptable(s) o un(os) excipiente(s) o diluyendo los inhibidores de 15-PGDH con un(os) diluyente(s) según métodos convencionales. La composición farmacéutica puede contener además cargas, agentes antiohesivos, lubricantes, agentes humectantes, agentes aromatizantes, agentes emulsionantes, conservantes y similares. La composición farmacéutica puede formularse en una formulación adecuada según los métodos conocidos por los expertos en la técnica de modo que pueda proporcionar una liberación inmediata, controlada o sostenida de los inhibidores de 15-PGDH después de administrarse a un mamífero.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede formularse en una forma de dosificación parenteral u oral. La forma de dosificación sólida para administración oral puede fabricarse añadiendo excipiente, si es necesario, junto con aglutinante, disgregantes, lubricantes, agentes colorantes y/o agentes aromatizantes, a los inhibidores de 15-PGDH y conformando la mezcla resultante en forma de comprimidos, pastillas recubiertas con azúcar, gránulos, polvo o cápsulas. Los aditivos que pueden añadirse a la composición pueden ser los habituales en la técnica. Por ejemplo, los ejemplos del excipiente incluyen lactosa, sacarosa, cloruro de sodio, glucosa, almidón, carbonato de calcio, caolín, celulosa microcristalina, silicato y similares. Los aglutinantes a modo de ejemplo incluyen agua, etanol, propanol, jarabe dulce, disolución de sacarosa, disolución de almidón, disolución de gelatina, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilalmidón, metilcelulosa, etilcelulosa, goma laca, fosfonato de calcio y polipirrolidona. Los ejemplos del disgregante incluyen almidón seco, alginato de sodio, polvo de agar, bicarbonato de sodio, carbonato de calcio, laurilsulfato de sodio, monoglicérido esteárico y lactosa. Además, puede usarse como lubricante el talco purificado, estearatos, borato de sodio y polietilenglicol; y puede usarse como agente aromatizante sacarosa, cáscara de naranja amarga, ácido cítrico, ácido tartárico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede producirse en formulaciones en aerosol (por ejemplo, pueden nebulizarse) para administrarse mediante inhalación.

Los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden combinarse con agentes aromatizantes, tampones, agentes estabilizantes, y similares e incorporarse en formas de dosificación líquidas orales tales como disoluciones, jarabes o elixires según métodos convencionales. Un ejemplo de los tampones puede ser citrato de sodio. Los ejemplos de los agentes estabilizantes incluyen goma tragacanto, goma arábiga y gelatina.

En algunas realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden incorporarse en una forma de dosificación de inyección, por ejemplo, para una vía subcutánea, intramuscular o intravenosa añadiendo a la misma agentes de ajuste del pH, tampones, agentes estabilizantes, relajantes, anestésicos tópicos. Los ejemplos de los agentes de ajuste del pH y los tampones incluyen citrato de sodio, acetato de sodio y fosfato de sodio. Los ejemplos de los agentes estabilizantes incluyen piro-sulfito de sodio, EDTA, ácido tioglicólico y ácido tioláctico. Los anestésicos tópicos puede ser procaína HCl, lidocaína HCl y similares. Los relajantes pueden ser cloruro de sodio, glucosa y similares.

En otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden incorporarse en supositorios según métodos convencionales añadiendo a los mismos portadores farmacéuticamente aceptables que se conocen en la técnica, por ejemplo, polietilenglicol, lanolina, manteca de cacao o triglicéridos de ácidos grasos, si es necesario, junto con tensioactivos tales como Tween.

La composición farmacéutica puede formularse en diversas formas de dosificación tal como se comentó anteriormente y entonces administrarse a través de diversas vías incluyendo una vía oral, por inhalación, transdérmica, subcutánea, intravenosa o intramuscular. La dosificación puede ser una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad farmacéuticamente eficaz puede ser una cantidad del inhibidor de 15-PGDH para tratar o mejorar la alopecia, enfermedad cardiovascular, enfermedad gastrointestinal, heridas y enfermedad renal. La cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto se determinará apropiadamente dependiendo de la clase y la intensidad de la enfermedad que va a tratarse, la edad, el sexo, peso corporal y la condición física de los pacientes que van a tratarse, la vía de administración, la duración de la terapia y similares. En general, la cantidad eficaz del compuesto puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 a 1.000 mg en la administración oral, de aproximadamente 0,1 a 500 mg en la administración intravenosa, aproximadamente de 5 a 1.000 mg en la administración rectal. En general, la dosificación diaria para adultos está en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 5.000 mg, preferiblemente aproximadamente a 1.000 mg pero no puede determinarse uniformemente porque depende de la edad, el sexo, peso corporal y la condición física de los pacientes que van a tratarse. La formulación puede administrarse una vez al día o varias veces al día con una dosis dividida.

Las composiciones cosméticas que contienen el inhibidor de 15-PGDH pueden incluir cualquier sustancia o preparación destinada a ponerse en contacto con las diversas partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, pelo corporal y sistema piloso, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes o las membranas de la mucosa bucal con el fin, exclusiva o principalmente, de limpiarlos, de proporcionarles una fragancia, de modificar su aspecto y/o de corregir olores corporales y/o protegerlos o mantenerlos en buenas condiciones.

La composición cosmética puede comprender un medio cosméticamente aceptable que puede ser agua o una mezcla de agua y al menos un disolvente seleccionado de disolventes orgánicos hidrófilos, disolventes orgánicos lipófilos, disolventes orgánicos anfífilos, y mezclas de los mismos.

Para la aplicación tópica, la composición cosmética puede administrarse en forma de disoluciones o suspensiones acuosas, alcohólicas, acuosas-alcohólicas o aceitosas, o de una dispersión de tipo loción o suero, de emulsiones que tienen una consistencia líquida o semilíquida o son pastosas, obtenidas mediante dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (O/W) o viceversa (W/O) o múltiples emulsiones, de un polvo libre o compactado que va a usarse tal cual o a incorporarse en un medio fisiológicamente aceptable, o si no de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico. Por tanto, puede estar en forma de un ungüento, una tintura, leches, una crema, una pomada, un polvo, un parche, una almohadilla impregnada, una disolución, una emulsión o una dispersión vesicular, una loción, geles acuosos o anhidros, una pulverización, una suspensión, un champú, un aerosol o una espuma. Puede ser anhidra o acuosa. También puede comprender preparaciones sólidas que constituyen jabones o pastillas limpiadoras.

Las composiciones cosméticas pueden comprender en particular una composición para el cuidado capilar, y en particular un champú, una loción fijadora, una loción de tratamiento, una crema o un gel de peinado, lociones reestructurantes para el cabello, una mascarilla, etc. Las composiciones cosméticas pueden ser una crema, una loción capilar, un champú o un acondicionador. Estas pueden usarse en particular en tratamientos que usan una aplicación que puede ir seguida o no por aclarado, o si no en forma de un champú. También se pretende una composición en forma de una espuma, o si no en forma de pulverización o un aerosol, que comprende entonces propelente a presión. Por tanto, puede estar en forma de loción, suero, leche, crema, gel, ungüento, pomada, polvo, bálsamo, parche, almohadilla impregnada, pastilla o espuma.

En particular, las composiciones para la aplicación al cuero cabelludo o al cabello puede estar en forma de una loción para el cuidado capilar, por ejemplo para la aplicación diaria o dos veces a la semana, de un champú o de un acondicionador capilar, en particular para la aplicación dos veces a la semana o semanal, de un jabón líquido o sólido para lavar el cuero cabelludo, para la aplicación diaria, de un producto para compartir el peinado (laca, producto para la fijación del cabello o gel de peinado), de una mascarilla de tratamiento o de un gel o una crema espumante para limpiar el cabello. Estas también pueden estar en forma de una máscara o un tinte capilar que ha de aplicarse con un cepillo o un peine.

Además, para la aplicación tópica a las pestañas o el pelo corporal, las composiciones pueden estar en forma de una máscara pigmentada o no pigmentada, que ha de aplicarse con un cepillo a las pestañas o alternativamente al pelo del bigote o la barba. Para una administración de composición mediante inyección, la composición puede estar en forma de una loción acuosa o una suspensión aceitosa. Para uso oral, la composición puede estar en forma de cápsulas, gránulos, jarabes orales o comprimidos. Según una realización particular, la composición está en forma de crema capilar o loción capilar, un champú, un acondicionador capilar o una máscara para el cabello o para las pestañas.

De manera conocida, las composiciones cosméticas también pueden contener adyuvantes que son normales en el campo de la cosmética, tales como agente gelificantes hidrófilos o lipófilos, aditivos hidrófilos o lipófilos, conservantes, antioxidantes, disolventes, fragancias, cargas, agentes de pantalla UV, absorbentes de olores y materias colorantes. Las cantidades de estos diversos adyuvantes son las usadas convencionalmente en el campo de la cosmética, y son por ejemplo de desde el 0,1% hasta el 20%, en particular menos del o igual al 10%, del peso total de la composición. Según su naturaleza, estos adyuvantes pueden introducirse en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

En algunas realizaciones, el inhibidor de 15-PGDH puede administrarse en una terapia combinatoria o terapia de combinación que incluye la administración de un inhibidor de 15-PGDH con uno o más agentes activos adicionales. La expresión "terapia combinatoria" o "terapia de combinación" abarca la administración del inhibidor de 15-PGDH, y uno o más agentes terapéuticos como parte de un régimen de tratamiento específico destinado para proporcionar un efecto beneficioso por la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo normalmente a lo largo de un periodo definido (habitualmente minutos, horas, días o semanas dependiendo de la combinación seleccionada). "Terapia combinatoria" o "terapia de combinación" pretende abarcar la administración de estos agentes terapéuticos de manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de manera sustancialmente simultánea. Puede lograrse una administración sustancialmente simultánea, por ejemplo administrando al sujeto una dosis individual que tiene una razón fija de cada agente terapéutico o en múltiples dosis individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico puede efectuarse por cualquier vía apropiada incluyendo, pero sin limitarse a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejido de membrana mucosa. Los agentes terapéuticos pueden administrarse por la misma vía o por vías diferentes. La secuencia en la que se administran los agentes terapéuticos no es crítica de manera limitada.

En algunas realizaciones, el agente activo adicional puede elegirse en particular de inhibidores de lipoxigenasa tal como se describe en el documento EP 648488, los inhibidores de bradicinina descritos en particular en el documento EP 845700, prostaglandinas y sus derivados, en particular los descritos en los documentos WO 98/33497, WO 95/11003, JP 97-100091, JP 96-134242, los agonistas o antagonistas de los receptores para prostaglandinas y los

análogos no prostanoicos de prostaglandinas tal como se describe en los documentos EP 1175891 y EP 1175890, WO 01/74307, WO 01/74313, WO 01/74314, WO 01/74315 o WO 01/72268.

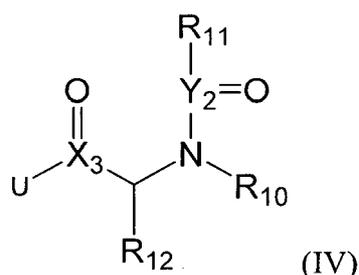
5 En otras realizaciones, los inhibidores de 15-PGDH pueden administrarse en combinación con agentes activos, tales como vasodilatadores, agonistas de prostanoicos, antiandrógenos, ciclosporinas y sus análogos, antimicrobianos, triterpenos, solos o como una mezcla. Los vasodilatadores pueden incluir agonistas de canales de potasio incluyendo minoxidilo y sus derivados, Aminexil y los compuestos descritos en las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 3.382.247, 5.756.092, 5.772.990, 5.760.043, 5.466.694, 5.438.058, 4.973.474, cromakalim y diazóxido. Los antiandrógenos pueden incluir inhibidores de 5-alfa-reductasa tales como finasterida y los compuestos descritos en la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.516.779, acetato de ciprosterona, ácido azelaico, sus sales y sus derivados, y los compuestos descritos en la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.480.913, flutamida y los compuestos descritos en las patentes estadounidenses n.<sup>os</sup> 5.411.981, 5.565.467 y 4.910.226. Los compuestos antimicrobianos pueden incluir derivados de selenio, ketoconazol, triclocarbán, triclosán, piritiona de zinc, itraconazol, ácido asiático, hinokitiol, mipirocina, y los compuestos descritos en el documento EP 680745, clorhidrato de clinicina, peróxido de benzoilo o bencilo y minociclina. Los agentes antiinflamatorios pueden incluir inhibidores específicos para Cox-2 tales como por ejemplo NS-398 y DuP-697 (B. Batistini *et al.*, DN&P 1994; 7(8):501-511) y/o inhibidores de lipoxigenasas, en particular 5-lipoxigenasa, tal como por ejemplo zileutón (F. J. Alvarez & R. T. Slade, Pharmaceutical Res. 1992; 9(11):1465-1473).

20 Otros compuestos activos, que pueden estar presentes en composiciones farmacéuticas y/o cosméticas pueden incluir Aminexil y sus derivados, 60-[(9Z,12Z)octadec-9,12-dienoil]hexapiranosas, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, estradiol, maleato de clorfeniramina, derivados de clorofillina, colesterol, cisteína, metionina, nicotinato de bencilo, mentol, aceite de menta piperita, pantotenato de calcio, pantenol, resorcinol, inhibidores de proteína cinasa C, activadores de prostaglandina H sintasa 1 o COX-1, o activadores de COX-2, inhibidores de glicosidasa, inhibidores de glicosaminoglicanasa, ésteres del ácido piroglutámico, ácidos hexosacarídicos o acilhexosacarídicos, etilenarilos sustituidos, aminoácidos N-acilados, flavonoides, derivados y análogos de ascomicina, antagonistas de histaminas, triterpenos, tales como ácido ursólico y los compuestos descritos en la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.529.769, la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.468.888, la patente estadounidense n.<sup>o</sup> 5.631.282, saponinas, inhibidores de proteoglicanasa, agonistas y antagonistas de estrógenos, pseudopterinas, citocinas y promotores de factores de crecimiento, inhibidores de IL-1 o IL-6, promotores de IL-10, inhibidores de TNF, vitaminas, tales como vitamina D, análogos de vitamina B12 y pantenol, hidroxiácidos, benzofenonas, ácidos grasos esterificados e hidantoína.

35 Las composiciones farmacéuticas y/o cosméticas que incluyen el inhibidor de 15-PGDH descrito en el presente documento pueden contener adicionalmente, por ejemplo, al menos un compuesto elegido de prostaglandinas, en particular prostaglandina PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, sus sales, sus ésteres, sus análogos y sus derivados, en particular los descritos en los documentos WO 98/33497, WO 95/11003, JP 97-100091, JP 96-134242, en particular agonistas de los receptores de prostaglandina. Puede contener en particular al menos un compuesto tal como los agonistas (en forma de ácido o en forma de un precursor, en particular en forma de éster) del receptor de prostaglandina F<sub>2α</sub>, tales como por ejemplo latanoprost, fluprostenol, cloprostenol, bimatoprost, unoproston, los agonistas (y sus precursores, en particular los ésteres tales como travoprost) de los receptores de prostaglandina E<sub>2</sub> tales como 17-fenil-PGE<sub>2</sub>, viprostol, butaprost, misoprostol, sulproston, 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub>, 11-desoxi-PGE<sub>1</sub>, 1-desoxi-PGE<sub>1</sub>, los agonistas y sus precursores, en particular ésteres, del receptor de prostaciclina (IP) tales como cicaprost, iloprost, isocarbociclina, beraprost, eprostenol, treprostinil, los agonistas y sus precursores, en particular los ésteres, del receptor de prostaglandina D<sub>2</sub> tales como BW245C (ácido (4S)-(3-[(3R,S)-3-ciclohexil-3-isopropil]-2,5-dioxo)-4-imidazolidinaheptanoico), BW246C (ácido (4R)-(3-[(3R,S)-3-ciclohexil-3-isopropil]-2,5-dioxo)-4-imidazolidinaheptanoico), los agonistas y sus precursores, en particular los ésteres, del receptor para los tromboxanos A<sub>2</sub> (TP) tales como I-BOP (ácido [1S-[1a,2a(Z),3b(1E,3S),4a]]-7-[3-[3-hidroxi-4-[4-(yodofenoxi)-1-butenil]-7-oxabicyclo-[2,2,1]hept-2-il]-5-heptenoico).

50 Ventajosamente, la composición puede incluir al menos un inhibidor de 15-PGDH tal como se definió anteriormente y al menos una prostaglandina o un derivado de prostaglandina tal como por ejemplo las prostaglandinas de la serie 2 incluyendo en particular PGF<sub>2α</sub> y PGE<sub>2</sub> en forma salina o en forma de precursores, en particular de los ésteres (ejemplo ésteres isopropílicos), sus derivados tales como 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub>, 17-fenil-PGE<sub>2</sub> y 16,16-dimetil-PGE<sub>2α</sub>, 17-fenil-PGE<sub>2α</sub>, prostaglandinas de la serie 1 tal como 11-desoxiprostaglandina E1, 1-desoxiprostaglandina E1 en forma salina o de éster, sus análogos, en particular latanoprost, travoprost, fluprostenol, unoproston, bimatoprost, cloprostenol, viprostol, butaprost, misoprostol, sus sales o sus ésteres.

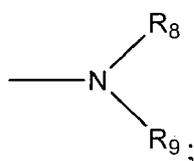
60 Un modulador de 15-PGDH puede ser un activador de 15-PGDH que puede fomentar o estimular la actividad de 15-PGDH. El activador de 15-PGDH puede incluir un compuesto que tiene la fórmula (IV):



en la que:

5  $X_3$  e  $Y_2$  son independientemente C o SO;

U es  $OR''$  (en el que  $R''$  es H, un grupo alquilo sustituido o no sustituido o grupo arilo sustituido o no sustituido) o

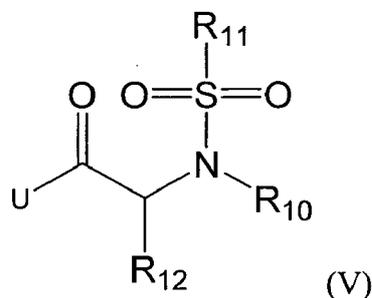


10

$R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo,  $(CH_2)_{n1}OR'$  (en el que  $n1 = 1$  ó 3),  $CF_3$ ,  $CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$ ,  $CH_2-CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$  (en los que  $X = F, Cl, Br$  o  $I$ ),  $CN$ ,  $(C=O)-R'$ ,  $N(R')_2$ ,  $NO_2$ ,  $(C=O)N(R')_2$ ,  $O(CO)R'$ ,  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $COOR'$  (en los que  $R'$  es H o un grupo alquilo inferior), un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterociclilo sustituido o no sustituido y  $R_8$  y  $R_9$  pueden unirse para formar un anillo cíclico o policíclico; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

15

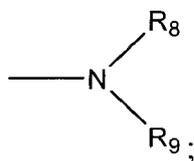
El activador de 15-PGDH puede incluir un compuesto que tiene la fórmula: (V):



20

en la que:

U es  $OR''$  (en el que  $R''$  es H, un grupo alquilo sustituido o no sustituido o grupo arilo sustituido o no sustituido) o



25

$R_8$ ,  $R_9$ ,  $R_{10}$ ,  $R_{11}$  y  $R_{12}$  se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo,  $(CH_2)_{n1}OR'$  (en el que  $n1 = 1, 2$  ó 3),  $CF_3$ ,  $CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$ ,  $CH_2-CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$  (en los que  $X = F, Cl, Br$  o  $I$ ),  $CN$ ,  $(C=O)-R'$ ,  $N(R')_2$ ,  $NO_2$ ,  $(C=O)N(R')_2$ ,  $O(CO)R'$ ,  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $COOR'$  (en los que  $R'$  es H o un grupo alquilo inferior), un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterociclilo sustituido o no sustituido y  $R_8$  y  $R_9$  pueden unirse para formar un anillo cíclico o policíclico; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

30

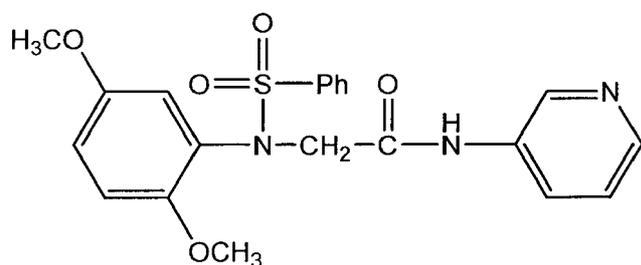
Puede seleccionarse un activador de 15-PGDH que tiene la fórmula (IV) o (V) que puede: ia) a una concentración de  $7,5 \mu M$ , estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50 (usando una escala en la que un valor de 100 indica una duplicación de emisión de indicador con respecto al valor inicial); iia) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50; iia) a una concentración de  $7,5 \mu M$  estimular una línea celular indicaora LS 174 T que

35

expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa hasta un nivel de emisión de luciferasa de más de 50; iva) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$ , no activa la línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel cualquier más de 25; y va) contra proteína 15-PGDH recombinante el compuesto muestra una concentración CI50 para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH de más de 2,5  $\mu\text{M}$ .

5 Puede seleccionarse un activador de 15-PGDH que tiene la fórmula (IV) o (V) que puede: ib) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$ , estimular una línea celular indicadora Vaco503 que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iib) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$  estimular una línea celular indicadora V9m que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; iiib) a una  
10 concentración de 7,5  $\mu\text{M}$  estimular una línea celular indicadora LS174T que expresa un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa para aumentar la emisión de luciferasa; ivb) a una concentración de 7,5  $\mu\text{M}$ , no activa la línea celular V9m de control negativo que expresa indicador de TK-renilla-luciferasa hasta un nivel de luciferasa cualquier más de 25% por encima ; y vb) contra proteína 15-PGDH recombinante el compuesto muestra una concentración CI50 para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH de más de o igual a 2,5  $\mu\text{M}$ .

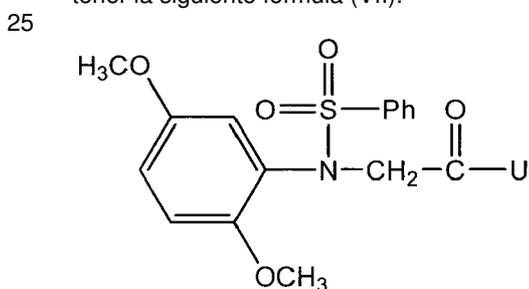
15 Un activador de 15-PGDH que tiene la fórmula (IV) o (V) que satisface los criterios (ia-va) indicados anteriormente y/o que satisface los criterios (ib-vb) indicados anteriormente incluye un compuesto que tiene la fórmula (VI):



(VI)

20 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

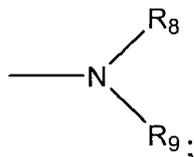
El activador de 15-PGDH puede ser un análogo de un compuesto que tiene la fórmula (VI). Tales análogos pueden tener la siguiente fórmula (VII):



(VII)

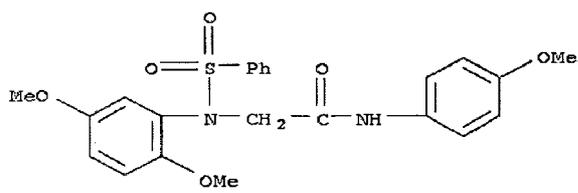
en la que:

30 U es OR<sup>n</sup> (en el que R<sup>n</sup> es H, un grupo alquilo sustituido o no sustituido o grupo arilo sustituido o no sustituido) o

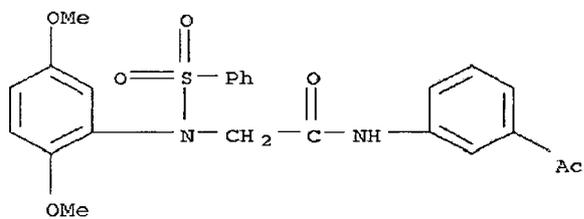


35 R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n1 = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior), un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido, un heterociclilo sustituido o no sustituido y R<sub>8</sub> y R<sub>9</sub> pueden unirse para formar un anillo cíclico o policíclico; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

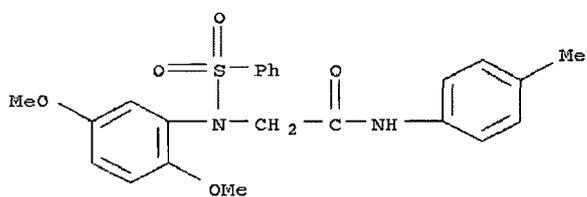
40 Los ejemplos de los activadores de 15-PGDH que tienen la fórmula (VII) incluyen:



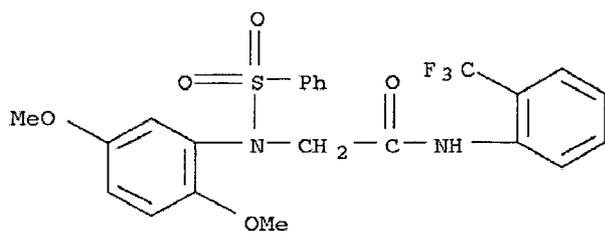
;



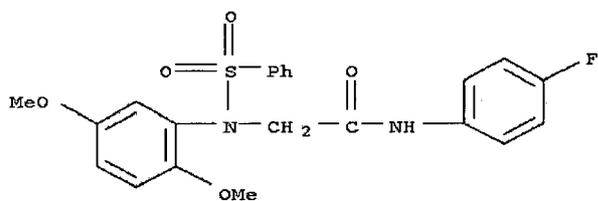
;



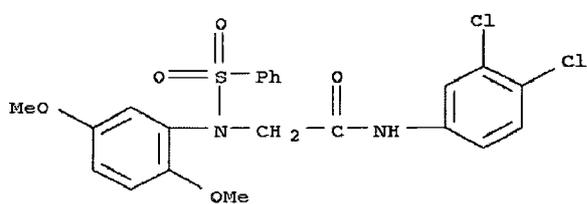
;



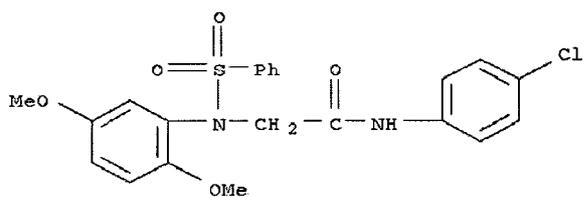
;



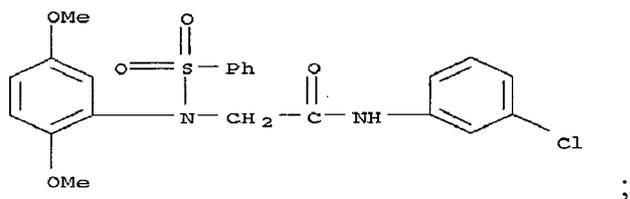
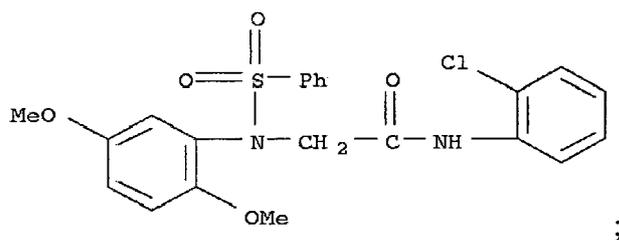
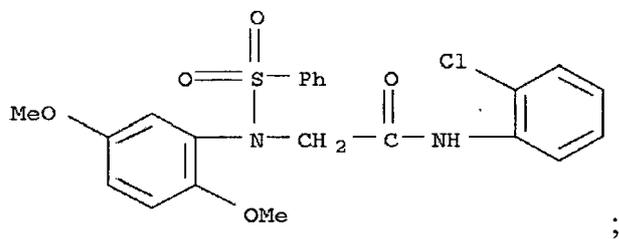
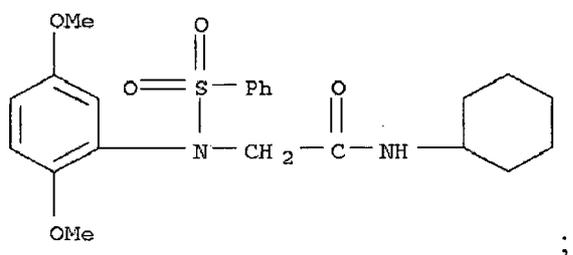
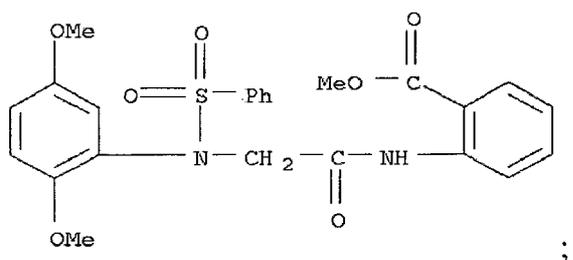
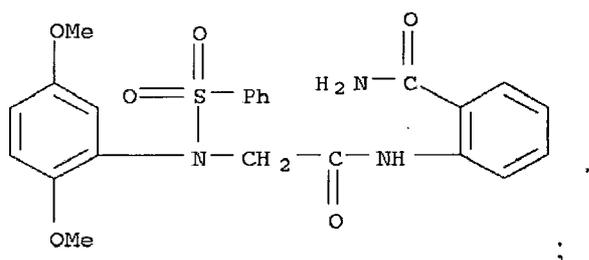
;



;

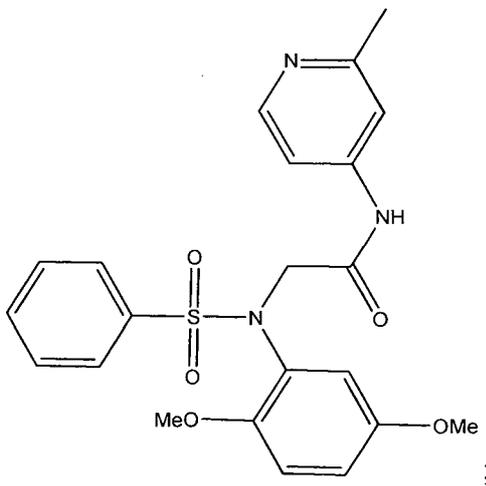
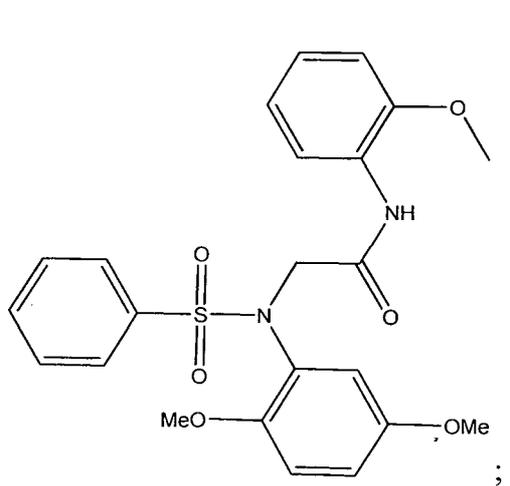
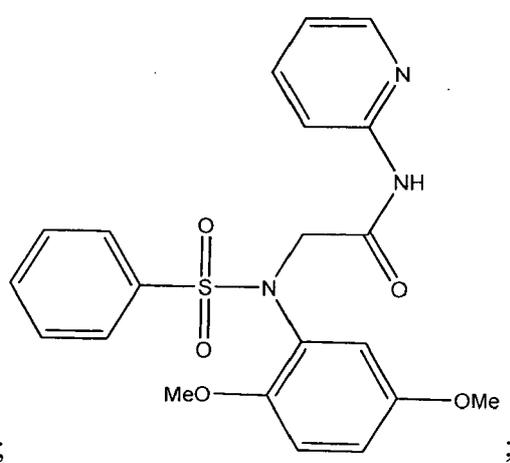
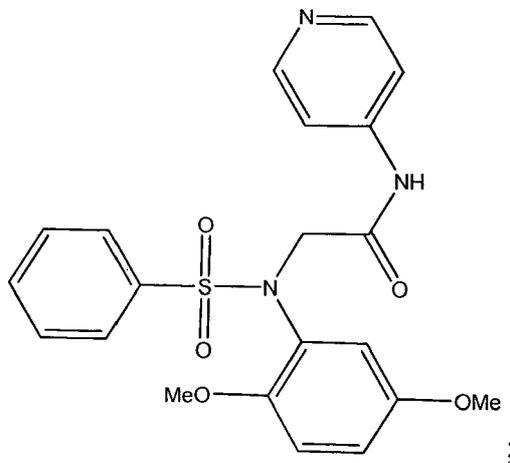
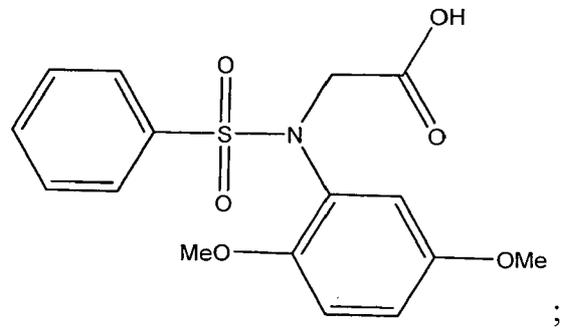
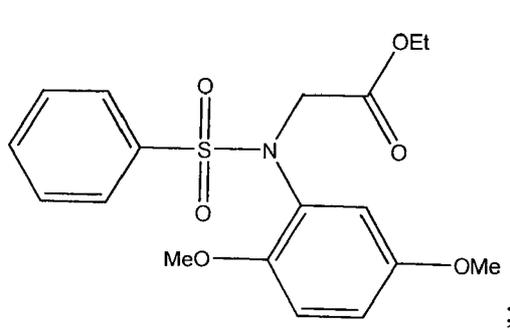
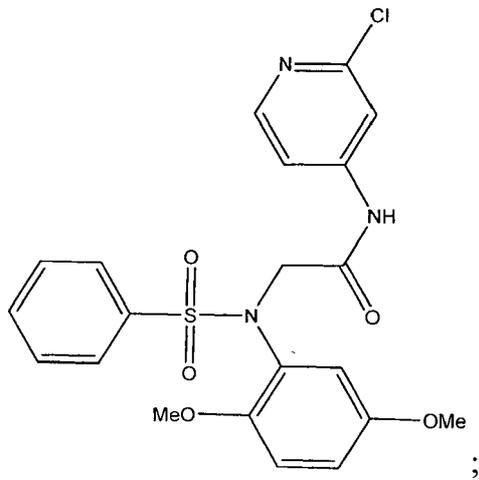


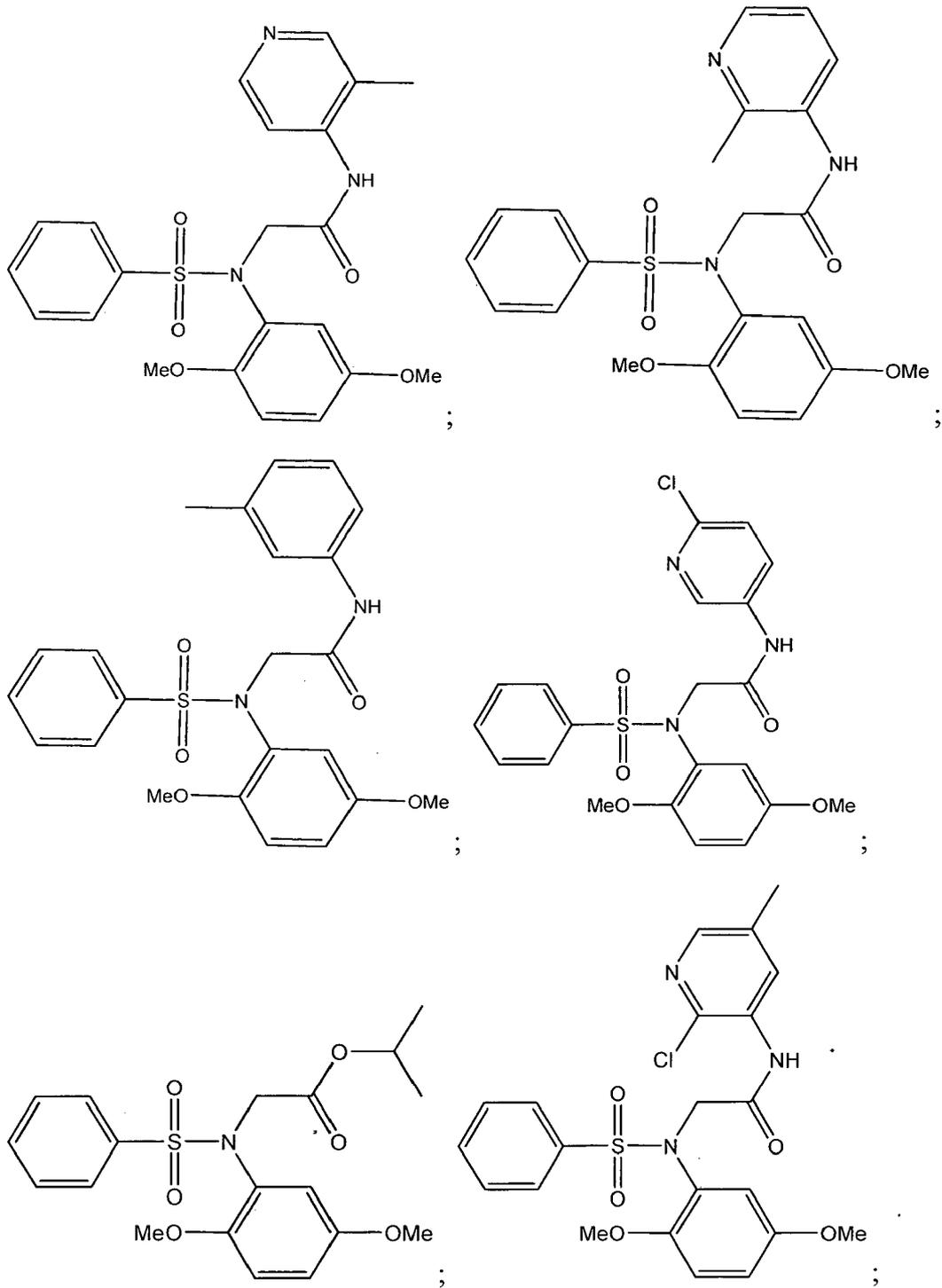
;

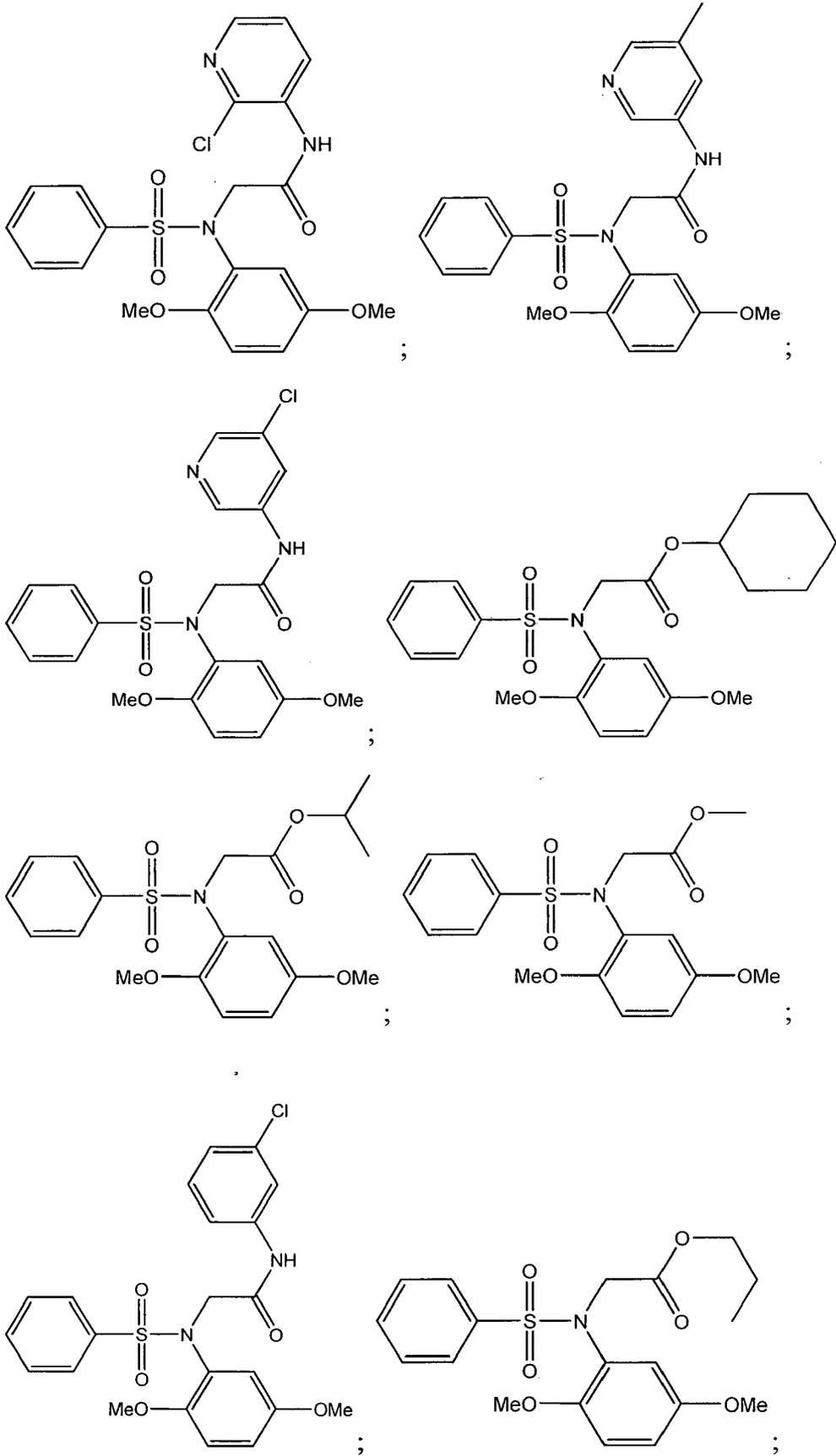


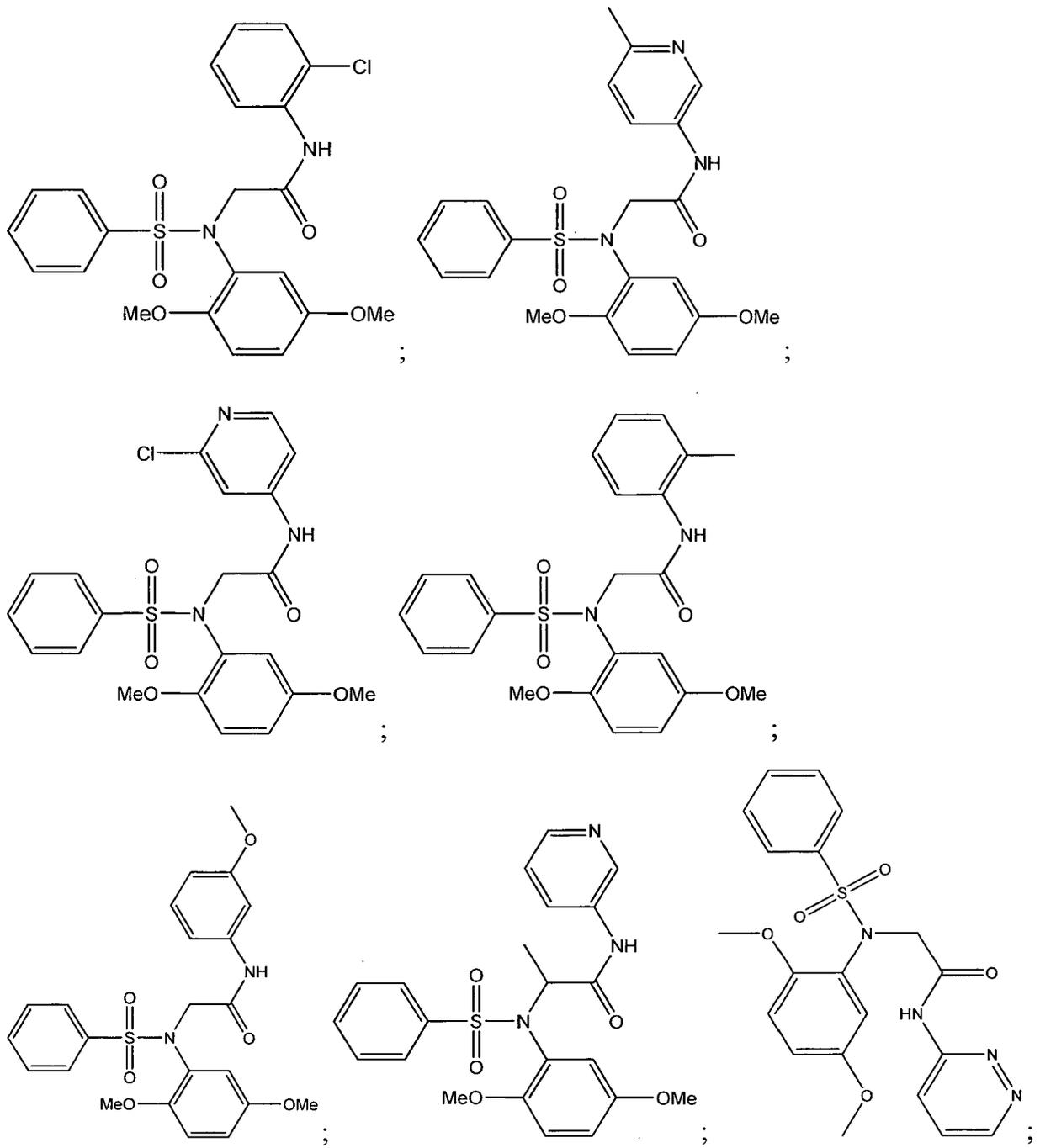
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

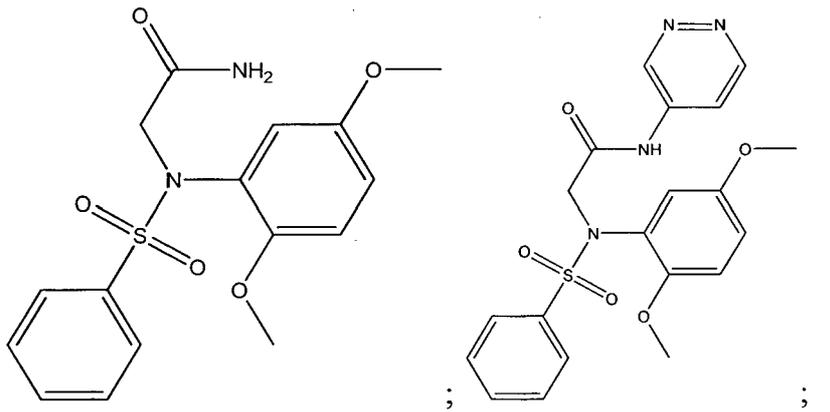
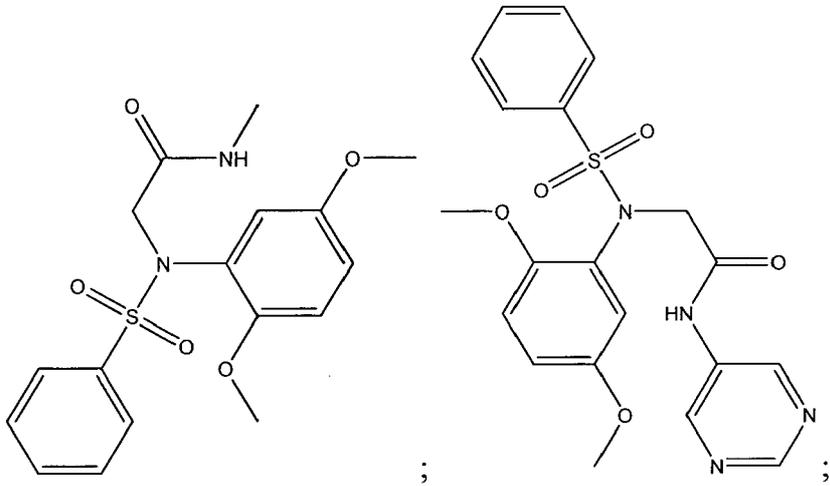
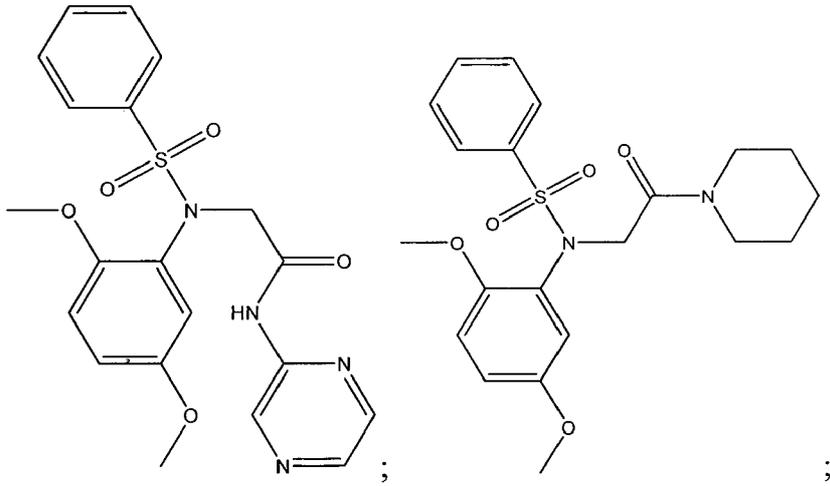
Otros ejemplos de compuestos que tienen la fórmula (VII) incluyen:

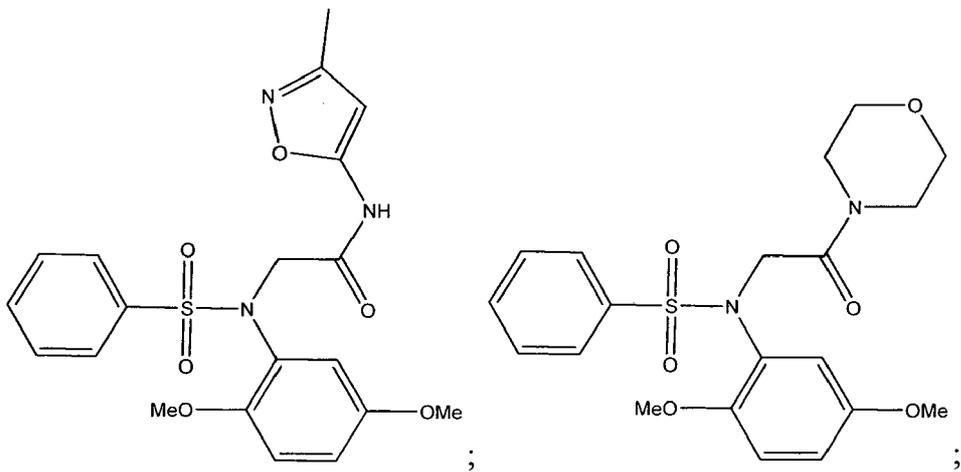
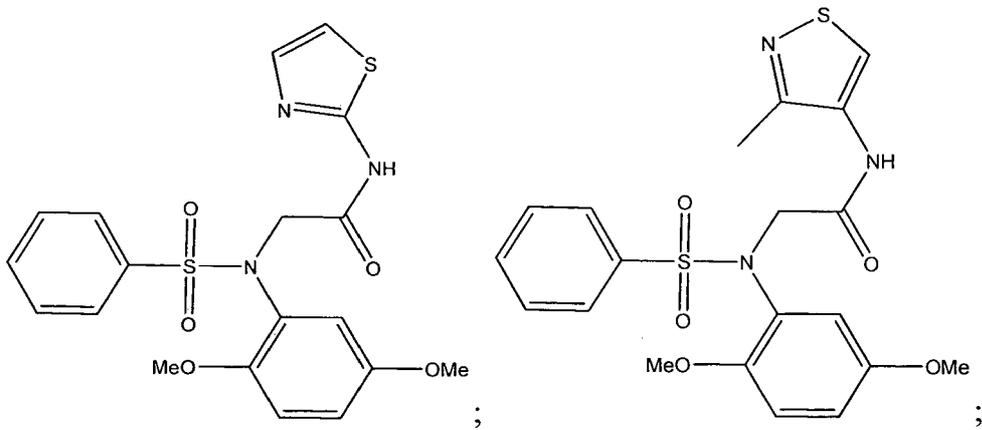
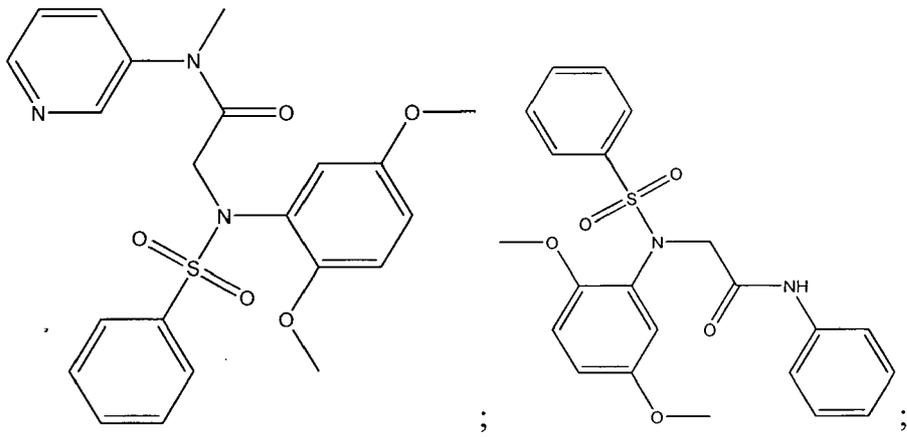


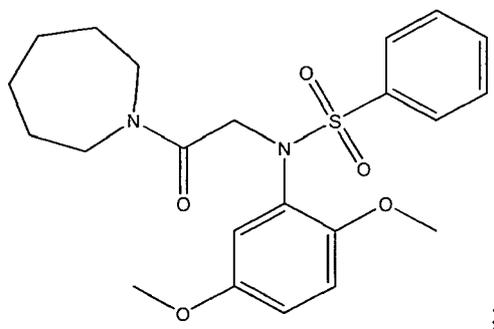
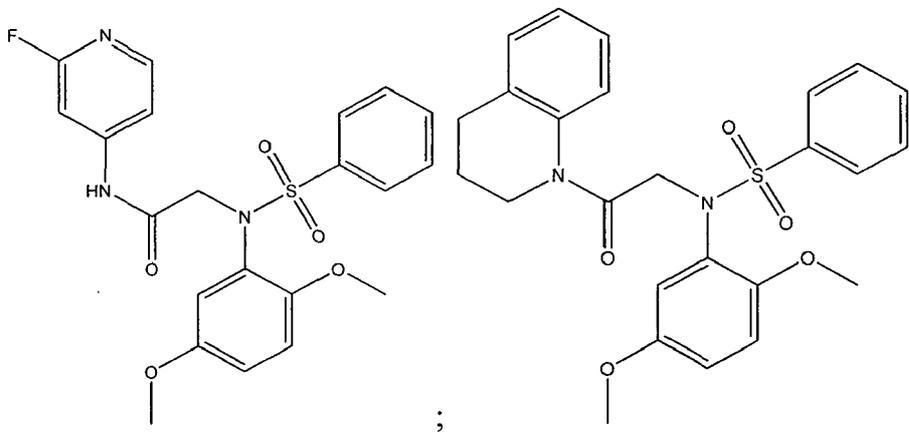
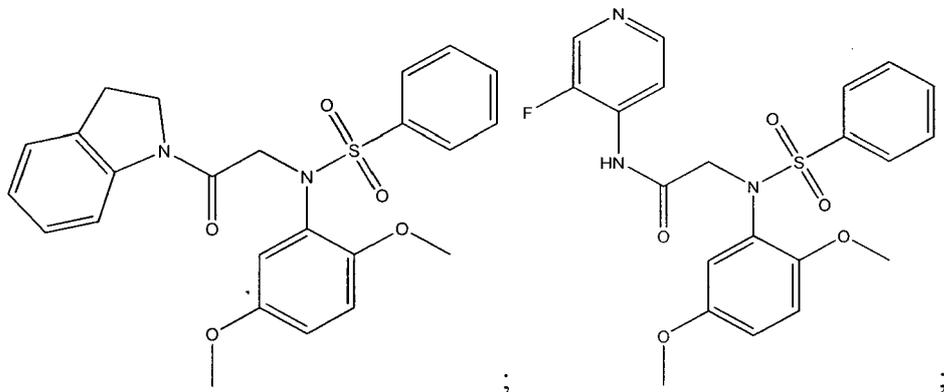
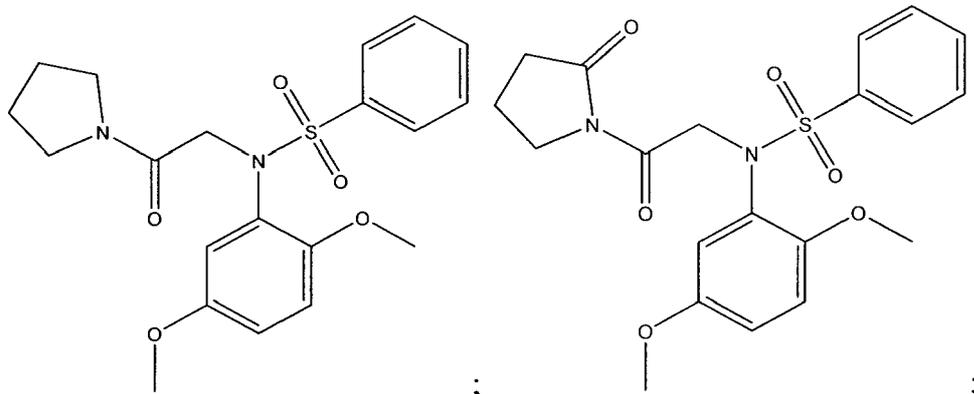






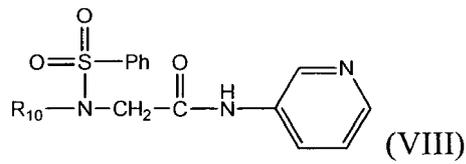






y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

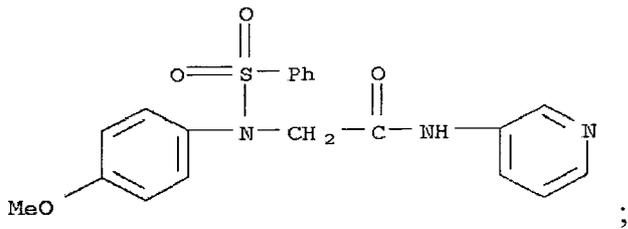
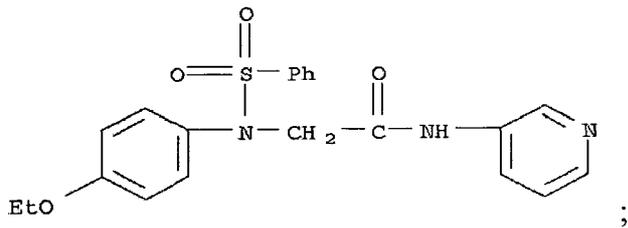
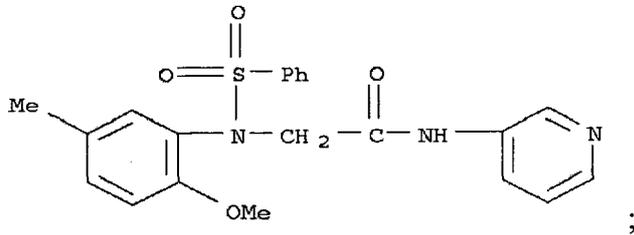
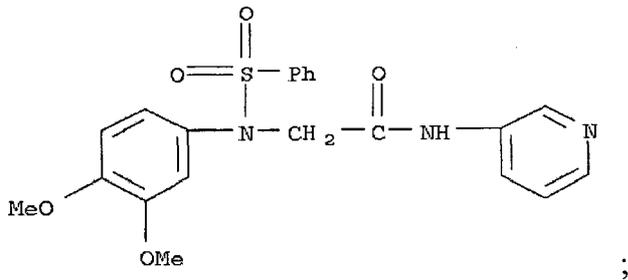
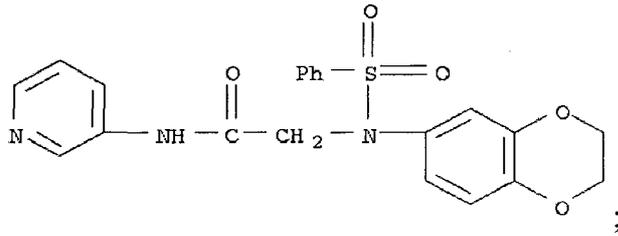
El activador de 15-PGDH puede ser un análogo del compuesto (VI) que tiene la siguiente fórmula (VIII):

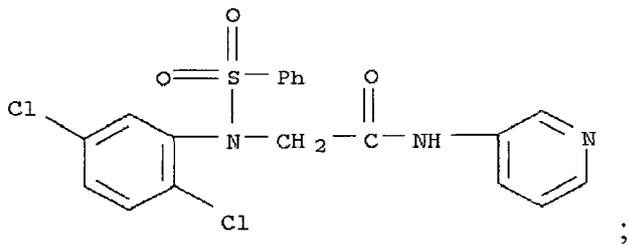
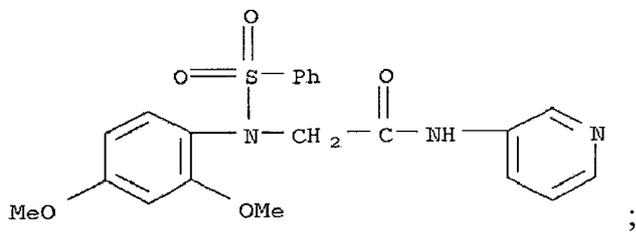
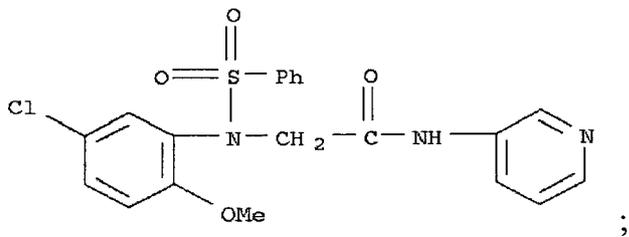
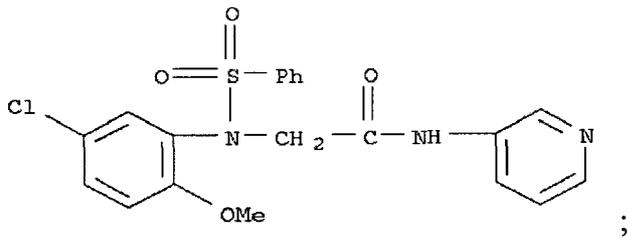
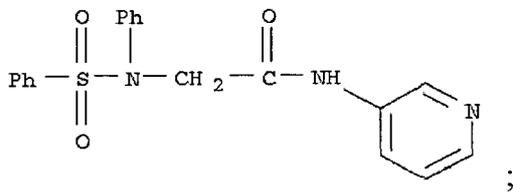
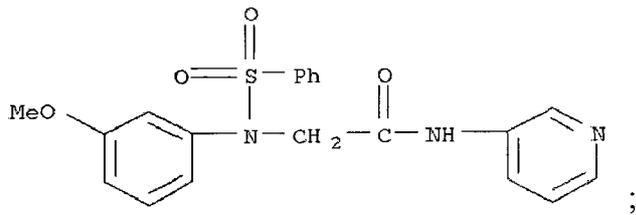
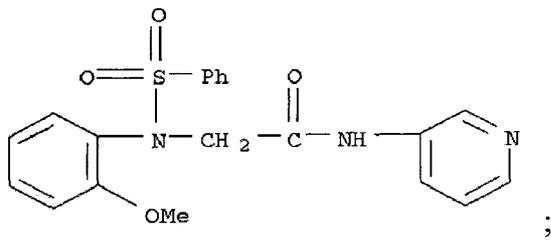


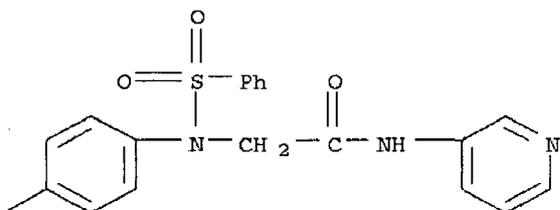
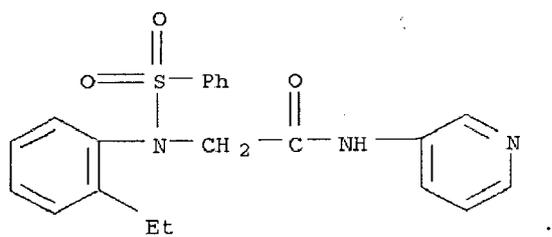
en la que R<sub>10</sub> se selecciona del grupo que consiste en un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido y un heterociclilo sustituido o no sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

5

Los ejemplos de los activadores de 15-PGDH que tienen la fórmula (VIII) incluyen:

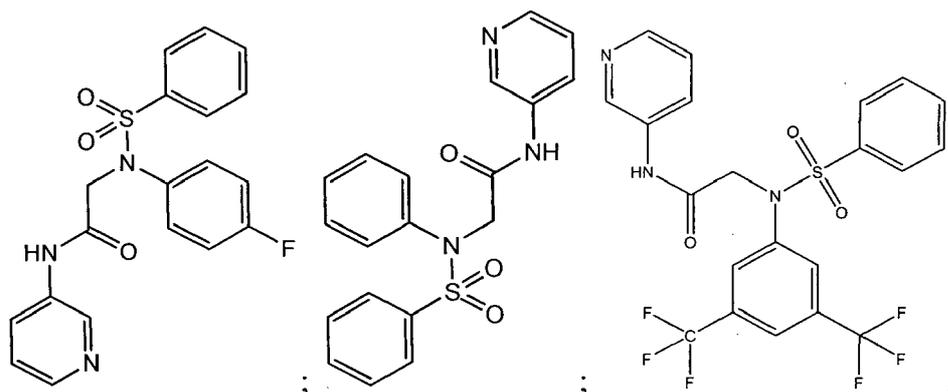






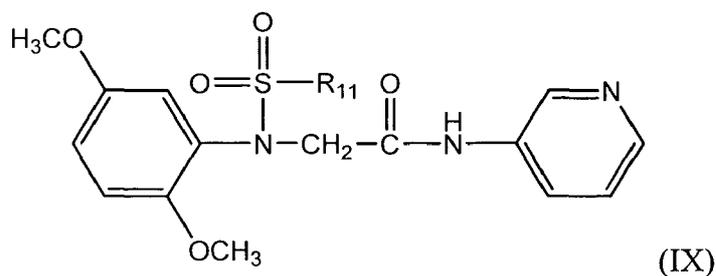
5 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Todavía otros ejemplos de compuestos que tienen la fórmula (VIII) incluyen:



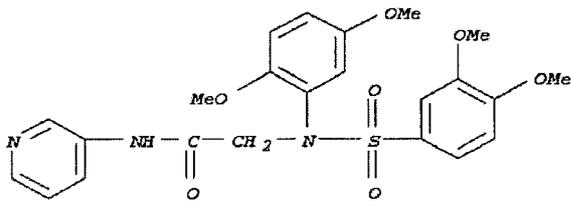
10 y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El activador de 15-PGDH puede ser un análogo del compuesto (VI) que tiene la fórmula (IX):

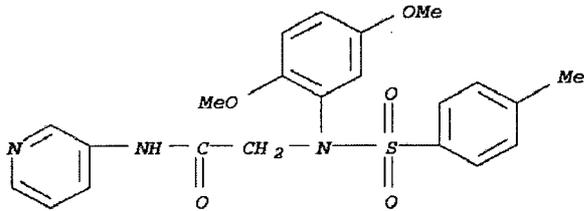


15 en la que  $R_{11}$  es H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior,  $(CH_2)_{n1}OR'$  (en el que  $n1 = 1, 2 \text{ ó } 3$ ),  $CF_3$ ,  $CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$ ,  $CH_2-CH_2-CH_2X$ ,  $O-CH_2-CH_2X$  (en los que  $X = F, Cl, Br \text{ o } I$ ),  $CN$ ,  $(C=O)-R'$ ,  $N(R')_2$ ,  $NO_2$ ,  $(C=O)N(R')_2$ ,  $O(CO)R'$ ,  $OR'$ ,  $SR'$ ,  $COOR'$  (en los que  $R'$  es H o un grupo alquilo inferior), un arilo sustituido o no sustituido, un cicloalquilo sustituido o no sustituido y un heterociclilo sustituido o no sustituido; y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

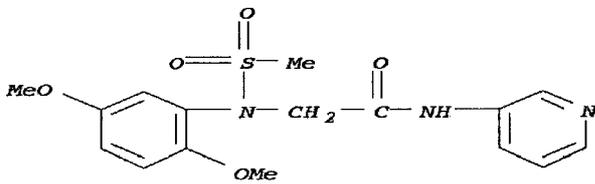
20 Los ejemplos de los activadores de 15-PGDH que tienen la fórmula (IX) incluyen:



;



;



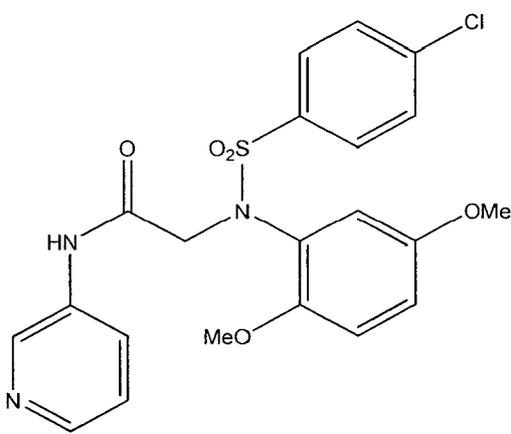
5

;

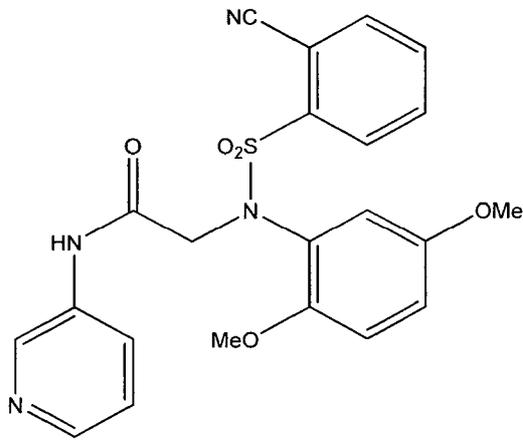
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Todavía otros ejemplos de compuestos que tienen fórmula (IX) incluyen:

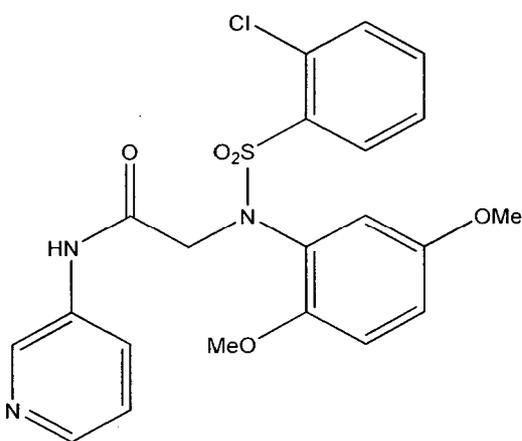
10



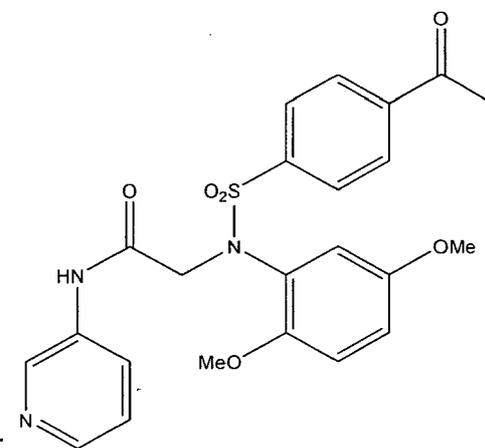
;



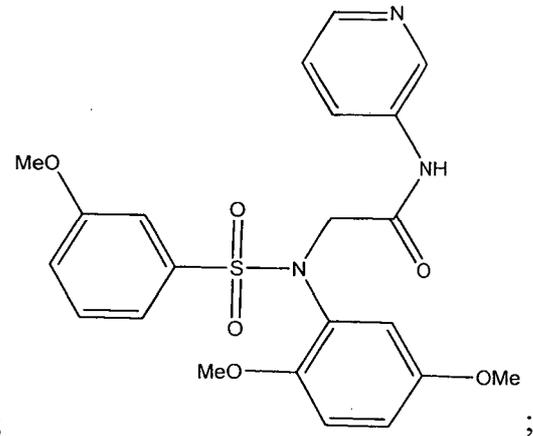
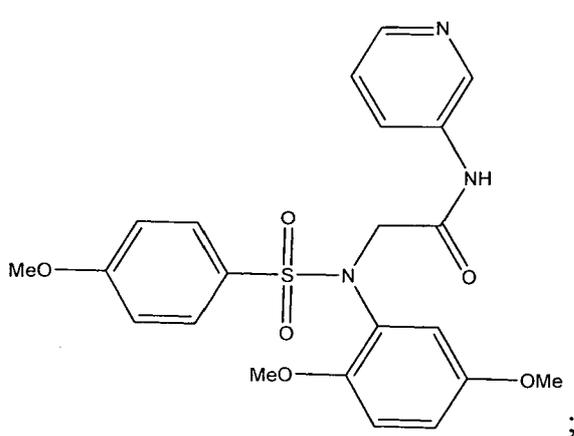
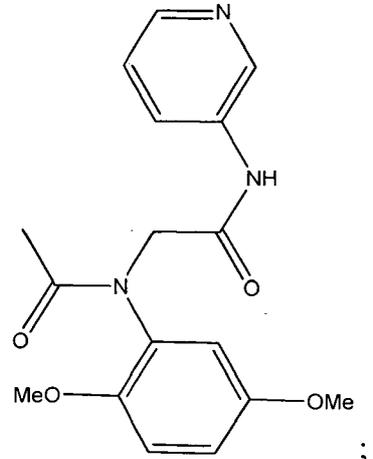
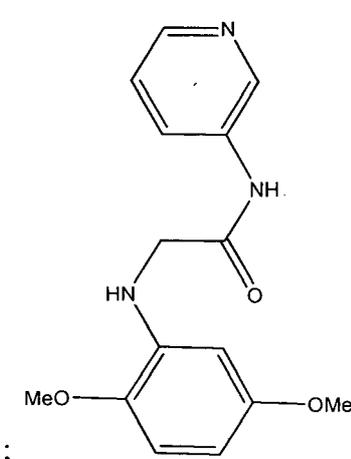
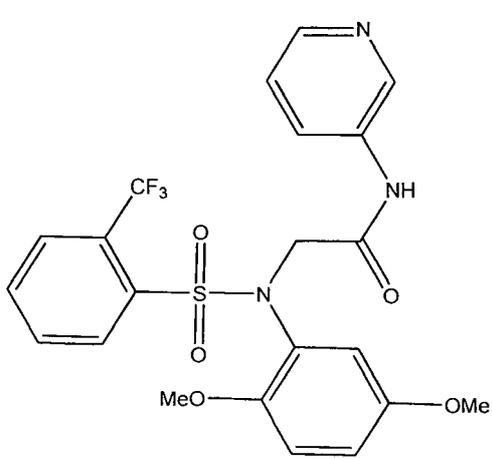
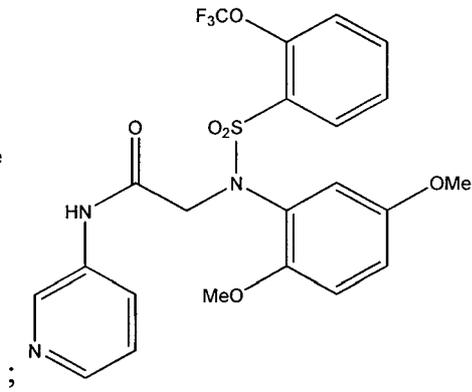
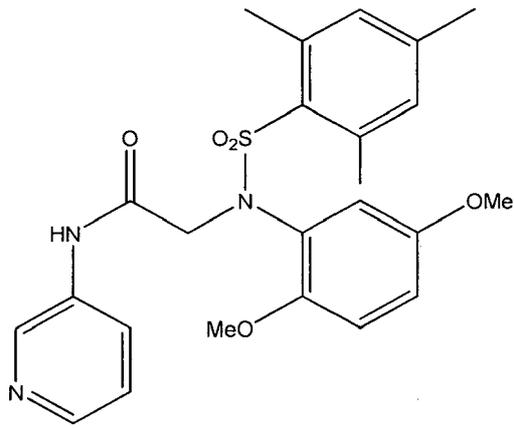
;

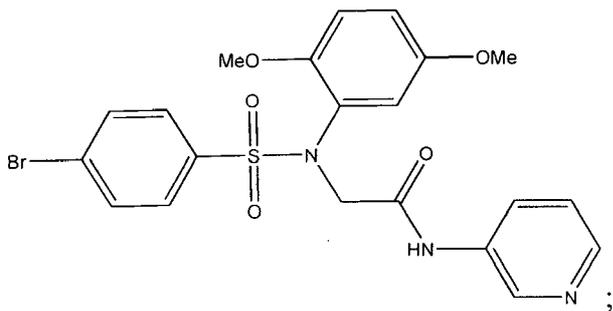
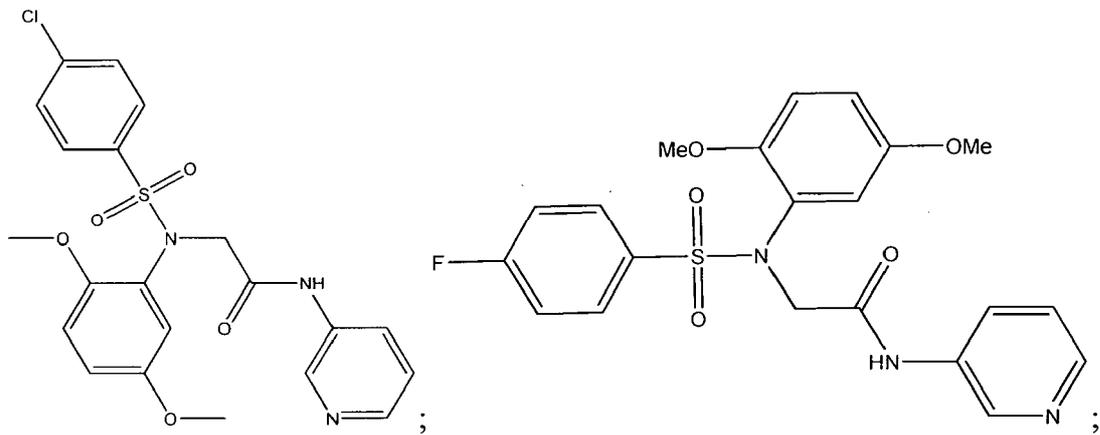
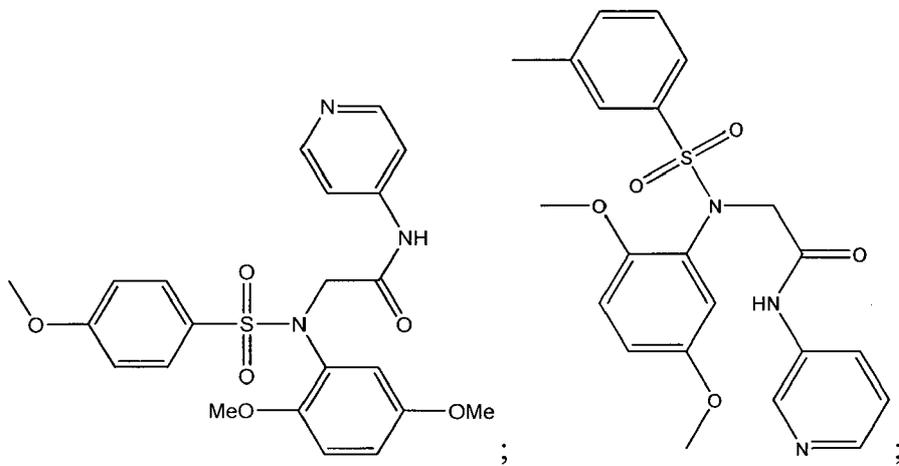
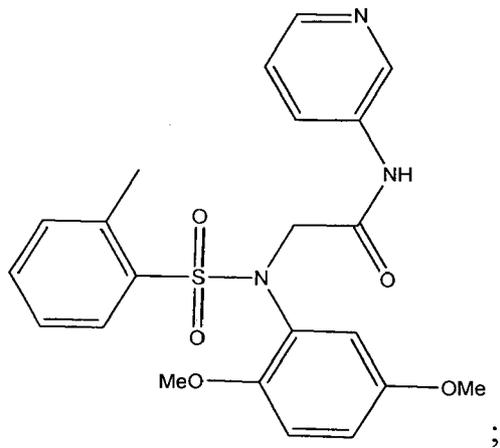


;



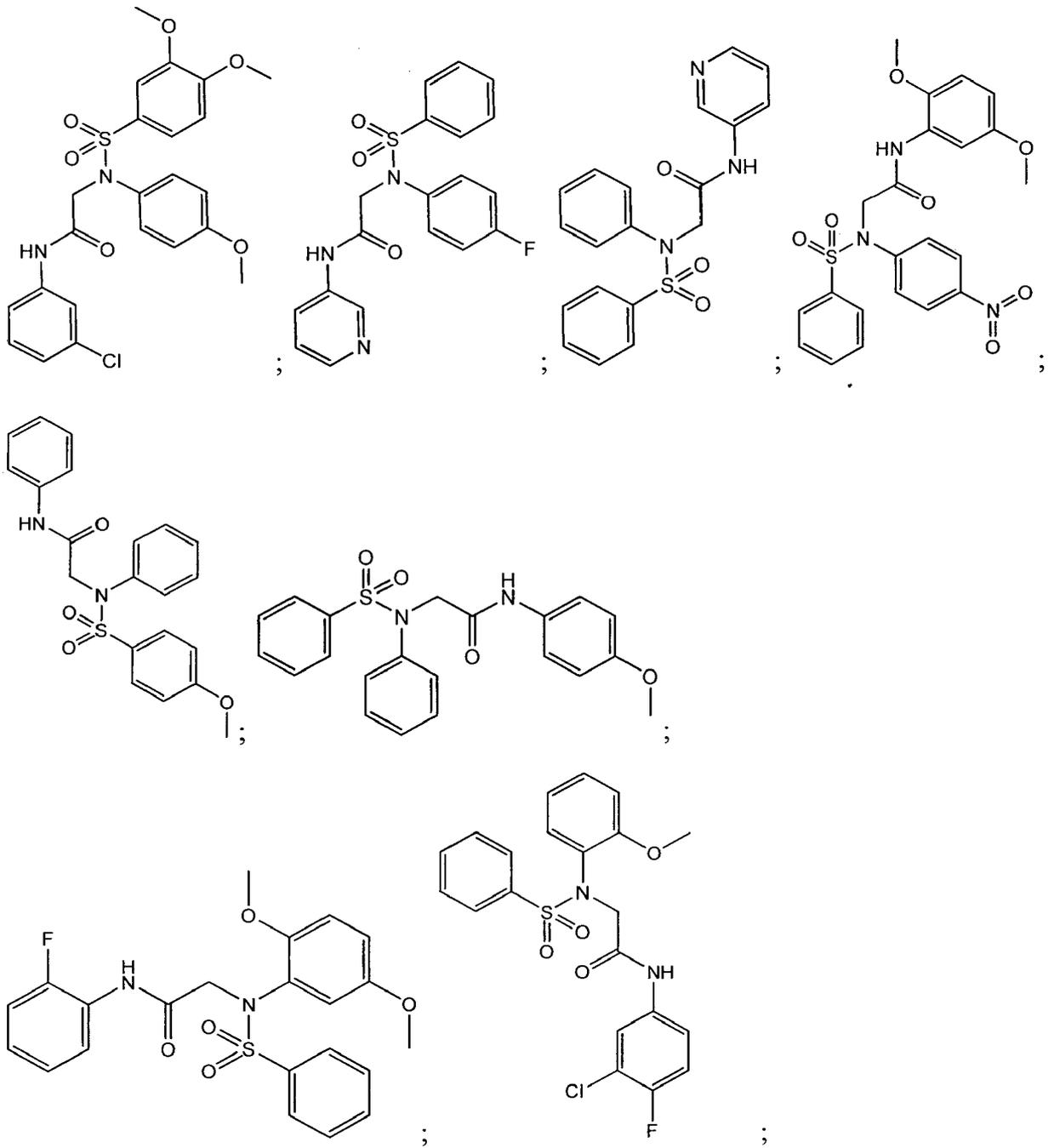
;

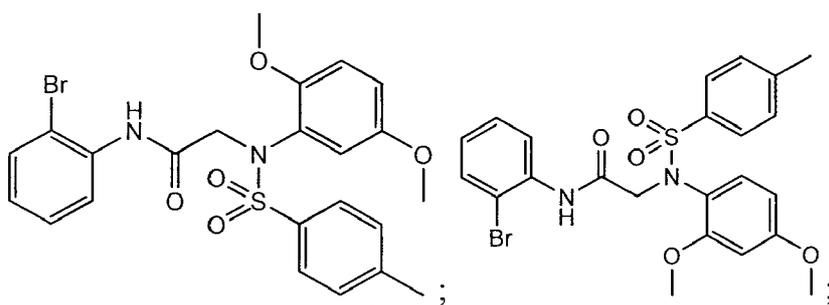
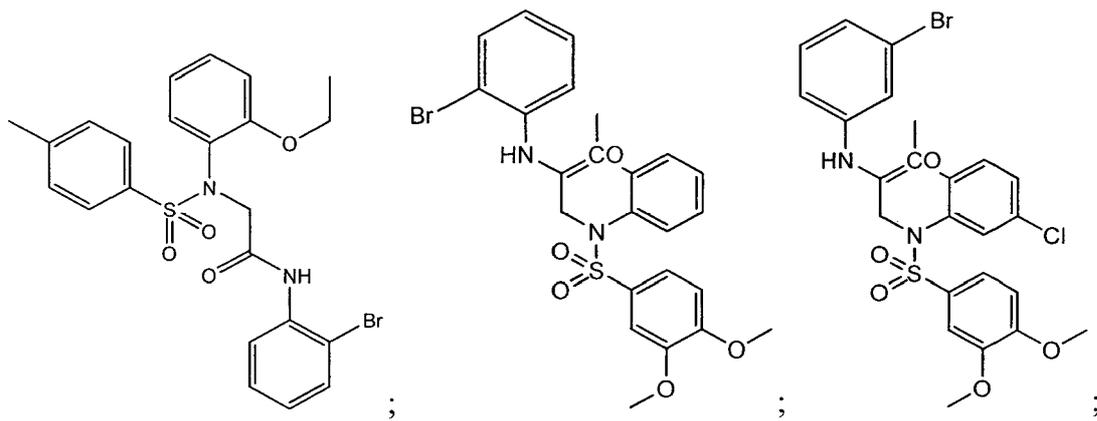
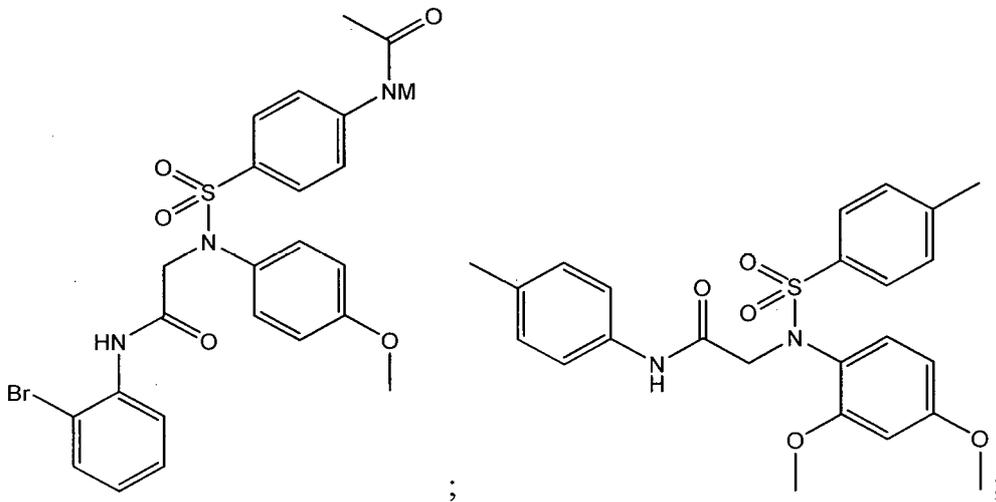
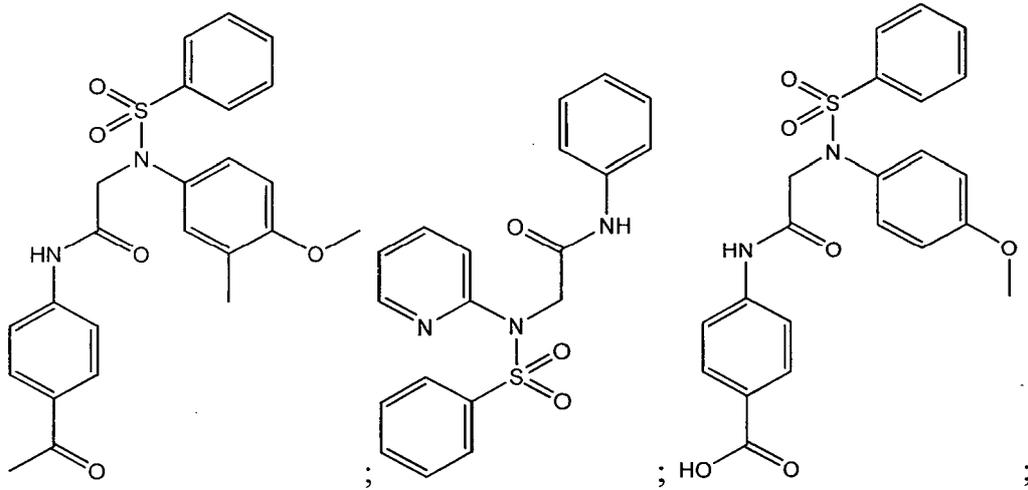


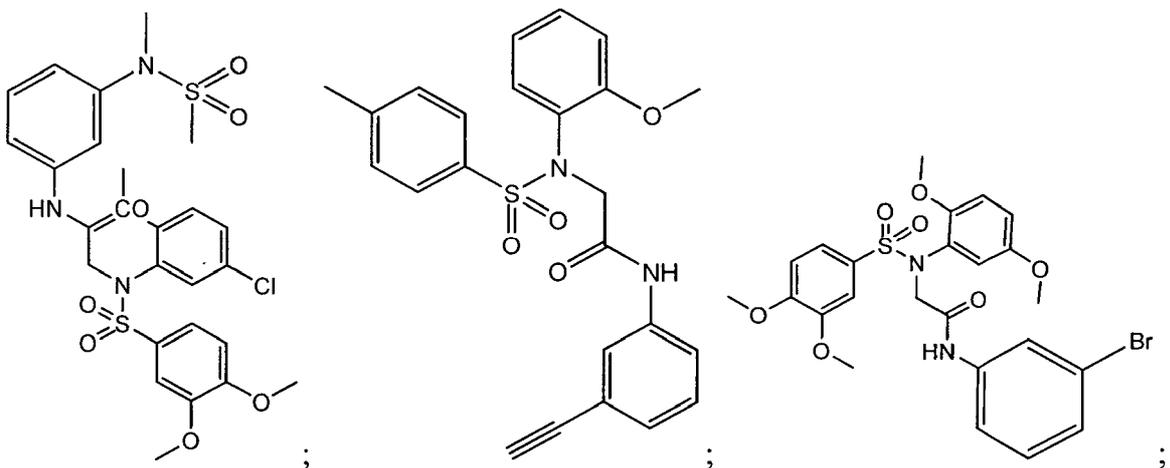
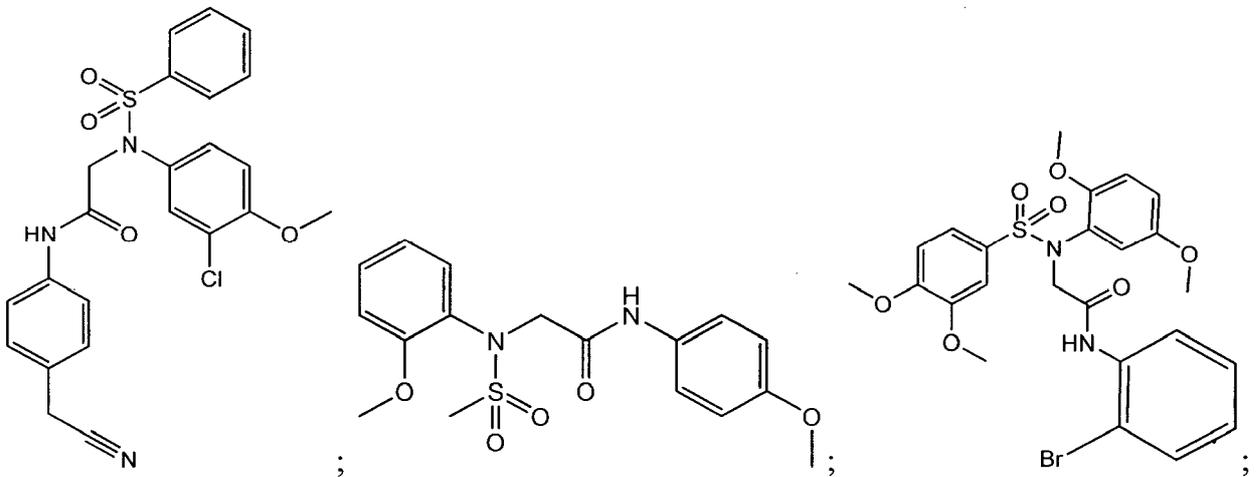
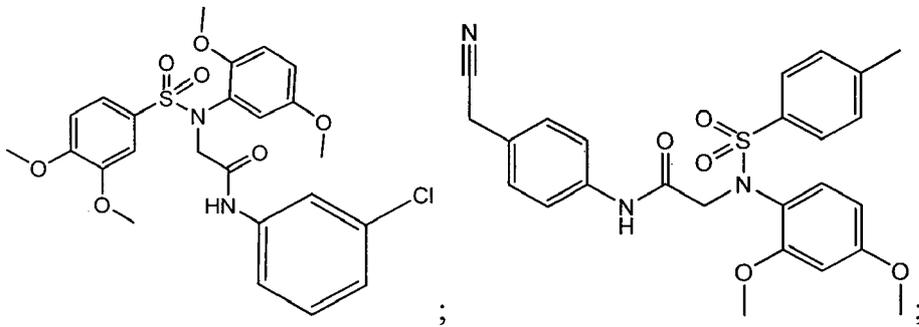
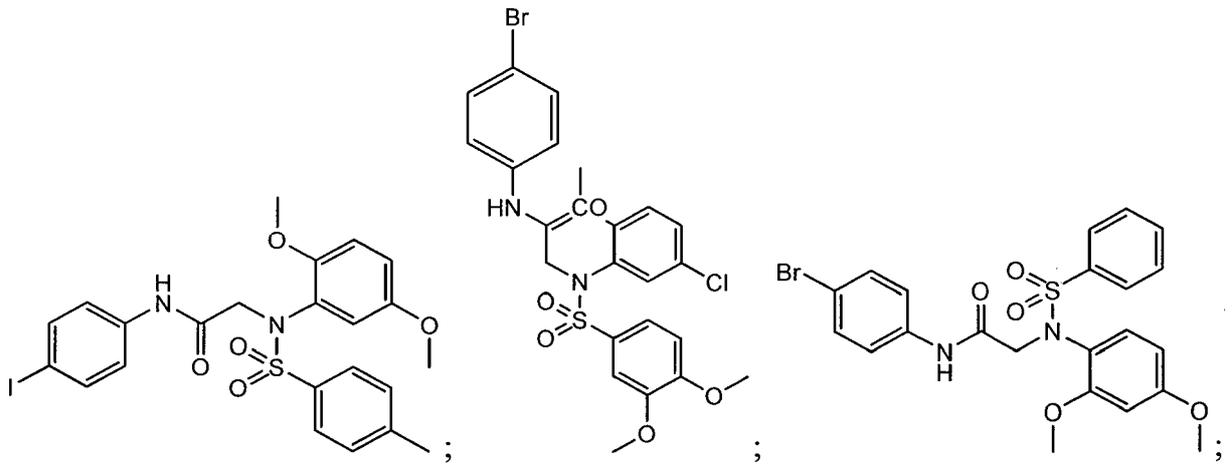


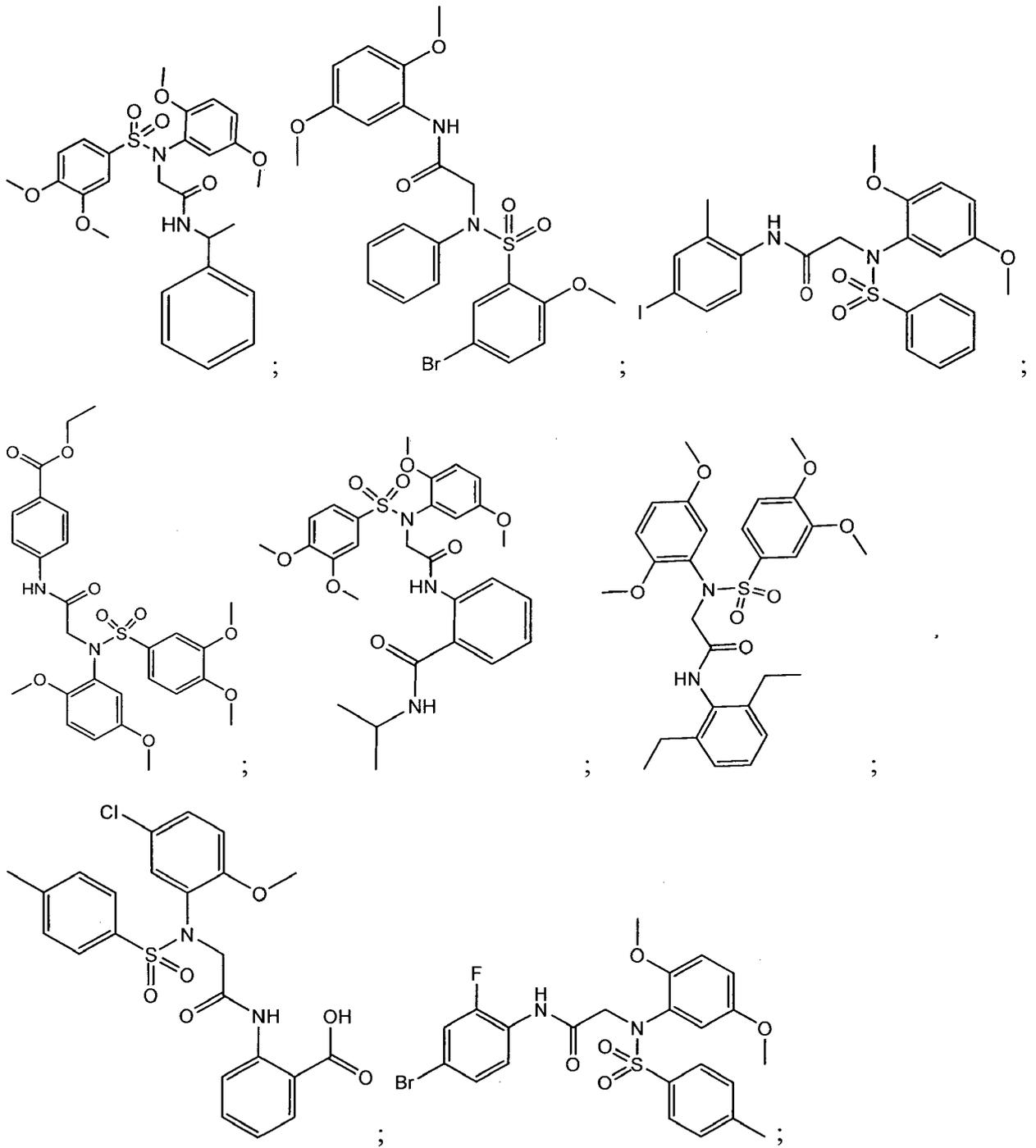
y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

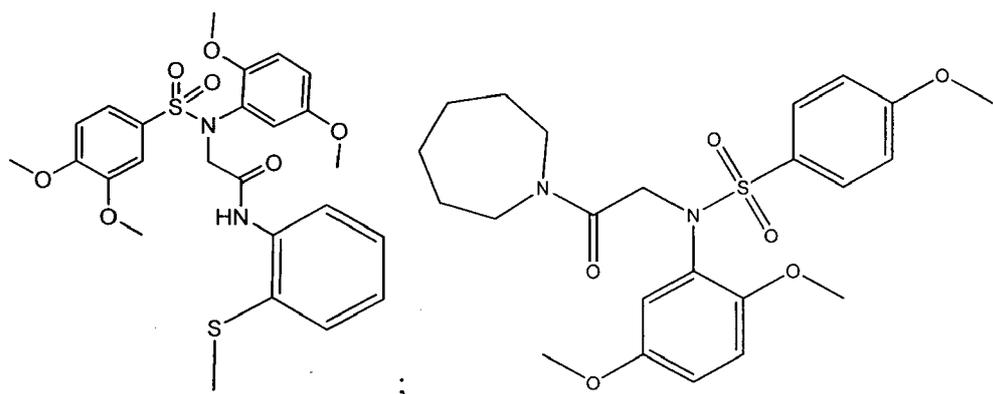












y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 Los activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden usarse para la prevención o el tratamiento de enfermedades que están asociadas con niveles reducidos de 15-PGDH y/o los niveles aumentados de prostaglandinas. El aumento de los niveles de 15-PGDH tisulares deben disminuir los niveles de prostaglandinas tisulares. Las actividades asociadas con compuestos que disminuyen las prostaglandinas tisulares incluyen reducir el desarrollo de tumores humanos. Por ejemplo, la administración de los activadores de 15-PGDH puede usarse para tratar pacientes con neoplasia de colon, por ejemplo, cáncer de colon o adenoma de colon, o para tratar y prevenir una nueva enfermedad en pacientes con un historial de neoplasia de colon, o para revertir la resistencia a la terapia con AINE para terapia para neoplasia o terapia preventiva para neoplasia. Además, la administración de los activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento puede usarse para tratar sujetos que tienen un estado que responde a AINE. En determinadas realizaciones, los activadores de 15-PGDH potencian la capacidad de respuesta a AINE en sujetos que carecen relativamente de respuesta al tratamiento con AINE.

Los activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento también pueden usarse en un método de tratamiento de cualquier estado que responde a AINE. El estado que responde a AINE se aplica a un sujeto que es resistente a AINE o un sujeto que se determinó que era resistente a la terapia con AINE. En el método, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de los activadores de 15-PGDH sola o en combinación con una cantidad eficaz de proteína 15-PGDH, ADNc o un fragmento activo de los mismos. El paciente puede ser un sujeto que corre el riesgo de desarrollar neoplasia de colon (por ejemplo, basado en el historial familiar), o un sujeto que corre el riesgo de desarrollar recidiva de adenoma de colon, pero que se sospecha que es resistente a la terapia con AINE. Además, el paciente puede ser cualquier sujeto que está sometiéndose o está a punto de someterse a terapia con AINE para cualquier estado que responde a AINE, pero que experimenta resistencia a AINE.

Los activadores de 15-PGDH descritos en el presente documento pueden proporcionarse en una composición farmacéutica que incluye portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el activador de 15-PGDH puede proporcionarse solo o en combinación con otros componentes (por ejemplo, un AINE), puede prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden “nebulizarse”) para administrarse mediante inhalación. El activador de 15-PGDH también pueden proporcionarse solo o en combinación con otros componentes en disoluciones acuosas y no acuosas, disoluciones estériles isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Pueden administrarse composiciones que incluyen el activador de 15-PGDH, por ejemplo, por vía oral, por vía nasal, de forma tópica, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal o por vía intratecal. Las formulaciones pueden presentarse en envases sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos de la clase descrita previamente. Los moduladores también pueden administrarse como parte de un fármaco o alimento preparado.

La dosis administrada a un paciente debe ser suficiente para inducir una respuesta beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. El nivel de dosis óptimo para cualquier paciente dependerá de una variedad de factores incluyendo la eficacia del modulador específico empleado, la edad, el peso corporal, la actividad física y la dieta del paciente, de una posible combinación con otros fármacos, y de la intensidad del caso de diabetes. Se recomienda que la dosificación diaria del activador de 15-PGDH pueda determinarse para cada paciente individual por los expertos en la técnica. También se determinará el tamaño de la dosis mediante la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto adverso que acompañe a la administración de un compuesto particular en un sujeto particular.

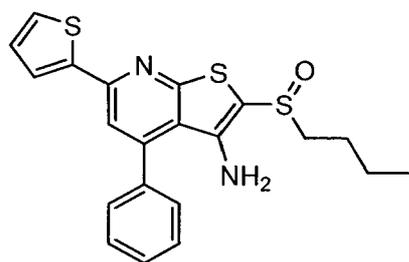
El activador de 15-PGDH puede administrarse en una terapia de combinación incluye administración de una única formulación de dosificación farmacéutica que contiene un activador de 15-PGDH y uno o más agentes activos adicionales, así como la administración de un activador de 15-PGDH y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica independiente. Por ejemplo, pueden administrarse un activador de 15-PGDH y celecoxib al sujeto humano conjuntamente en una única composición de dosificación oral, tal como un comprimido o

una cápsula, o cada agente puede administrarse en formulaciones formulación de dosificación farmacéutica independientes. En otras realizaciones, puede administrarse un AINE, por ejemplo, celecoxib o aspirina, con una cantidad eficaz del activador de 15-PGDH. Cuando se usan formulaciones de dosificación independientes, pueden administrarse un activador de 15-PGDH y uno o más agentes activos adicionales esencialmente al mismo tiempo (es decir, de manera concurrente), o en momentos escalonados por separado (es decir, secuencialmente). Se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

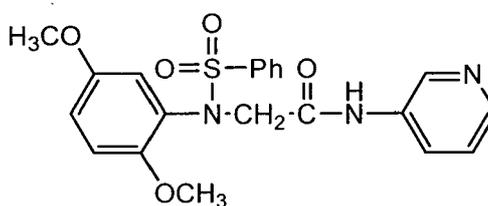
La invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente ejemplo, que no pretende limitar el alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplo 1

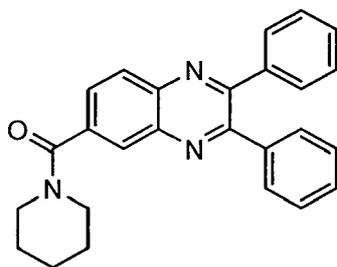
Este ejemplo describe las actividades de cuatro compuestos con respecto a la enzima 15-prostaglandina deshidrogenasa (15-PGDH) (codificada por el gen HPGD). Los compuestos son SW033291, SW054384, SW14531, SW145753 y tienen las siguientes fórmulas:



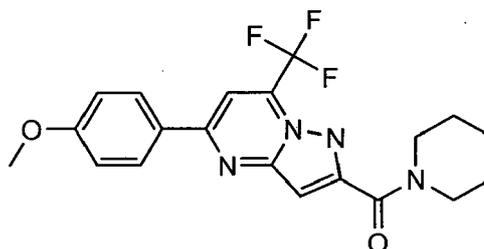
SW033291



SW054384



SW145753



SW124531

La figura 1 muestra que SW033291, SW054384 y SW145753 aumentan todos la actividad luciferasa de células que expresan un constructo de fusión de 15-PGDH-luciferasa creado mediante inserción génica dirigida de luciferasa de renilla en el último exón codificante de 15-PGDH. Se demuestra la actividad en tres líneas celulares de cáncer de colon diferentes todas modificadas por ingeniería para que contengan la fusión 15-PGDH-luciferasa. Estas líneas celulares son Vaco-9m (V9m), LS174T, Vaco503 (V503). SW054384 es en general el mejor inductor, y muestra máxima actividad a 6,25  $\mu\text{M}$ . El valor de 1,0 en el eje Y es el nivel basal de actividad indicadora en células tratadas con vehículo de DMSO sin fármaco.

La figura 2 muestra inmunotransferencias de tipo Western que demuestran que SW033291, SW054384 y SW145753 aumentan todos los niveles de proteína 15-PGDH en las líneas celulares V503, LS174T y V503 tratadas con compuesto 7,5  $\mu\text{M}$  durante 48 horas. Las células FET sin tratar proporcionan un control positivo para la expresión de 15-PGDH.

La figura 3 muestra inmunotransferencia de tipo Western que demuestra que SW124531 también aumenta los niveles de proteína 15-PGDH en líneas celulares de colon (se usan células FET tratadas con TGF- $\beta$  (10 ng/ml) durante 48 horas como control positivo para la expresión de 15-PGDH en determinados paneles).

La figura 4 muestra inmunotransferencia de tipo Western que demuestra que SW124531 5  $\mu\text{M}$  aumenta los niveles de proteína 15-PGDH (wt-PGDH) expresada a partir de un vector de expresión de ADNc en células V400-S3-2-32, y también aumenta los niveles de proteína de una 15-PGDH mutante catalíticamente inactivada ( $\mu$ -PGDH) también expresada a partir de un vector de expresión de ADNc en células V400-M3-2-72. Como estas proteínas se expresan a partir de un promotor de CMV heterólogo, los hallazgos sugieren que los compuestos actúan directamente sobre la estabilización de la proteína 15-PGDH. Los compuestos no muestran efectos sobre los niveles de una enzima relacionada, 17-beta-estradiol-deshidrogenasa.

La figura 5 muestra el aumento de los niveles de proteína 15-PGDH en células V503 tratadas con SW124531 tal como se somete a ensayo mediante inmunofluorescencia (dos filas superiores) y mediante inmunotransferencia de tipo Western (panel inferior).

Las figuras 6-9 muestran que SW033291, SW054384, SW145753 y SW124531 no alteran en general los niveles de ARNm de 15-PGDH en líneas celulares de cáncer de colon tratadas tal como se evalúa mediante PCR en tiempo real. La única excepción es el ligero aumento de ARNm de 15-PGDH en células V503 tratadas con SW033291, que es menor que la inducción de la proteína 15-PGDH así como los niveles de indicador 15-PGDH-luciferasa observados en células V503 tratadas con SW033291. En estos estudios se emplean líneas celulares parentales (que no contienen el indicador 15-PGDH-luciferasa).

La figura 10 muestra los efectos de tres compuestos sobre la actividad de 15-PGDH total en las líneas celulares tratadas con los compuestos. Se trataron las líneas celulares con compuestos a 7,5  $\mu\text{M}$  durante 48 horas, y entonces se sedimentaron. Se lisaron los sedimentos y se midió la actividad de 15-PGDH total y se normalizó con respecto a 1.000.000 células introducidas por sedimento. Se sometió a ensayo la actividad de 15-PGDH midiendo la transferencia de tritio de 15(S)-[15-3H]-PGE<sub>2</sub> a glutamato mediante acoplamiento de 15-PGDH con glutamato deshidrogenasa tal como se describe en (Chi X, Libreman BM, Tong M, Zhao Y, Tai HH. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is upregulated by flurbiprofen and other non-esteroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer HT29 células. Arch Biochem Biophys. 2009; 487(2):139-45.). Se mide la actividad como pmol de PGE<sub>2</sub>/min/millón de células. Tal como se muestra, SW033291 inhibe notablemente la actividad de 15-PGDH en las tres líneas celulares sometidas a prueba. Se concluye que aunque SW033291 aumenta los niveles de proteína 15-PGDH total en células, también inactiva la actividad enzimática de 15-PGDH.

En cambio, se aumenta la actividad enzimática de 15-PGDH en células tratadas con SW054384 y en células tratadas con SW145753.

La figura 11 muestra el efecto sobre la actividad de la proteína 15-PGDH recombinante (una proteína de fusión 15-PGDH-GST) incubada con concentraciones variables de los compuestos de prueba, con actividad de 15-PGDH a través de un intervalo de concentraciones de compuesto registradas en la tabla y presentadas visualmente en los gráficos correspondientes. Tal como se muestra, SW033291 es un potente inhibidor de la actividad de 15-PGDH, con una CI50 de <1,25 nM. Esto contrasta con la CI50 de entre 25 nM-62,5 nM medida para el inhibidor de 15-PGDH comercial disponible de Cayman Chemical (artículo de catálogo de Cayman 10638, número de Cayman Chemical 13695).

La figura 11 también muestra que a una concentración muy alta SW054384 puede inhibir la actividad de 15-PGDH recombinante, con una CI50 de entre 5  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ . Se concluye que SW054384 aumenta el nivel y la actividad de 15-PGDH total en células tratadas con compuesto 7,5  $\mu\text{M}$ , pero puede inhibir ensayos *in vitro* de proteína 15-PGDH recombinante *in vitro* usando compuesto 5  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ .

La figura 11 también muestra que SW145753 puede inhibir la actividad de la enzima 15-PGDH recombinante en un ensayo *in vitro* a una CI50 de entre 12-6,25 nM. Esto sugiere la actividad de SW145753 en el aumento frente a en la inhibición de la actividad de 15-PGDH puede ser discordante en células frente al ensayo *in vitro* (debido quizás al lavado de fármacos cuando se lavan las células), o puede depender de la concentración.

La figura 12 muestra pruebas repetidas de los efectos de SW033291 y SW054384 sobre la actividad de la proteína 15-PGDH recombinante sometida a prueba *in vitro*. Se realizaron los ensayos midiendo la transferencia de tritio de 15(S)-[15-3H] PGE<sub>2</sub> a glutamato (a 1  $\mu\text{M}$  de sustrato de PGE<sub>2</sub>) mostrado a la izquierda (paneles A, C), o mediante monitorización por fluorescencia directa de la generación de NADH por 15-PGDH (realizado a 20  $\mu\text{M}$  de sustrato de PGE<sub>2</sub>) mostrado a la derecha (paneles B, D). Se confirma de nuevo SW033291 como inhibidor de 15-PGDH sumamente potente con una CI50 de 0,7 nM tal como se mide en el ensayo de tritio y una CI50 de 1,6 nM tal como se mide en el ensayo de fluorescencia. La insensibilidad relativa de la CI50 a la concentración de sustrato sugiere que SW033291 es un inhibidor de 15-PGDH no competitivo.

SW054384 muestra una actividad inhibidora muy débil, con CI50 que son 10.000 veces mayores que la de SW033291 (8,4  $\mu\text{M}$  y 11  $\mu\text{M}$  en los ensayos basados en tritio y fluorescencia, respectivamente). Esto concuerda con que la actividad de SW054384 esté en equilibrio para aumentar el nivel de proteína 15-PGDH y la actividad enzimática en células.

La figura 13 muestra los resultados de ensayos de la actividad de 15-PGDH usando el método de tritio en células tratadas con SW124531 (panel superior) y en proteína 15-PGDH recombinante tratada con SW124531 (panel inferior). SW124531 muestra la actividad en el aumento de la actividad de 15-PGDH en la mayor parte de líneas celulares, aunque esta actividad es la mejor en las líneas celulares en las que la actividad basal de 15-PGDH es >10 unidades. SW124531 también inhibe la actividad de proteína 15-PGDH recombinante a una CI50 de 50 nM.

La figura 14 muestra un ensayo de diferentes compuestos para determinar su capacidad para unirse directamente a una proteína 15-PGDH recombinante tal como se mide mediante el cambio de la temperatura de fusión de la proteína. La fusión de la proteína va seguida por la medición de la fluorescencia del colorante naranja SYPRO (n.º Sigma S5692) que aumenta a medida que se une el colorante a residuos hidrófobos expuestos a medida que se funde. El gráfico en la parte superior izquierda muestra las curvas de fusión de 15-PGDH con todos los ensayos realizados en presencia de los diferentes compuestos superpuestos entre sí. El gráfico en la parte superior derecha representa gráficamente la derivada negativa de la fluorescencia frente a la temperatura para cada una de las curvas mostradas a la izquierda, midiéndose el punto de fusión como la temperatura del pico negativo (es decir, el punto de cambio más rápido en la fluorescencia frente a la representación gráfica de temperatura). Los resultados se muestran en forma tabular en la tabla a continuación. Se usa lapatinib como control negativo. No hay unión de ningún fármaco en ausencia de cofactor enzimático (o bien NAD o bien NADH). En presencia de o bien NAD o bien NADH, SW033291 crea dos picos en la curva de fusión, desplazándose uno de estos picos 15 grados centígrados, acorde con la unión de SW033291 directamente a 15-PGDH. SW124531 y SW145753 también muestran evidencias de unión directa a 15-PGDH. En este ensayo, no puede demostrarse que SW054384 se una a 15-PGDH. Es posible que SW054384 sí que se una a 15-PGDH, pero que la unión sea débil y se funda a una temperatura por debajo de la temperatura de fusión de la proteína 15-PGDH. Se realizaron los ensayos tanto a 10  $\mu\text{M}$  como a 100  $\mu\text{M}$  de cofactor (sometiendo a prueba tanto NAD como NADH), que se compara bien con la  $K_m$  publicada de NAD de 15,8  $\mu\text{M}$ .

La figura 15 muestra que ninguno de los cuatro compuestos sometidos a prueba induce un desplazamiento en la temperatura de fusión de la proteína 15-PGDH mutante catalíticamente inactiva. Se interpreta que la inducción de proteína mutante 15-PGDH por SW124531 sugiere que es probable que SW124531 tenga una unión débil a 15-PGDH mutante que puede estabilizar la proteína a 37°C, pero fundiéndose el fármaco a una temperatura por debajo de 50°C, que es la temperatura de fusión de la proteína.

La figura 16 muestra la modulación *in vivo* por los compuestos de actividad de 15-PGDH tal como se refleja en los niveles de  $\text{PGE}_2$  que se someten a ensayo en el medio de células A549 que se han estimulado por IL1-beta durante 23 horas, añadiéndose compuesto durante las últimas 5 horas (barras de color azul). El incremento del nivel de  $\text{PGE}_2$  muestra la clara inhibición de la actividad de 15-PGDH en las células mediante adición de SW033291 (así como SW145753, SW124531, y un inhibidor de 15-PGDH comercial de Cayman Chemical. En una iteración adicional (barras de color rojo)(2), se añadió SW054384 comenzando 24 horas antes de la adición de IL1-beta, y entonces se mantuvo durante las siguientes 26 horas en presencia de IL1-beta. El menor nivel de  $\text{PGE}_2$  produjo respaldo de que en estas células SW054384 aumentó la actividad de 15-PGDH. El panel a la izquierda muestra datos sin procesar; mientras que el panel a la derecha muestra datos normalizados para los números de células presentes al final del experimento. Se someten a ensayo los niveles de  $\text{PGE}_2$  mediante ELISA.

La figura 17 muestra el efecto de respuesta a la dosis en SW033291 sobre la producción de  $\text{PGE}_2$  de células A549 tratadas con IL1-beta, tal como se refleja en los niveles de  $\text{PGE}_2$  que se someten a ensayo en el medio de células A549 que se han estimulado por IL1-beta durante 24 horas, añadiéndose SW033291 durante las últimas 8 horas.

La figura 18 muestra las modulaciones *in vivo* por compuestos de actividad de 15-PGDH a 2,5  $\mu\text{M}$  tal como se refleja en los niveles de  $\text{PGE}_2$  tras la adición de  $\text{PGE}_2$  al medio de células Vaco-503. En este estudio, se tratan células con compuesto durante 24 horas después de que se añade  $\text{PGE}_2$  al medio. Después de 24 horas más, se someten a ensayo mediante ELISA los niveles de  $\text{PGE}_2$  que quedan en el medio. Los datos marcados como "medio" son un carril de control con  $\text{PGE}_2$  añadido a medio solo, en ausencia de células. Los datos marcados como DMSO es un control en el que se tratan células con DMSO solo (el diluyente para los compuestos). La diferencia entre los carriles de "medio" y "DMSO" representa la degradación dependiente de células de  $\text{PGE}_2$  por 15-PGDH. Se demuestra de nuevo el claro bloqueo completo de la actividad de 15-PGDH mediante adición de SW033291 a 2,5  $\mu\text{M}$ , tal como se refleja mediante el bloqueo en la degradación de  $\text{PGE}_2$ . Se demuestra adicionalmente la estimulación de la actividad de 15-PGDH por SW054384, tal como se refleja mediante el aumento de la degradación de  $\text{PGE}_2$ .

La figura 19 muestra la actividad de SW033291 a 2,5  $\mu\text{M}$  en la aceleración de la cicatrización de una herida modelo que consiste en un arañazo en una monocapa de células HaCaT observado a lo largo de 48 horas de tratamiento. TGF-beta sirve como control positivo en el ensayo.

La figura 20 muestra la cuantificación de la anchura del arañazo a las 0 y 48 horas en las células de control tratadas con SW033291 a 2,5  $\mu\text{M}$  y las células tratadas con TGF-beta (1 ng/ml).

## Ejemplo 2

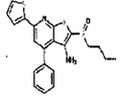
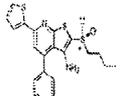
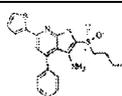
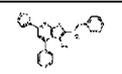
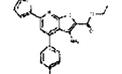
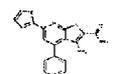
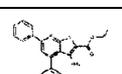
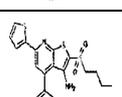
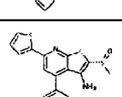
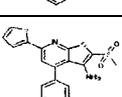
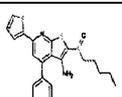
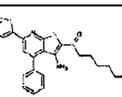
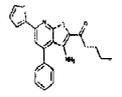
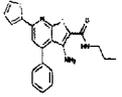
### Análisis de análogos de compuestos principales SW033291, un inhibidor de 15-PGDH

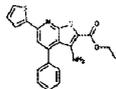
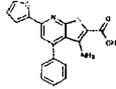
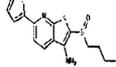
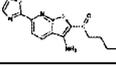
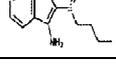
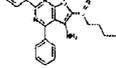
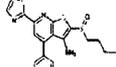
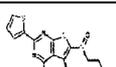
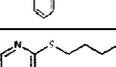
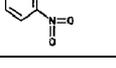
Este ejemplo proporciona datos sobre un grupo de análogos estructurales de SW033291. Los datos proporcionados incluyen el nivel de inducción de un indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa, registrado como % de aumento de actividad luciferasa con respecto al nivel basal, en tres líneas celulares de cáncer de colon, V9m, V503 y LS174T,

modificadas por ingeniería para que contengan el indicador, y tratadas con compuesto o bien 2,5  $\mu$ M o bien 7,5  $\mu$ M (es decir, se registran los valores en una escala en la que 100 indica duplicación de la actividad luciferasa con respecto al nivel inicial). También se registra la CI50 de cada compuesto para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH recombinante en un ensayo *in vitro*.

5

Tabla 2

Estructuras	ID	Inhibición de enzima (CI <sub>50</sub> , nM)	Actividad indicadora de V9M (2,5 $\mu$ M)	Actividad indicadora de V9M (7,5 $\mu$ M)	Actividad indicadora de LS174T (2,5 $\mu$ M)	Actividad indicadora de LS174T (7,5 $\mu$ M)	Actividad indicadora de V503 (2,5 $\mu$ M)	Actividad indicadora de V503 (7,5 $\mu$ M)
	SW033291	1,23 nM	98,24	93,16	123,46	106,73	126,32	99,34
	Isómero B de SW033291	0,76 nM	Nota: Las estructuras mostradas son con fines ilustrativos. No se sabe qué estructura corresponde al isómero A o B. La actividad residual del isómero A puede deberse a pequeñas cantidades del isómero B presentes en la preparación					
	Isómero A de SW033291	56,56 nM	Nota: Las estructuras mostradas son con fines ilustrativos. No se sabe qué estructura corresponde al isómero A o B. La actividad residual del isómero A puede deberse a pequeñas cantidades del isómero B presentes en la preparación					
	SW033292		1,51					
	413423		-5,65	-8,76	3,41	3,91	7,89	3,13
	980653		8,83	11,96	5,76	10,99	-10,47	-15,21
	405320		8,77	-15,45	9,95	-2,57	-7,73	-33,68
	SW208078	25 nM	36,16	34,90	72,71	40,01	87,73	83,77
	SW208079	125 nM	36,01	32,75	53,42	43,83	85,29	61,82
	SW033290	525 nM	-34,33	-25,45	-0,24	-6,58	30,93	17,71
	SW208080	2,64 nM	102,08	98,65	117,81	116,64	103,70	127,19
	SW208081	18 nM	37,79	63,56	64,53	95,14	90,46	105,37
	SW206976	>7,5 $\mu$ M	11,80	17,51	42,38	20,56	16,79	49,53
	SW206977	>7,5 $\mu$ M	3,5028	0,45	34,88	29,35	33,00	37,62

	SW206978	>7,5 uM	7,5141	8,02	31,44	26,19	38,84	35,75
	SW206979	>7,5 uM	-12,59	-20,62	34,26	32,79	21,66	42,92
	SW206980	0,97 nM	99,37	92,71	117,24	92,15	129,57	108,51
	SW206992	1,411 nM	86,44	121,75	85,81	72,03	161,20	145,39
	SW208064	151,4 nM	82,58	50,11	126,18	96,23	126,18	96,23
	SW208065	4,865 nM	120,19	118,92	73,50	87,74	73,50	87,74
	SW208066	1,368 nM	122,72	111,63	123,89	93,74	123,89	93,74
	SW208067	2,395 nM	121,69	108,47	94,30	79,63	94,30	79,63
	SW208068	>7,5 uM	12,90	12,35	14,90	15,00	14,90	15,00
	SW208069	>7,5 uM	-14,48	0,23	19,47	15,13	19,47	15,13
	SW208070	>7,5 uM	22,56	12,11	19,69	15,43	19,69	15,43

Se observó en primer lugar que la actividad inhibidora de 15-PGDH de SW033291 es de al menos el 98% debido a la actividad de uno de los dos isómeros ópticos de este compuesto, designados como isómeros A y B. No se ha establecido aún la asignación estructural del isómero A frente al isómero B.

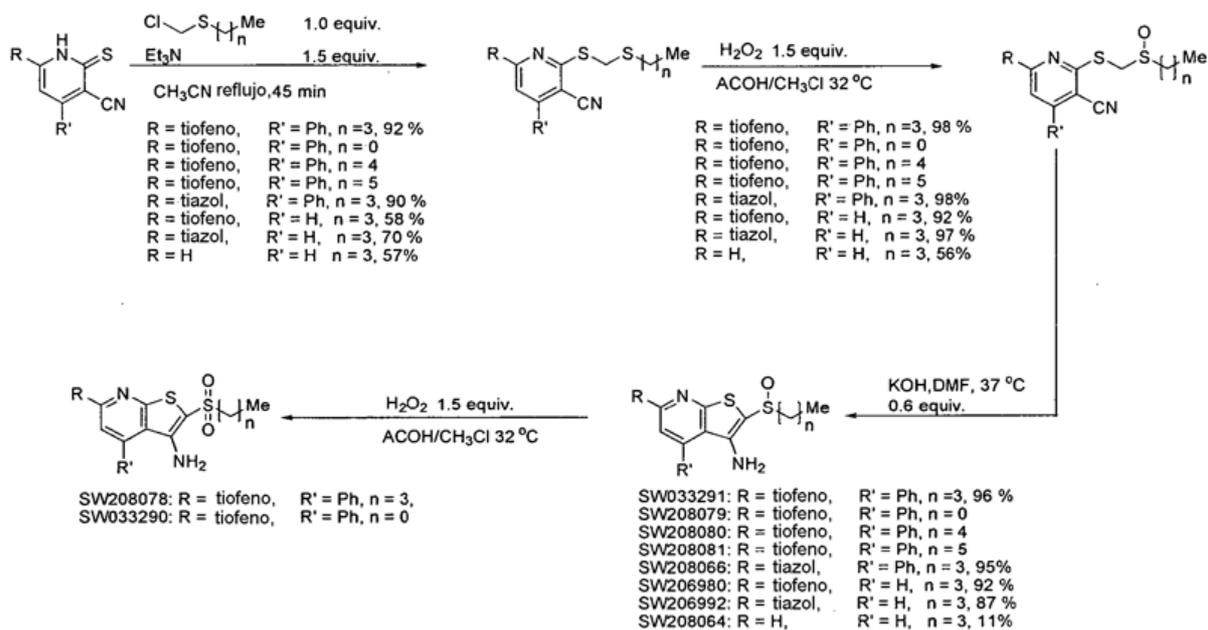
5 Hay un efecto importante de la longitud de la cadena lateral carbonada de SW033291 sobre la CI50 para inhibir la 15-PGDH recombinante *in vitro*. En comparación con SW033291 (4 carbonos): SW208080 (5 carbonos) tiene una CI50 1,5 veces mayor, SW208081 (6 carbonos) tiene una CI50 10 veces mayor, y SW208079 (1 carbono) tiene una CI50 más de 60 veces mayor, con una pérdida notable de actividad en la inducción de los indicadores de línea celular.

10 El grupo sulfóxido parece ser un sustituyente crítico, ya que las sustituciones inactivas del sulfóxido incluyen los correspondientes: cetona (SW206976), amida (SW206977), éster (SW206978) y ácido carboxílico (SW206979). Sin embargo, se observa actividad inhibidora para los análogos de sulfona.

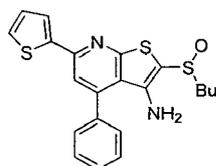
15 La delección del grupo fenilo en SW033291 (SW206980) reduce la CI50 a la mitad. SW206980 continúa siendo un compuesto altamente activo en la inducción de indicador cuando se aplica a líneas celulares indicadoras a una concentración de 2,5 uM.

### 20 Ejemplo 3

El siguiente ejemplo describe la síntesis de SW033291 y análogos del mismo así como proporciona confirmación mediante espectrometría de masas-RMN de las estructuras.



Esquema 1

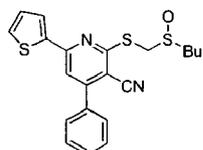


5

Se preparó SW033291 2-((butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando el procedimiento descrito por Kalugin. A la disolución de 4-(((butiltio)metil)sulfinil)-2,6-difenilpirimidin-5-carbonitrilo (0,53 mmol, 220 mg) en DMF (0,25 M)/EtOH (0,5 M) se le añadió KOH (0,32 mmol, 18 mg, 0,6 equiv., 0,1 M en agua). Se agitó la mezcla de reacción a 35°C durante 40 min. Una vez que se completó, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución ac. al 10% de un ácido de carácter ácido, se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida dando 211 mg de SW033291 2-((butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina (96%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,67 - 7,60 (m, 1H), 7,57 - 7,35 (m, 7H), 7,10 (dd, J = 5,0, 3,7 Hz, 1H), 4,54 (s, 2H), 3,26 (ddd, J = 12,8, 9,1, 6,0 Hz, 1H), 3,09 (ddd, J = 12,8, 9,1, 6,6 Hz, 1H), 1,83 - 1,61 (m, 2H), 1,53 - 1,38 (m, 2H), 0,93 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 413 [M+H]<sup>+</sup>.

10

15



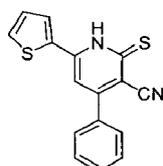
20

2-(((Butiltio)metil)sulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)nicotinonitrilo. Se añadieron ácido acético (900 μl) y peróxido de hidrógeno (0,57 mmol, 1,5 equiv., disolución al 30% en agua) a la disolución de 2-(((butiltio)metil)sulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)nicotinonitrilo (0,38 mmol, 150 mg) en cloroformo (900 μl). Se agitó la mezcla de reacción a 32°C durante 45 min. Entonces se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida dando 153 mg del producto designado (98%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,75 (dd, J = 3,8, 1,1 Hz, 1H), 7,66 - 7,57 (m, 2H), 7,58 - 7,51 (m, 4H), 7,47 (s, 1H), 7,16 (dd, J = 5,0, 3,8 Hz, 1H), 4,74 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 4,41 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 2,97 (dt, J = 13,0, 8,2 Hz, 1H), 2,81 (dt, J = 12,9, 7,3 Hz, 1H), 1,94 - 1,76 (m, 2H), 1,53 - 1,38 (m, 2H), 0,94 (t, J = 7,4 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 413 [M+H]<sup>+</sup>

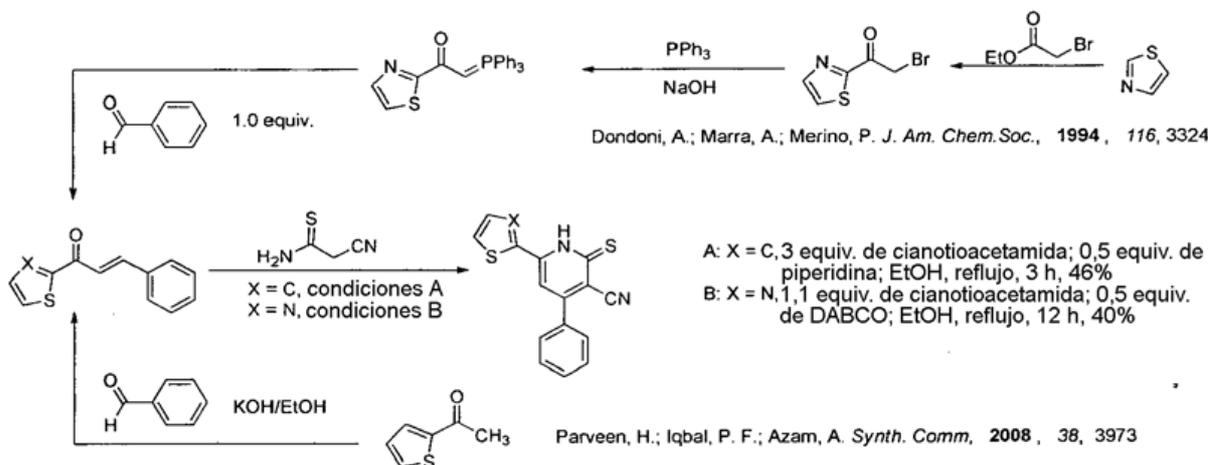
25



5 2-(((Butil)metil)tio)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)nicotinonitrilo. Se puso a reflujo una mezcla de 4-fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,34 mmol, 101 mg), butil(clorometil)sulfano (0,34 mmol, 48 mg, 1,0 equiv.) y Et<sub>3</sub>N (0,51 mmol, 72  $\mu$ l, 1,5 equiv.) en CH<sub>3</sub>CN seco (350  $\mu$ l) durante 20 min. Entonces se diluyó la mezcla de reacción con EtOAc y agua. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc. Se lavaron las extracciones combinadas con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo mediante cromatografía ultrarrápida dando 124 mg del producto designado (92%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,70 (dd, J = 3,8, 1,1 Hz, 1H), 7,64 - 7,56 (m, 1H), 7,55 - 7,47 (m, 5H), 7,40 (d, J = 1,1 Hz, 1H), 7,14 (dd, J = 5,0, 3,8 Hz, 1H), 4,53 (s, 2H), 2,74 (t, J = 8,0 Hz, 2H), 1,72 - 1,57 (m, 2H), 1,49 - 1,34 (m, 2H), 0,90 (t, J = 7,4 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 397 [M+H]<sup>+</sup>.

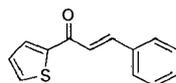


15 4-Fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo. A una disolución de 3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona (2,34 mmol, 500 mg) y cianotioacetamida (7,0 mmol, 717 mg, 3,0 equiv.) en etanol (7  $\mu$ l), se le añadieron unas cuantas gotas de piperidina. Se puso a reflujo la reacción durante 3 h. Se recogió el sólido que se formó y se recristalizó en ácido acético dando el producto designado con un rendimiento aislado del 46%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8,17 (d, J = 3,8 Hz, 1H), 7,96 (d, J = 5,0 Hz, 1H), 7,74-7,62 (m, 2H), 7,54 (dd, J = 5,1, 2,0 Hz, 3H), 7,31 - 7,19 (m, 1H), 7,01 (s, 1H). ESI-EM (m/z): 295 [M+H]<sup>+</sup>.

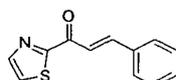


Esquema 2

25

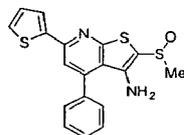


30 Se preparó 3-fenil-1-(tiofen-2-il)prop-2-en-1-ona a partir de benzaldehído y 1-(tiofen-2-il)etanona mediante condensación aldólica usando el procedimiento descrito por Azam mostrado en el esquema 2. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,88 - 7,80 (m, 2H), 7,67 (dd, J = 4,9, 1,1 Hz, 1H), 7,66 - 7,59 (m, 2H), 7,47 - 7,34 (m, 4H), 7,18 (dd, J = 5,0, 3,8 Hz, 1H). ESI-EM (m/z): 215 [M+H]<sup>+</sup>.

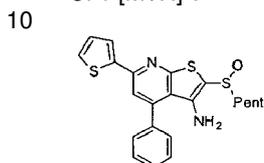


35 Se preparó 3-fenil-1-(tiazol-2-il)prop-2-en-1-ona mediante reacción de Wittig usando el procedimiento descrito por

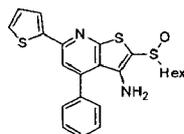
Merino mostrado en el esquema 2.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, cloroformo-*d*)  $\delta$  8,06 (d,  $J = 3,0$  Hz, 1 H), 7,99 (s, 1H), 7,96 (s, 1H), 7,75 – 7,67 (m, 3H), 7,44 – 7,38 (m, 3H). ESI-EM (m/z): 216  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



5 Se preparó SW208079-1-A 2-(metilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,67-7,50 (m, 5H), 7,50 – 7,36 (m, 3H), 7,16 – 7,09 (m, 1H), 4,58 (s, 2H), 2,99 (s, 3H). ESI-EM (m/z): 371  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



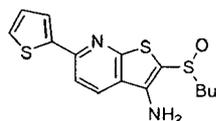
10 Se preparó SW208080-1-A 2-(pentilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  7,98-7,36 (m, 8H), 7,33 – 6,85 (m, 1H), 4,47 (s, 2H), 3,28 – 3,15 (m, 1H), 3,09 – 2,99 (m, 1H), 1,81 – 1,59 (m, 2H), 1,50 – 1,25 (m, 4H), 0,88 (t,  $J = 7,2$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 427  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



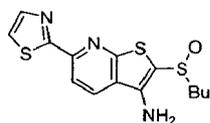
15 Se preparó SW208081-1-A 2-(hexilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  7,78-7,66 (m, 1H), 7,63 – 7,46 (m, 7H), 7,27 – 7,02 (m, 1H), 4,11 (s, 2H), 3,43 – 3,20 (m, 1H), 3,11 (ddd,  $J = 13,8, 9,4, 6,4$  Hz, 1H), 1,89 – 1,63 (m, 2H), 1,58 -1,39 (m, 4H), 1,40 – 1,21 (m, 2H), 0,91 (d,  $J = 6,8$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 441  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



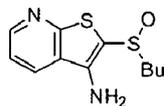
20 Se preparó SW208066, 2-(butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiazol-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,06 (s, 1H), 7,92 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 7,65 – 7,39 (m, 6H), 4,63 (s, 2H), 3,28 (ddd,  $J = 12,8, 9,0, 6,2$  Hz, 1H), 3,11 (ddd,  $J = 12,8, 9,0, 6,8$  Hz, 1H), 1,85 – 1,63 (m, 2H), 1,56 – 1,42 (m, 2H), 0,94 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 414  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



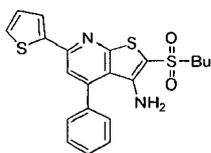
35 Se preparó SW206980, 2-(butilsulfinil)-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,79 (d,  $J = 8,5$ , 1H), 7,65 – 7,49 (m, 2H), 7,39 (dt,  $J = 5,1, 0,7$  Hz, 1H), 7,06 (dd,  $J = 5,0, 3,7$ , Hz, 1H), 5,20 (s, 2H), 3,26 (ddd,  $J = 12,8, 9,0, 6,2$  Hz, 1H), 3,10 (ddd,  $J = 12,8, 9,1, 6,6$  Hz, 1H), 1,78-1,60 (m, 2H), 1,55 – 1,39 (m, 2H), 0,92 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 337  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



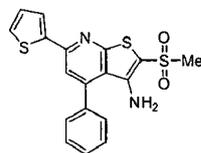
5 Se preparó SW206992, 2-(butilsulfinil)-6-(tiazol-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,15 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,95 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,90 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 7,44 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 3,29 (ddd,  $J = 12,7, 9,0, 6,2$  Hz, 1H), 3,13 (ddd,  $J = 12,8, 9,0, 6,7$  Hz, 1H), 1,83 – 1,61 (m, 2H), 1,59 – 1,38 (m, 2H), 0,92 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 338  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



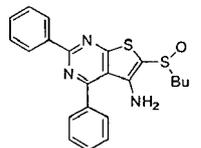
10 Se preparó SW208064, 2-(butilsulfinil)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW033291 y mostrados en el esquema 1.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,61 (dd,  $J = 4,7, 1,6$  Hz, 1H), 7,89 (dd,  $J = 8,1, 1,6$  Hz, 1H), 7,33 (dd,  $J = 8,1, 4,6$  Hz, 1H), 3,39 – 3,18 (m, 1H), 3,20 – 3,03 (m, 1H), 1,74 (p,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,63 – 1,38 (m, 2H), 0,94 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 255  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



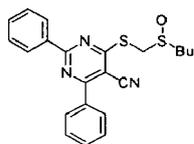
15  
20  
25 SW208078-1-A 2-(butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina. Se añadieron ácido acético (50  $\mu\text{l}$ ) y peróxido de hidrógeno (0,036 mmol, 1,5 equiv., disolución al 30% en agua) a la disolución de SW033291 2-(butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina (0,024 mmol, 10 mg) en cloroformo (50  $\mu\text{l}$ ). Se agitó la mezcla de reacción a 32°C durante 4 h. Se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida dando 2-(butilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina en bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con un rendimiento aislado del 8%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,71 (d,  $J = 3,8$  Hz, 1H), 7,64 – 7,54 (m, 3H), 7,53 – 7,42 (m, 4H), 7,15 (dd,  $J = 5,0, 3,7$  Hz, 1H), 5,09 (s, 2H), 3,38 – 3,02 (m, 2H), 1,92-1,67 (m, 2H), 1,52 – 1,28 (m, 2H), 0,92 (t,  $J = 7,4$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 429  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



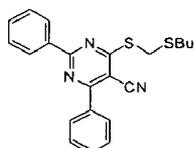
30 Se preparó SW033290-2-A 2-(metilsulfinil)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-3-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW208078-1-A y mostrados en los esquemas 1 y 2.  $^1\text{H-RMN}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,78 – 7,68 (m, 1H), 7,64 – 7,54 (m, 3H), 7,53 – 7,45 (m, 4H), 7,18 – 7,10 (m, 1H), 5,08 (s, 2H), 3,14 (s, 3H). ESI-EM (m/z): 387  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .



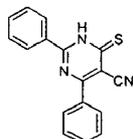
35  
40  
45 SW208065, 6-(butilsulfinil)-2,4-difeniltieno[2,3-d]pirimidin-5-amina. A la disolución de 4-(((butiltio)metil)sulfinil)-2,6-difenilpirimidin-5-carbonitrilo (0,07 mmol, 30 mg) en DMF (0,25 M) se le añadió KOH (0,035 mmol, 2 mg, 0,5 equiv., 0,1 M en agua). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 min. Una vez que se completó, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución ac. al 5% de un ácido de carácter ácido. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida dando el producto en bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida con un rendimiento aislado del 70%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,73 – 8,37 (m, 2H), 7,78 – 7,68 (m, 2H), 7,66 – 7,55 (m, 3H), 7,53 – 7,40 (m, 3H), 4,83 (s, 2H), 3,30 (ddd,  $J = 12,7, 8,9, 6,3$  Hz, 1H), 3,21 – 3,01 (m, 1H), 1,87 – 1,66 (m, 2H), 1,57 – 1,41 (m, 2H), 0,95 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 408  $[\text{M}+\text{H}]^+$



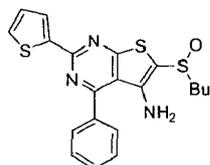
5 4-(((Butiltio)metil)sulfinil)-2,6-difenilpirimidin-5-carbonitrilo. Se añadieron ácido acético (600  $\mu$ l) y peróxido de hidrógeno (0,37 mmol, 1,5 equiv., disolución al 30% en agua) a la disolución de 4-(((butiltio)metil)tio)-2,6-difenilpirimidin-5-carbonitrilo (0,25 mmol, 98 mg) en cloroformo (900 ml). Se agitó la mezcla de reacción a 32°C durante 45 min. Una vez que se completó, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida dando 88 mg del producto designado (98%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,57 (dt, J = 7,7, 1,2 Hz, 2H), 8,28 – 8,05 (m, 2H), 7,80 – 7,40 (m, 6H), 4,82 (d, J = 13,2 Hz, 1H), 4,49 (d, J = 13,3, 1H), 2,95 (dt, J = 13,0, 8,1 Hz, 1H), 2,84 (dt, J = 13,0, 7,3 Hz, 1H), 1,91-1,74 (m, 2H), 1,56 – 1,40 (m, 2H), 0,95 (t, J = 7,4 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 408 [M+H]<sup>+</sup>



15 4-(((Butiltio)metil)tio)-2,6-difenilpirimidin-5-carbonitrilo. Se puso a reflujo una mezcla de 4,6-difenil-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,35 mmol, 101 mg), butil(clorometil)sulfano (0,35 mmol, 48 mg, 1,0 equiv.) y Et<sub>3</sub>N (0,87 mmol, 2,5 equiv.) en CH<sub>3</sub>CN seco (200  $\mu$ l) durante 20 min. Se diluyó la reacción con EtOAc y agua. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc. Se lavaron las extracciones combinadas con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida. Entonces se purificó el residuo obtenido mediante cromatografía ultrarrápida dando 59 mg del producto designado (75%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,75 – 8,36 (m, 2H), 8,35 – 7,91 (m, 2H), 7,71 – 7,41 (m, 6H), 4,59 (s, 2H), 2,74 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 1,75 – 1,58 (m, 2H), 1,49 – 1,34 (m, 2H), 0,91 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 392 [M+H]<sup>+</sup>.

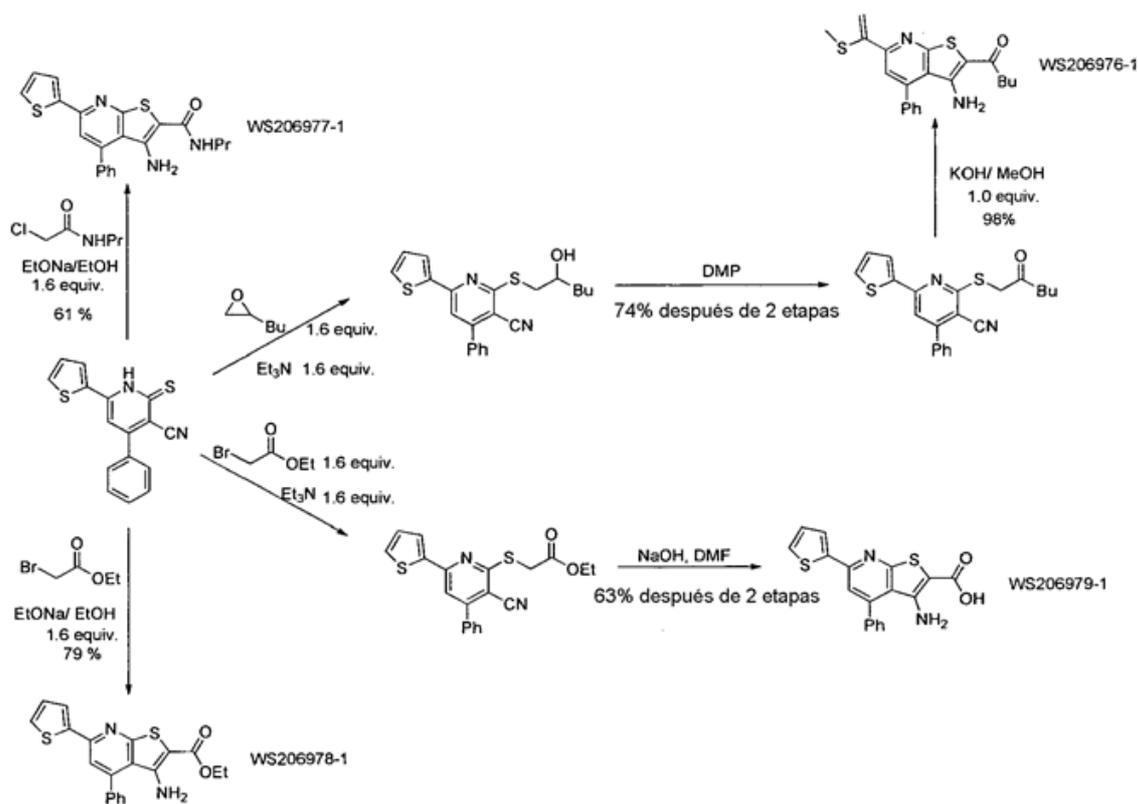


25 Se preparó 4,6-difenil-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo según el procedimiento descrito por Soto. Se agitó una mezcla de NaOiPr (1,5 mmol, 1,0 equiv., preparada *in situ* a partir de sodio y iPrOH seco), benzotioamida (1,5 mmol, 205mg, 1,0 equiv.) y 2-(etoxi(fenil)metilen)malononitrilo (1,5 mmol, 297 mg, 1,5 equiv.) en iPrOH (75  $\mu$ l) durante 5 h a temperatura ambiente. Entonces se acidificó la reacción con HCl con. y se agitó durante la noche, se evaporó y se recristalizó el sólido obtenido en ácido acético dando 265 mg de 4,6-difenil-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (61%). <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,23 – 8,12 (m, 2H), 8,07 – 7,91 (m, 2H), 7,74 – 7,49 (m, 6H). ESI-EM (m/z): 290 [M+H]<sup>+</sup>

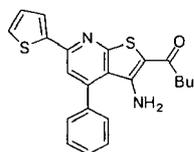


35 Se preparó SW208067, 6-(butilsulfinil)-4-fenil-2-(tiofen-2-il)tieno[2,3-d]pirimidin-5-amina usando los procedimientos de síntesis descritos para la preparación del análogo SW208065 y mostrados en el esquema 3. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,10 (dd, J = 3,7, 1,3 Hz, 1H), 7,74 – 7,65 (m, 2H), 7,62 – 7,53 (m, 3H), 7,50 (dd, J = 5,0, 1,2 Hz, 1H), 7,14 (dd, J = 5,0, 3,7 Hz, 1H), 4,79 (s, 2H), 3,28 (ddd, J = 12,8, 9,0, 6,2 Hz, 1H), 3,11 (ddd, J = 12,8, 9,0, 6,7 Hz, 1H), 1,84 – 1,63 (m, 2H), 1,54 – 1,41 (m, 2H), 0,94 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 414 [M+H]<sup>+</sup>.

40



Esquema 3

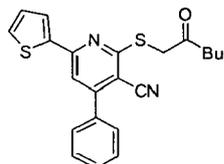


5

SW206976-1, 1-(3-amino-4-phenyl-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-2-il)pentan-1-ona. A la disolución de 2-((2-oxohexil)tio)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)nicotinonitrilo (0,13 mmol, 50 mg) en etanol (500  $\mu$ l) se le añadió KOH (0,13 mmol, 2 mg, 1,0 equiv.). Se agitó la mezcla de reacción a 50°C durante 30 min. Una vez que se completó, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con HCl ac. al 10%. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida proporcionando el producto designado con un rendimiento del 98%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,65 (dd,  $J = 3,8, 1,1$  Hz, 1H), 7,62 - 7,56 (m, 2H), 7,55 - 7,48 (m, 4H), 7,40 (s, 1H), 7,13 (dd,  $J = 5,0, 3,8$  Hz, 1H), 4,13 (s, 2H), 2,72 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,72 - 1,56 (m, 2H), 1,42 - 1,25 (m, 2H), 0,88 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 393  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

10

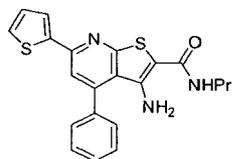
15



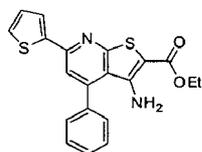
20

2-((2-oxohexil)tio)-4-fenil-6-(tiofen-2-il)nicotinonitrilo. Se agitó una mezcla de 4-fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,068 mmol, 20 mg),  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,11 mmol, 15  $\mu$ l, 1,6 equiv.) y 2-butiloxirano (0,11 mmol, 11 mg, 1,6 equiv.) en MeOH (500  $\mu$ l) a temperatura ambiente. Cuando se completó la reacción tal como se evaluó mediante CCF, se evaporó la mezcla de reacción; se disolvió el producto en bruto en DCM y se añadió DMP (0,10 mmol, 1,5 equiv.) a 0°C. Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h y entonces se extinguió mediante adición de una mezcla 1:1 de disolución de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  al 20%/NaHCO<sub>3</sub>. Se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato de magnesio y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se purificó el producto en bruto mediante cromatografía ultrarrápida proporcionando el producto designado con un rendimiento del 72%.  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,02 (s, 1H), 7,97 (d,  $J = 3,1$  Hz, 1H), 7,71 - 7,59 (m, 2H), 7,55 (d,  $J = 3,2$  Hz, 1H), 7,55-7,46 (m, 4H), 4,52 (s, 2H), 2,75 (t,  $J = 7,8$  Hz, 2H), 1,73 - 1,54 (m, 2H), 1,51 - 1,26 (m, 2H), 0,91 (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 393

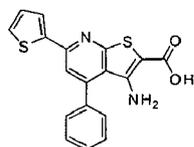
25

[M+H]<sup>+</sup>.

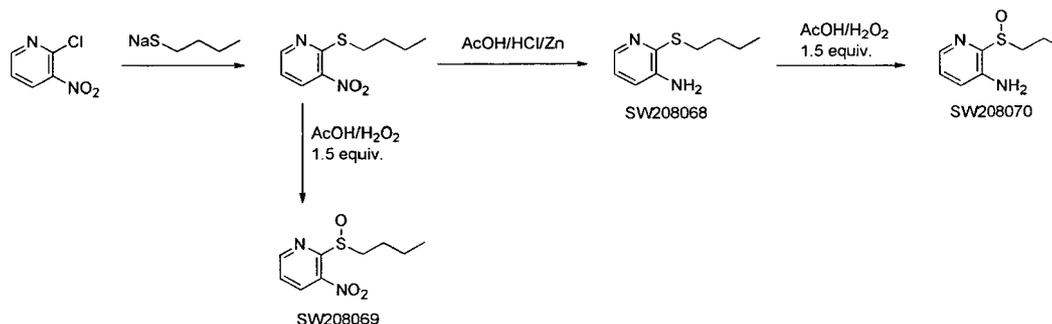
- 5 SW206977, 3-amino-4-fenil-N-propil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-2-carboxamida. Se agitó una mezcla de 4-fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,12 mmol, 35 mg), 2-cloro-N-propilacetamida (0,12 mmol, 16 mg, 1,0 equiv.) y EtONa (0,19 mmol, 1,6 equiv.) en etanol (1 ml) a 50°C. Cuando se completó la reacción tal como se evaluó mediante CCF, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con HCl ac. al 10%. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión
- 10 reducida proporcionando el producto designado con un rendimiento del 61%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,65 (d, J = 3,7, 1H), 7,58 - 7,49 (m, 3H), 7,49 - 7,38 (m, 4H), 7,10 (dd J = 4,9, 3,7 Hz, 1H), 5,75 (s, 2H), 5,59 - 5,38 (m, 1H), 3,35 (td J = 7,0, 5,9 Hz, 1H), 1,64 - 1,58 (m, 2H), 0,96 (t, J = 7,4 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 394 [M+H]<sup>+</sup>.



- 15 SW206978, 3-amino-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-2-carboxilato de etilo. Se agitó a reflujo una mezcla de 4-fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,34 mmol, 100 mg), 2-cloroacetato de etilo (0,54 mmol, 1,6 equiv.) y EtONa (0,54 mmol, 1,6 equiv.) en etanol (1 ml). Cuando se completó la reacción tal como se evaluó mediante CCF, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con HCl ac. al 10%. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión
- 20 reducida proporcionando el producto designado con un rendimiento del 79%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,01 (d, J = 3,7 Hz, 1H), 7,87 - 7,67 (m, 2H), 7,56 (d, J = 6,5 Hz, 5H), 7,36 - 6,90 (m, 1H), 5,73 (s, 2H), 4,23 (q, J = 7,1 Hz, 2H), 1,25 (t, J = 7,0 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 381 [M+H]<sup>+</sup>.

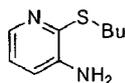


- 25 SW206979, ácido 3-amino-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-2-carboxílico. A una disolución de fenil-6-(tiofen-2-il)-2-tioxo-1,2-dihidropiridin-3-carbonitrilo (0,34 mmol, 100 mg) y 2-cloroacetato de etilo (0,54 mmol, 1,6 equiv.) en etanol (1 ml), se le añadió Et<sub>3</sub>N (0,54 mmol, 1,6 equiv.). Se puso a reflujo la reacción durante 20 min. Entonces se diluyó la reacción con EtOAc y agua. Se separó la fase orgánica y se extrajo la fase acuosa dos veces con EtOAc. Se lavaron las extracciones combinadas con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron a presión reducida proporcionando el producto designado. Entonces se disolvió 2-((3-ciano-4-fenil-6-(tiofen-2-il)piridin-2-il)tio)acetato de etilo en DMF y se trató con NaOH ac. 1 M a 50°C dando
- 30 SW206979, ácido 3-amino-4-fenil-6-(tiofen-2-il)tieno[2,3-b]piridin-2-carboxílico con un rendimiento del 63%. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 8,00 (dd, J = 3,7, 1,1 Hz, 1H), 7,79 - 7,64 (m, 2H), 7,55 (dt, J = 7,6, 3,2 Hz, 5H), 7,16 (dd, J = 5,0, 3,7 Hz, 1H), 5,72 (s, 2H). ESI-EM (m/z): 353[M+H]<sup>+</sup>.

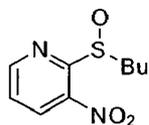


40

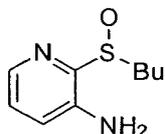
Esquema 4



5 SW208068, 2-(butiltio)piridin-3-amina. A la disolución de butano-1-tiol (7,0 mmol, 628 mg, 1,1 equiv.) en THF (30 ml) se le añadió NaH (6,6 mmol, 158 mg, 1,05 equiv.) a 0°C. Después se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió en porciones 2-cloro-3-nitropiridina (6,33 mmol, 1,0 g) y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se añadió agua a la mezcla de reacción, y se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, y se secó sobre sodio sulfato, se filtró y se concentró a presión reducida proporcionando el producto en bruto. Debido a las dificultades en la purificación, se usó directamente 2-(butiltio)-3-nitropiridina impura para la siguiente etapa. Se disolvió nitropiridina (0,47 mmol, 100 mg) en un disolvente mixto de ácido acético (3,3 ml) y ácido clorhídrico conc. (130 µl) y se añadió zinc (5,7 mmol, 370 mg) en pequeñas porciones mientras se enfriaba con hielo. Después de agitarse la mezcla durante 30 minutos, se filtró la mezcla de reacción, y se neutralizó el filtrado con una disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub>, y se extrajo con DCM. Se lavó la fase orgánica con agua y entonces con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, y se secó sobre sodio sulfato. Posteriormente, se evaporó el disolvente obteniéndose 2-(butiltio)piridin-3-amina como un aceite de color amarillo pálido. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,94 (dd, J = 4,1, 2,0 Hz, 1H), 7,05 - 6,51 (m, 2H), 3,84 (s, 2H), 3,51 - 2,95 (m, 2H), 1,72 - 1,60 (m, 2H), 1,56 - 1,36 (m, 2H), 0,91 (t, J = 7,4 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 183 [M+H]<sup>+</sup>.



20 SW208069, 2-(butilsulfinil)-3-nitropiridina. A la disolución de butano-1-tiol (7,0 mmol, 628 mg, 1,1 equiv.) en THF (30 ml) se le añadió NaH (6,6 mmol, 158 mg, 1,05 equiv.) a 0°C. Después se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió en porciones 2-cloro-3-nitropiridina (6,33 mmol, 1,0 g) y se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 2 h. Entonces se añadió agua a la mezcla de reacción, y se extrajo la mezcla resultante con acetato de etilo. Se lavó la fase orgánica con una disolución acuosa saturada de cloruro de sodio, y se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida proporcionando el producto en bruto. Debido a las dificultades en la purificación, se usó directamente 2-(butiltio)-3-nitropiridina impura para la siguiente etapa. Se disolvió nitropiridina (0,47 mmol, 100 mg) en un disolvente mixto de ácido acético (1,2 ml) y cloroformo (1,2 ml) y se añadió peróxido de hidrógeno (0,7 mmol, 1,5 equiv., disolución al 30% en agua). Después de agitarse la mezcla durante 45 minutos, a 32°C, se diluyó la reacción con EtOAc y se lavó con disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a presión reducida para dar 2-(butilsulfinil)-3-nitropiridina. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9,14 (dd, J = 4,6, 1,5 Hz, 1H), 8,54 (dd, J = 8,2, 1,5 Hz, 1H), 7,67 (dd, J = 8,2, 4,6 Hz, 1H), 3,18 (ddd, J = 12,7, 9,3, 7,2 Hz, 1H), 3,00 (ddd, J = 12,7, 9,1, 4,9 Hz, 1H), 2,17 - 1,92 (m, 1H), 1,91 - 1,70 (m, 1H), 1,68 - 1,35 (m, 2H), 0,96 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 229 [M+H]<sup>+</sup>.



40 Se preparó SW208070, 2-(butilsulfinil)piridin-3-amina usando el procedimiento de síntesis descrito para la preparación del análogo SW208069 y mostrado en el esquema 4. <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,90 (dd, J = 4,4, 1,4 Hz, 1H), 7,09 (dd, J = 8,3, 4,4 Hz, 1H), 6,93 (dd, J = 8,3, 1,4 Hz, 1H), 5,30 (s, 2H), 3,24 (ddd, J = 13,0, 9,5, 5,4 Hz, 1H), 3,03 (ddd, J = 13,0, 9,8, 6,3 Hz, 1H), 1,95 - 1,61 (m, 2H), 1,55 - 1,35 (m, 2H), 0,93 (t, J = 7,3 Hz, 3H). ESI-EM (m/z): 199 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 45 Ejemplo 4

##### Análisis del mecanismo de inhibición de 15-PGDH por SW033291 y compuestos relacionados

50 El siguiente ejemplo proporciona datos relativos al mecanismo de acción mediante el cual SW033291 inhibe 15-PGDH.

Se ejecutaron titulaciones por duplicado de inhibidor de 15-PGDH (SW033291) a 4 concentraciones diferentes de 15-PGDH (24 nM, 12 nM, 6 nM, 3 nM). Las reacciones contenían la concentración indicada de enzima, NAD(+) 250 µM, PGE-2 a 25 µM, y se reunieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos.

55 Las figuras 21 (A-B) muestran el desplazamiento en el valor de CI50 con la concentración cambiante de enzima. El

resultado es indicativo de un modo de inhibición de unión estrecha con dependencia de la estequiometría de enzima: inhibidor, más que de la concentración absoluta del inhibidor. En todos los casos, los valores de CI50 son menores que la concentración de enzima, lo que indica que el fármaco nM se une casi completamente por la enzima.

- 5 Las figuras 22 (A-B) indican que SW033291 se comporta de manera muy similar a un inhibidor irreversible de 15-PGDH, y no puede retirarse eficazmente por diálisis la proteína 15-PGDH.

Las pruebas de si SW033291 es un inhibidor reversible avanzaron mediante:

- 10 (i) se incubó en hielo una alícuota de 8  $\mu$ l tomada de disolución madre de 15-PGDH (15-PGDH 8 mg/ml en 500  $\mu$ l de tampón de ensayo de 15-PGDH) (4 nmol de 15-PGDH, 15-PGDH a 4  $\mu$ M), con: (a) adición de 5  $\mu$ l de NAD(+) 100 mM + adición de 3,2  $\mu$ l de disolución madre de SW033291 a 2,5 mM, entonces se dializó frente a 1 l de tampón durante 12 horas, seguido por 1 l de tampón nuevo durante 12 horas más; o (b) adición de 5  $\mu$ l, NAD(+) a 100 mM + adición de 3,2  $\mu$ l DMSO, entonces se dializó frente a 1 l de tampón durante 12 horas, seguido por 1 l de tampón nuevo durante 12 horas más.

(ii) Antes de la diálisis, retirar 1  $\mu$ l y diluir en 200  $\mu$ l de tampón de ensayo (20 nM), entonces medir la actividad de 15-PGDH.

- 20 (iii) Tras la diálisis, a las 24 h, retirar 1  $\mu$ l y diluir en 200  $\mu$ l de tampón de ensayo (20 nM), entonces medir la actividad de 15-PGDH.

El tampón de diálisis es Tris a 50 mM pH 7,4, NaCl 40 mM, DTT a 0,1 mM, Tween-20 al 0,01%.

- 25 En las condiciones del ensayo, SW033291 inhibió el 91% de 15-PGDH antes de la diálisis, y el 85% de la actividad de 15-PGDH tras la diálisis, es decir la diálisis no revertió la inhibición de 15-PGDH. La proteína 15-PGDH de control que se dializó en ausencia de SW033291 permaneció totalmente activa.

- 30 Las figuras 23(A-B) muestran (A) en la parte superior derecha las tasas de reacción para 15-PGDH en presencia de un conjunto gradado de concentraciones crecientes de SW033291. En el gráfico en la parte superior derecha P es la concentración de NADH como sustituto para 15-ceto-PGE<sub>2</sub>. (P+S) es la concentración inicial de PGE<sub>2</sub> de 20  $\mu$ M. Se llevó a cabo el ensayo en presencia de 15-PGDH recombinante a 10 nM. En el gráfico en la parte inferior izquierda (B), V<sub>o</sub> es la velocidad inicial de la reacción en ausencia de SW033291, y V<sub>i</sub> es la velocidad inicial de la reacción en presencia de la concentración correspondiente de SW033291. La línea muestra la curva generada mediante el ajuste de los datos a la ecuación de Morrison. El ajuste de la curva produce un valor de K<sub>i</sub><sup>Ap</sup> calculado de 0,1015 nM. La línea discontinua corta el eje X a 8,5 nM. Esto representa el punto en el que [inhibidor] = [enzima activa] que muestra que la preparación de enzima contiene el 85% de enzima activa. En la ecuación de Morrison, K<sub>i</sub> es la afinidad de unión del inhibidor; [S] es la concentración de sustrato; y K<sub>m</sub> es la concentración de sustrato a la que la actividad enzimática es la mitad de la máxima. Obsérvese que CI50 es la fortaleza funcional del inhibidor. Aunque el valor de CI50 para un compuesto puede variar entre experimentos dependiendo de las condiciones experimentales, la K<sub>i</sub> es un valor absoluto. K<sub>i</sub> es la constante de inhibición para un fármaco; la concentración de ligando competitivo en un ensayo de competencia que ocuparía el 50% de los receptores si no estuviera presente ligando.

- 45 Las figuras 24(A-B) muestran titulaciones por duplicado de inhibidor de 15-PGDH (SW033291) que se ejecutaron a 6 concentraciones diferentes de PGE<sub>2</sub> (1,25  $\mu$ M-40  $\mu$ M). En el gráfico en la parte superior, el eje Y es el % de inhibición de la reacción por SW033291. El eje X es la concentración de SW033291 en nM. Las reacciones contienen 15-PGDH añadido a 5,0 nM, NAD(+) 250  $\mu$ M y las concentraciones indicadas de PGE-2, se reunieron y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. La K<sub>m</sub> para PGE<sub>2</sub> es de aproximadamente 5  $\mu$ M, y las reacciones ejecutadas con concentraciones de PGE<sub>2</sub> por debajo de 5  $\mu$ M avanzaron muy lentamente, dificultando la cuantificación de la inhibición por SW033291. Sin embargo, en reacciones con PGE<sub>2</sub> a concentraciones de 5  $\mu$ M-40  $\mu$ M, la CI50 para SW033291 no se ve afectada por la concentración creciente de PGE<sub>2</sub>, lo que muestra que la inhibición es no competitiva.

- 55 La figura 25 muestra las relaciones estructura-actividad de análogos de SW033291 frente a sus CI50 contra 15-PGDH recombinante. Las asignaciones de estructuras a los dos isómeros, A y B, de SW033291 son arbitrarias, ya que no se ha determinado la estructura del isómero activo (isómero B). Los isómeros ópticos de SW033291 se separaron mediante HPLC preparativa usando una columna Chiralcel ODH 10 mm x 250 mm, isopropanol al 5% en hexanos, 1 ml/min. El isómero "A" es el isómero que eluye más rápido. El isómero "B" es el isómero que eluye más lento.

- 60 La familia de análogos muestra que SW033291, con una cadena lateral de 4 carbonos, es 2 veces más potente que SW208080 (cadena lateral de 5 carbonos), 15 veces más potente que SW208081 (cadena lateral de 6 carbonos) y 100 veces más potente que SW208079 (cadena lateral de 1 carbono). SW033291 es también 20 veces más potente que SW208078, el análogo que convierte el grupo sulfóxido en una sulfona.

65

La figura 26 muestra estructuras de análogos de SW033291 adicionales que convierten el grupo sulfóxido en una cetona, una amida, un éster o un ácido carboxílico. También se muestra la estructura SW206980 que deletiona el anillo de fenilo de SW033291.

5 Las figuras 27(A-C) muestran gráficos que muestran el nivel de actividad del compuesto en la inducción de la fusión 15-PGDH-indicador de luciferasa en tres contextos de línea celular de prueba diferentes, V9m, LS174T y V503. Se sometió a prueba cada compuesto a dos concentraciones, 2,5  $\mu\text{M}$  y 7,5  $\mu\text{M}$ . El eje Y es la actividad luciferasa.

10 A 2,5  $\mu\text{M}$ -7,5  $\mu\text{M}$ , SW206980, que deletiona el grupo fenilo de SW033291, muestra actividad comparable a SW033291 en las tres líneas indicadoras.

Las estructuras que tienen el grupo sulfóxido convertido en una cetona, amida, un éster o ácido carboxílico muestran una importante pérdida de actividad en la inducción del indicador.

15 La figura 28 muestra gráficos que muestran el tanto por ciento de actividad enzimática de 15-PGDH que se inhibe a 2,5  $\mu\text{M}$  y a 7,5  $\mu\text{M}$  por cada uno de los 5 compuestos de prueba. SW206980 que deletiona el grupo fenilo de SW033291, muestra a estas concentraciones una potencia similar a SW03291 en la inhibición de la actividad de 15-PGDH.

20 Las estructuras que tienen el grupo sulfóxido convertido en una cetona, amida, un éster o ácido carboxílico muestran una importante pérdida de actividad como inhibidores de 15-PGDH.

25 Las figuras 29(A-B) muestran una curva de titulación que representa gráficamente la inhibición en porcentaje de la actividad enzimática de 15-PGDH a diferentes concentraciones de SW033291 y SW206980. En condiciones de ensayo idénticas, SW206980 muestra una  $\text{CI}_{50}$  ligeramente menor.

Las figuras 30(A-B) muestran que SW206980 se une directamente a 15-PGDH y desplaza notablemente su curva de fusión. A la izquierda se muestra la curva de fusión de 15-PGDH tal como se refleja mediante la fluorescencia del colorante hidrófobo naranja SYPRO. A la derecha se muestra la primera derivada negativa de la curva de fusión.

30 Se representan gráficamente tres condiciones, la de 15-PGDH 10  $\mu\text{M}$ , la de 15-PGDH 10  $\mu\text{M}$  más SW206980 10  $\mu\text{M}$ , y la de 15-PGDH 10  $\mu\text{M}$  más NADH 125  $\mu\text{M}$  más SW206980 10  $\mu\text{M}$ . La temperatura de fusión, tal como se refleja mediante el punto de inflexión de la curva a la derecha se desplaza 20°C, desde 48 grados hasta 68 grados, en presencia de SW206980 y NADH, lo que refleja que SW206980 se une directamente a y estabiliza notablemente la estructura terciaria de 15-PGDH, de manera que requiere la presencia del cofactor NADH.

35 Las figuras 31 (A-C) muestran además análogos de SW033291 que se produjeron basándose en el hallazgo anterior de que la eliminación del anillo de fenilo de SW033291 (SW206980) conservaba la actividad. El nuevo análogo (SW206992) añade un nitrógeno al anillo en la parte izquierda.

40 La tabla 3 proporciona una comparación de las propiedades de SW033291, SW206980 y SW206992.

Tabla 3: Resumen de tres análogos de SW033291

	SW033291	SW206980	SW206992
$\text{CI}_{50}$	1,59 nM	0,97 nM	1,411 nM
Tiempo hasta la inhibición (10 nM)	~5 min	~2 min	~2 min
$\Delta\text{Tm}$ (NADH)	19 °C	15,5 °C	19 °C
Concentración para la inducción de indicador de línea celular total	~100 nM	>300 nM	> 1 $\mu\text{M}$
Estabilidad de hepatocitos	Estable > un par de horas	T1/2 = 80 min	
Toxicidad	>10 $\mu\text{M}$	>7,5 $\mu\text{M}$	>7,5 $\mu\text{M}$

45 Tiempo hasta la inhibición se refiere al tiempo necesario para inhibir la generación de NADH por 15-PGDH desde el momento en que se añade fármaco a la mezcla de reacción. Delta Tm se refiere al desplazamiento en la temperatura de fusión de 15-PGDH recombinante en presencia de fármaco (con cofactor NADH también presente). Concentración de inducción de indicador de línea celular total se refiere a la concentración de fármaco que es necesario añadir a la línea celular indicadora para lograr la máxima inducción del casete de indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa, tal como se mide mediante ensayos de luciferasa. Estabilidad de hepatocitos se refiere a la semivida de compuesto en presencia de hepatocitos en cultivo. Toxicidad se refiere a la concentración de compuesto necesaria para disminuir los números de células en un ensayo de cultivo celular.

55 Las figuras 32(A-C) muestran la titulación de inducción por SW033291 del indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa en tres contextos de línea celular diferentes. En general es necesaria la exposición a SW033291 entre 80-

160 nM durante 24 horas para inducir la máxima inducción de indicador.

Las figuras 33(A-C) muestran la titulación de inducción por SW206980 del indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa en tres contextos de línea celular diferentes. En general es necesaria la exposición a SW206980  $\geq$  300 nM durante 24 horas para inducir la máxima inducción de indicador.

Las figuras 34(A-C) muestran la titulación de inducción por SW206992 del indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa en tres contextos de línea celular diferentes. En general es necesaria la exposición a SW206992  $\geq$  1000 nM durante 24 horas para inducir la máxima inducción de indicador.

Las figuras 35(A-C) muestran el desplazamiento en la curva de fusión de proteína 15-PGDH recombinante (10  $\mu$ M) por SW033291, SW206980 y SW206992 20  $\mu$ M en presencia del cofactor NAD (+)(100  $\mu$ M). La temperatura de fusión de control es de 49 grados centígrados. SW033291 desplaza la temperatura de fusión hasta 63 grados. SW206980 desplaza la temperatura de fusión hasta 61 grados. SW206992 desplaza la temperatura de fusión hasta 59 grados. Por tanto los tres compuestos se unen directamente a 15-PGDH y aumentan notablemente la temperatura de fusión de la proteína, siendo el orden de desplazamientos de temperatura SW033291 > SW206980 > SW206992.

Las figuras 36(A-B) muestran el desplazamiento en la curva de fusión de proteína 15-PGDH recombinante (10  $\mu$ M) por SW033291, SW206980 y SW206992 a 20  $\mu$ M en presencia del cofactor NADH (100  $\mu$ M). La temperatura de fusión de control es de 55 grados centígrados. SW033291 desplaza la temperatura de fusión hasta 74 grados. SW206980 desplaza la temperatura de fusión hasta 70,5 grados. SW206992 desplaza la temperatura de fusión hasta 68,5 grados. Por tanto, los tres compuestos se unen directamente a 15-PGDH y aumentan notablemente la temperatura de fusión de la proteína, siendo el orden de desplazamientos de temperatura SW033291 > SW206980 > SW206992.

Las figuras 37(A-C) muestran una curva de titulación de compuestos inhibidores de 15-PGDH en un ensayo que mide el efecto sobre los niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio de células A549 que se han estimulado con IL1-beta. Los mayores niveles de PGE<sub>2</sub>, 3000 pg/ml, se logran con SW033291, obteniéndose el máximo efecto a 2,5  $\mu$ M de compuesto. El siguiente mayor nivel de PGE<sub>2</sub>, 2500 pg/ml se logra con SW206980, obteniéndose el máximo efecto a 7,5  $\mu$ M de compuesto. La menor inducción, hasta PGE<sub>2</sub> 2100 pg/ml se logra con SW206992, obteniéndose el máximo efecto a 2,5 de  $\mu$ M. En estas reacciones, se mantuvieron células A549 en medio F12K complementado con suero de ternero fetal (FBS) al 10% y gentamicina 50 mg/ $\mu$ l en una atmósfera humidificada que contenía el 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Se sembraron las células en placas de 24 pocillos (0,5 ml por pocillo) a aproximadamente 100.000 células por pocillo por duplicado y se hicieron crecer durante 24 h antes de la estimulación con IL-1 $\beta$  (1 ng/ $\mu$ l) durante la noche (16 h) para generar PGE<sub>2</sub>. Se añadieron SW033291 y sus análogos a las concentraciones indicadas, y se continuó con la incubación durante 8 h. Se recogió el medio, y se analizó el nivel de PGE<sub>2</sub> mediante inmunoensayo enzimático. Se analizaron los datos a partir de los resultados de tres experimentos independientes.

Las figuras 38(A-C) muestran ensayos de toxicidad celular en células A549 a las 24 horas de los inhibidores de 15-PGDH tal como se somete a ensayo mediante medición con CellTiter-Glo. No se observa ningún efecto sobre los niveles de CellTiter-Glo en concentraciones de hasta 10  $\mu$ M de SW033291, SW206980 y SW2206992.

La figura 39 muestra las estructuras de 7 análogos de SW033291: SW208064, SW208065, SW208066, SW208067, SW208068, SW208069, SW208070.

La tabla 4 proporciona un resumen tabular de las propiedades de 4 análogos, SW208064, SW208065, SW208066, SW208067, y en particular enumera la CI50 para cada uno de estos 4 compuestos contra 15-PGDH recombinante 2,5 nM.

Tabla 4: Resumen de cuatro análogos de SW033291 a partir de UTSW conjunto 8

	SW033291	SW2068064	SW208065	SW208066	SW208067
CI50	1,23 nM	151,4 nM	4,865 nM	1,368 nM	2,395 nM
Tiempo hasta la inhibición (10 nM)	~5 min				
$\Delta$ Tm (NADH)	19 °C	5 °C	13 °C	16,5 °C	16,5 °C
Concentración para la inducción de indicador de línea celular total	~100 nM	~600 nM	~100 nM	~100 nM	~500 nM
Estabilidad de hepatocitos	Estable > un par de horas				
Toxicidad	>10 $\mu$ M				

Tiempo hasta la inhibición se refiere al tiempo necesario para inhibir la generación de NADH por 15-PGDH desde el momento en que se añade fármaco a la mezcla de reacción. Delta Tm se refiere al desplazamiento en la temperatura de fusión de 15-PGDH recombinante en presencia de fármaco (con cofactor NADH también presente).

Concentración de inducción de indicador de línea celular total se refiere a la concentración de fármaco que es necesario añadir a la línea celular indicadora para lograr la máxima inducción del casete de indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa, tal como se mide mediante ensayos de luciferasa. Estabilidad de hepatocitos se refiere a la semivida de compuesto en presencia de hepatocitos en cultivo. Toxicidad se refiere a la concentración de compuesto necesaria para disminuir los números de células en un ensayo de cultivo celular.

La figura 40 proporciona un resumen gráfico que muestra la actividad de cada uno de los compuestos en la inducción de un indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa introducido en tres líneas celulares de cáncer de colon diferentes, V9m, LS174T y V503. Los resultados se miden mediante ensayo de la actividad luciferasa después de la exposición de células a compuesto a una concentración de los compuestos o bien 2,5 uM o bien 7,5 uM.

La figura 41 proporciona un resumen gráfico que muestra la actividad de cada uno de los compuestos en la inhibición de la actividad enzimática de la enzima 15-PGDH recombinante cuando se añade compuesto a 2,5 uM y a 7,5 uM. El 100% de inhibición corresponde a la inhibición completa de la enzima.

La figura 42 muestra la medición de CI para inhibir 2,5 nM de 15-PGDH recombinante cuando se incubaba a través de un intervalo de concentraciones de SW208064, SW208065, SW208066 y SW208067. El eje Y de cada gráfico registra la inhibición en porcentaje de la actividad enzimática de 15-PGDH. El 100% de inhibición corresponde a la inhibición completa de la enzima. El eje X de cada gráfico registra el log de la concentración de inhibidor expresada en nM.

### Ejemplo 5

#### Análisis de la toxicidad de SW033291

La tabla 5 muestra un resumen de un grupo de ratones FVB macho de 8-12 semanas de edad en ramas de control o tratamiento con SW033291 evaluados para determinar la toxicidad de SW033291, con 6 ratones en cada rama del estudio.

Tabla 5 - Características iniciales de ratones FVB macho de 8-12 semanas de edad

Estudio de toxicidad	Control-WT	Tratamiento-WT	valor de p
Número	6	6	
Sexo	M	M	
Edad (Días)	73,7.1 ± 4,7	73,26 ± 5,0	0,465
Peso (g)	27,5 ± 2,4.	26,8 ± 3,1	0,412

La figura 43 muestra la curva de dosis-respuesta para la inducción de un indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa en el contexto de la línea celular V9m de SW033291, SW208064, SW208065, SW208066 y SW208067.

La figura 44 muestra curvas de titulación de compuestos inhibidores de 15-PGDH en un ensayo que mide los efectos sobre los niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio de células A549 que se han estimulado con IL1-beta en el mismo diseño experimental descrito para la figura 37. A una concentración de 100 nM de fármaco, los mayores niveles de PGE<sub>2</sub> en el medio se logran tratando las células con SW208066 o con SW208067, después de lo cual el siguiente mayor nivel de PGE<sub>2</sub> en el medio se logra tratando las células con SW033291.

La figura 45 muestra los pesos diarios de un grupo de ratones FVB de 8-12 semanas de edad tratados con vehículo o con SW033291 por vía i.p. a 5 mg/kg dos veces al día durante 21 días. Se administró SW033291 en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W a una concentración de 125 ug/200 ul. Tal como se muestra, los ratones tratados tanto con vehículo como con fármaco muestran igual aumento de peso durante el periodo de 21 días, sin evidencias de que SW033291 reduzca el peso de ratón. N = 6 ratones en las dos ramas de tratamiento con SW033291 y de tratamiento con vehículo.

### Ejemplo 6

#### Análisis del efecto de SW033291 sobre la función de la médula ósea

Este ejemplo muestra los efectos de SW033291 sobre la función de la médula ósea.

Las figuras 46(A-C) muestran el análisis de la médula ósea de ratones de tipo natural frente a ratones que son deficientes genéticos homocigotos para 15-PGDH (ratones PGDH -/-). La celularidad total de la médula ósea y el tanto por ciento de células Sca1<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup> en células negativas de linaje (SKL) son iguales en ambos conjuntos de ratones. Sin embargo, la médula ósea de ratones 15-PGDH -/- muestra un aumento de aproximadamente el 50% de números de colonias hematopoyéticas generadas cuando se siembra la médula en metilcelulosa. Las condiciones

experimentales se indican en la figura. Los ratones deficientes en 15-PGDH se indican mediante la etiqueta PGDH -/- y mediante la etiqueta 15-PGDH.

5 La figura 47 muestra un ensayo en el que se extrae la médula ósea de un ratón de tipo natural, y se incuba *ex vivo* en hielo durante 2 horas o bien con SW033291 (0,5  $\mu$ M) o bien con PGE<sub>2</sub> 1  $\mu$ M o 16,16-dimetil-PGE<sub>2</sub> (dmPGE<sub>2</sub>) 1  $\mu$ M. Entonces se siembra de nuevo la médula tratada en metilcelulosa para el recuento de colonias hematopoyéticas. La médula tratada con SW033291 muestra de nuevo un aumento de aproximadamente el 50% del número de colonias derivadas de médula ósea generadas. En estas condiciones, se observa un menor aumento de médula tratada con PGE<sub>2</sub>, y se observa un aumento ligeramente mayor de médula tratada con dmPGE<sub>2</sub>.

10 Las figuras 48(A-C) muestran un estudio de ratones C57BL/6J tratados con SW033291 por vía i.p. administrado en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W a una dosis de 5 mg/kg o 20 mg/kg. El panel A muestra la celularidad de médula ósea de ratón, recuento de glóbulos blancos (wbc), recuento de glóbulos rojos (rbc) y recuento de plaquetas. El panel B muestra el tanto por ciento de células Sca1+/c-Kit+ en células negativas de linaje (SKL) están inalteradas en ratones tratados con SW033291. El panel C muestra que médula de ratones tratados con SW033291 da lugar a un aumento de aproximadamente el 30% de los números de colonias hematopoyéticas generadas cuando se siembra la médula en metilcelulosa. Las condiciones experimentales se indican en la figura.

20 Las figuras 49(A-B) muestran el análisis de la médula de ratones C57BL/6J marcados con antígeno CD45.2 que se trataron con SW033291 5 mg/kg por vía i.p. diariamente para 3 dosis en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W o que se trataron con vehículo solo. En el día 3 se sacrificaron los ratones, se irrigó la médula y se mezcló a una razón 1:1 con médula de CD45.1 tratada con vehículo. Se inyectaron 2 millones de células de BM completa en la vena de la cola de ratones CD45.1 irradiados con una dosis letal y se midió el tanto por ciento de quimerismo mediante citometría de flujo en las semanas 8, 12, 16. Tal como se muestra, en las semanas 12 y 16 el tanto por ciento de quimerismo en sangre de células marcadas con CD45.2 aumentó significativamente en ratones receptores cuya médula marcada con CD45.2 se extrajo de ratones donantes tratados con SW033291, en contraposición a ratones donantes tratados con control de vehículo. Dicho de otro modo, la médula de ratones tratados con SW033291 demostró un aumento del estado físico a largo plazo en competencia con médula de control. En particular, en la semana 16 CD45.2 extraído de ratones tratados con SW033291 muestran un aumento significativo de la contribución a poblaciones de células B y T, lo que sugiere que la médula de ratones tratados con SW033291 fomentan una reconstitución más temprana de poblaciones linfoides y el retorno más temprano a la inmunocompetencia.

35 En un estudio adicional, se irradian ratones C57BL/6J con 11Gy en el día 0, seguido por tratamiento con SW033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid) en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, o con vehículo solo durante 21 días. Todos los ratones tratados con vehículo o con SW033291 reciben un aloinjerto de médula de un ratón C57BL/6J donante a una dosis de cualquiera de 100.000 células, 200.000 células, 500.000 células. Se evalúan 3 ratones de control y 3 SW033291 en cada condición. El diseño experimental se representa en la figura 50.

45 La tabla 6 muestra el número de ratones supervivientes en cada cohorte a lo largo de los primeros 19 días del estudio. En las condiciones de la colonia de ratones durante este estudio, todos los ratones de control que reciben 100.000- 500.000 células fallecen entre los días 4-13 del estudio. En cambio, dos ratones tratados con SW033291 que reciben 500.000 células permanecen vivos en el día 19 del estudio y se supone que tienen una reconstitución hematopoyética total. Por tanto, el tratamiento con el inhibidor de 15-PGDH SW033291 fomentó la supervivencia de ratones que reciben un trasplante de médula ósea, una observación que concuerda con que SW033291 permite una reconstitución hematopoyética más rápida y completa en los ratones trasplantados. Podría predecirse que otros inhibidores de 15-PGDH con actividad similar a SW033291 tendrán actividad similar en el respaldo de la reconstitución hematopoyética. El tratamiento con SW033291 también permitió que a los ratones se les trasplantase de manera satisfactoria un inóculo más pequeño de médula ósea de donante que las 1.000.000 células que son necesarias de manera convencional. Estas observaciones sugieren que SW033291, así como otros inhibidores de 15-PGDH similares, puede respaldar un trasplante satisfactorio con menores números de células madre de donante. Tal actividad sería de particular utilidad en entornos, tales como trasplante con células madre de cordón umbilical, en los que los números de células de donante son limitados. La supervivencia mejorada de los ratones trasplantados tratados con SW033291 sugiere la eficacia de SW033291, y de inhibidores de 15-PGDH similares, como sustitutos para, o permitiendo la reducción del uso de, otros tratamientos o factores de crecimiento empleados comúnmente como respaldo de pacientes que reciben trasplantes de médula ósea, células madre hematopoyéticas y células madre de cordón umbilical. La supervivencia mejorada de los ratones trasplantados tratados con SW033291 concuerda con SW033291, y por extensión otros inhibidores de 15-PGDH similares, que tienen actividad en la reducción de infecciones en los ratones trasplantados, y/ o en el fomento de la recuperación del intestino de ratones frente al daño por radiación y/o en la reducción de la toxicidad pulmonar debida a radiación.

Tabla 6

	Supervivencia del ratón	13 Mar	14 Mar	15 Mar	16 Mar	17 Mar	18 Mar	19 Mar	20 Mar	21 Mar	22 Mar	23 Mar	24 Mar	25 Mar	26 Mar	...	1 Abr
Tratamiento	Número de células	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13		Día 19
Control	1x10 <sup>5</sup>	3	3	3	2	0											
Control	2x10 <sup>5</sup>	3	3	3	3	3	2	1	0								
Control	5x10 <sup>5</sup>	3	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1	1	1	0		
SW033291	1x10 <sup>5</sup>	3	3	3	3	2	1	0									
SW033291	2x10 <sup>5</sup>	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	1	0	
SW033291	5x10 <sup>5</sup>	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	...	2

**Ejemplo 7**

Análisis del efecto de SW033291 sobre la supervivencia frente a la radiación

5 Este ejemplo muestra estudios del efecto de SW033291 en ratones que reciben irradiación de cuerpo entero.

10 La tabla 7 muestra los resultados de un estudio de ratones C57BL/6J hembra de 15 semanas de edad irradiados con 7 Gy, 9 Gy o 11 Gy, y que reciben diariamente SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W para 7 dosis, o que reciben vehículo solo. La tabla muestra el número de ratones que sobreviven en días secuenciales del estudio. En las condiciones de la colonia de ratones durante este experimento, los ratones que reciben un dosis letal de 11 Gy vivieron 48 horas más si se trataron con SW033291 que si recibieron control de vehículo, habiendo fallecido todos los ratones de control en el día 8; mientras que todos los ratones tratados SW033291 habían fallecido en el día 10.

15 Tabla 7

		10/2	10/3	10/4	10/5	10/6	10/7	10/8	10/9	10/10	10/11	10/12	10/13		10/23
Dosis de radiación	Rama de tratamiento	Día 0	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Día 15	Día 16	Día 25
7Gy	Solución salina	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		Parece Sano
	SW033291	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		Parece sano
9Gy	Solución salina	3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	1	0		
	SW033291	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	1	0		
11Gy	Solución salina	3	3	3	2	0									
	SW033291	3	3	3	3	3	2	0							

20 La tabla 8 muestra el número de ratones que sobreviven en días secuenciales de un estudio de ratones tratados a 11 Gy tratadas o bien con control de vehículo o bien con SW033291 por vía i.p., en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, administrándose SW033291 o bien a 5 mg/kg diariamente durante 7 días, 5 mg/kg diariamente en la totalidad del estudio, o bien a 5 mg/kg dos veces al día durante 7 días. De nuevo, los ratones tratados con SW033291 en cualquiera de estos programas de dosificación viven en promedio 1 - 2 días más que los ratones que reciben control de vehículo. La actividad de SW033291 en el fomento de la resistencia a los efectos tóxicos de radiación puede ampliarse a SW033291 y otros inhibidores de 15-PGDH similares en el fomento de la resistencia a otros ataques tóxicos similares, incluyendo pero sin limitarse a, Cytosan, fludarabina, quimioterapia y terapia de inmunosupresión.

25 Tabla 8

Condiciones de tratamiento	Viernes	Miérc.	Jueves	Viernes	Sábado	Domingo	Lunes
	12 Oct	17 Oct	18 Oct	19 Oct	20 Oct	21 Oct	22 Oct
	Día 0	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10

11 Gy	Solución salina (7 días, 1 dosis diaria)	2	2	2	2	0		
11 Gy	SW033291 (1 dosis diaria) durante 7 días	3	3	3	3	2	1	0
11 Gy	SW033291 (1 dosis diaria, continuo cada día)	3	3	3	3	3	2	0
11 Gy	Solución salina (7 días, 2 dosis diarias)	3	3	3	2	1	0	0
11 Gy	SW033291 (7 días, 2 dosis diarias)	3	3	3	3	3	2	0

**Ejemplo 8**

Análisis del efecto de SW033291 sobre la regeneración del hígado tras hepatectomía parcial

5 Este ejemplo muestra estudios que evalúan el efecto de SW033291 sobre la regeneración del hígado en ratones tras hepatectomía parcial.

10 La figura 51 muestra un dibujo de la anatomía del hígado de ratón y del procedimiento de hepatectomía parcial descritos en Mitchell *et al.*, Nature Protocols, 3, 1167-1170 (2008), en los que los lóbulos lateral izquierdo y medio se resecan, y entonces se observa la regeneración del hígado mediante hipertrofia de los lóbulos derecho y caudado restantes. La resección total es de aproximadamente el 70% de la masa de hígado de ratón. En estos estudios se sacrificaron los ratones usando inhalación de dióxido de carbono. Se pesó el cuerpo del ratón en su totalidad. Se extirpó el hígado del ratón; se recortaron los restos necróticos de la resección quirúrgica; y se pesó el hígado regenerado.

15 La figura 52(A-D) muestra una vista anatómica del hígado de ratón. Las fotografías a la izquierda son vistas preoperatorias, y las de la derecha son vistas tras la resección. Las dos fotografías superiores muestran una vista anterior del hígado y la de la izquierda presenta visualmente el lóbulo medio una parte del lóbulo lateral. Las dos fotografías inferiores muestra una vista inferior del hígado y de la izquierda presenta visualmente el lóbulo lateral. En el procedimiento de hepatectomía parcial, se resecan los lóbulos medio y lateral tal como se muestra a la derecha.

20 La figura 53(A-D) a la izquierda reitera fotografías de vistas inmediatas tras hepatectomía del hígado de ratón, con una vista anterior en la parte superior y una vista inferior en la parte inferior. La figura en la parte superior derecha muestra la vista *in situ* del hígado regenerado en el día posoperatorio (POD, *post-operative day*) 10, que muestran hipertrofia de los lóbulos derecho y caudado restantes. La fotografía en la parte inferior derecha muestra la vista anterior del hígado regenerado después de la extirpación del cuerpo del ratón. La región blanquecina en el borde superior derecho del hígado es el muñón necrótico de la resección, y se recorta antes de la pesada.

25 Se realizó el primer estudio con ratones C57BL/6J macho de 10 semanas de edad, que recibieron diariamente SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, frente un vehículo solo, y se evaluaron diariamente para determinar la regeneración del hígado con 5 ratones de control y 5 SW033291 receptores sacrificados en cada punto de tiempo. En este estudio, se empleó anestesia de ketamina.

30 Las figuras 54(A-B) muestran micrografías del hígado teñido con hematoxilina y eosina en el día posoperatorio 3 (POD 3) en el ratón tratado con SW033291 frente al ratón de control, marcándose las figuras mitóticas mediante flechas de color amarillo en el hígado de ratón tratado con SW033291 a la izquierda y mediante flechas de color verde en el hígado de ratón de control a la derecha.

35 La figura 55 muestra un gráfico del número de mitosis por campo de alta potencia en hígados de ratones tratados con SW033291 frente a de control en los días posoperatorios dos a cinco (2D-5D). Se contaron las figuras mitóticas en 10 campos de alta potencia (40X) de cada uno de 5 hígados por ratón SW033291 o de control por día. Los ratones tratados con SW033291 demostraron una mitosis hepática aumentada significativamente frente a los controles en los días 3 y 4.

40 La tabla 9 muestra los números de mitosis por campo de alta potencia aleatorio contado en hígados de ratones de control frente a tratados con SW033291 en los días posoperatorios 2 a 5 (2D-5D). Los ratones tratados con SW033291 muestran números aumentados significativamente de células hepáticas mitóticas en los días posoperatorios 3 y 4.

Tabla 9

Media del Índice mitótico (40x) + D.E.	Control	SW033291	valor de p
2D	0,7000 ± 0,1933	1,240 ± 0,2330	0,0915

3D	2,000 ± 0,4364	6,160 ± 0,3250	< 0,0001
4D	2,560 ± 0,2242	4,560 ± 0,7190	0,0107
5D	0,2000 ± 0,1069	0,2400 ± 0,08718	ns

La figura 56 muestra las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas tras hepatectomía parcial en ratones C57B1/6j de control frente a tratados con SW033291 a los que se les inyectó SW033291 5 mg/kg por vía i.p. diariamente (qd) empezando en el día posoperatorio 0 y continuando en toda la duración. El gráfico presenta visualmente valores de los días posoperatorios 2-7 (POD 2-7). El grupo de ratones con inyección qd de SW033291 alcanzaron una mayor razón de peso del hígado con respecto al corporal de los días posoperatorios 4 -7, siendo el aumento estadísticamente significativo en los días posoperatorios 4 y 7.

Un grupo adicional de ratones recibieron SW033291 5 mg/kg dos veces al día (bid) y se analizaron en el día posoperatorio 3, representándose gráficamente los datos como POD3b. Este grupo de ratones también mostró un aumento estadísticamente significativo de la razón de peso del hígado con respecto al corporal en comparación con ratones de control.

Se realizó otro estudio que sometió a prueba los efectos de SW033291 administrado a 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid) sobre la regeneración del hígado en ratones C57BL/6J. Se usaron 10 ratones en la rama de control y 10 ratones en la rama de tratamiento con fármaco para el análisis de cada punto de tiempo del estudio. El estudio empleó de nuevo ratones macho de 10 semanas de edad que recibieron diariamente SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, frente un vehículo solo, sacrificándose diariamente 10 ratones tratados con fármaco y 10 de control para comparación. En este estudio se empleó anestesia de ketamina.

La figura 57 muestra un gráfico de la razón de peso del hígado con respecto al corporal obtenida tras hepatectomía parcial en ratones C57BL/6J de control frente a tratados con SW033291 a los que se les inyectó SW033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid) empezando 1 hora tras la cirugía y se continuó en toda la duración. El gráfico presenta visualmente valores de los días posoperatorios 2-7 (POD 2-7). El grupo de ratones a los que se les inyectó bid SW033291 muestran una razón de peso del hígado con respecto al corporal frente a ratones de control mayor de manera estadísticamente significativa en los días posoperatorios 3, 4 y 7.

La figura 58 retoma el gráfico de la razón de peso del hígado con respecto al corporal obtenida tras hepatectomía parcial en ratones de control frente a en ratones tratados con sw033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día. En los datos encerrados dentro del recuadro azul, se inició el tratamiento con fármaco 1 hora tras la cirugía, y se observan aumentos significativos de la razón de peso del hígado con respecto al corporal en ratones tratados con fármaco desde el día posoperatorio (POD) 3 en adelante. En los datos encerrados dentro del recuadro rojo, se suministra la primera dosis de sw033291 comenzando 1 hora antes de la cirugía, y se observa un aumento significativo de la razón de peso del hígado con respecto al corporal tan pronto como en el día posoperatorio 1, el día tras la cirugía.

Las figuras 59(A-B) muestran gráficos de los niveles de ALT en suero tras hepatectomía parcial en un ratón de control frente a un ratón tratado con sw033291 a 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid). Se comparan los valores del día posoperatorio 1 a la izquierda, y se comparan los valores de los días posoperatorios 2-7 a la derecha. Los valores de ALT son menores en el ratón tratado con fármaco.

La figura 60 muestra un gráfico de los niveles de bilirrubina en suero tras hepatectomía parcial en un ratón de control frente a un ratón tratado con SW033291 a 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid) de los días posoperatorios (POD) 1 - 7.

En otro estudio, se sometió a prueba SW033291 en el modelo de hepatectomía parcial usando la cepa FVB de ratones a los que se les administró SW033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid), administrado en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, usando 5 ratones tratados frente a 5 ratones de control tratados con vehículo solo para el análisis en cada punto de tiempo desde el día posoperatorio (POD) 1-7. En este estudio se empleó anestesia de ketamina.

La figura 61 muestra un gráfico de la razón de peso del hígado con respecto al corporal obtenida tras hepatectomía parcial en ratones FVB tratados con SW033291 5 mg/kg por vía i.p. frente a ratones de control tratados con vehículo solo. Los ratones tratados con SW033291 muestran un aumento de la razón de peso del hígado con respecto al corporal de los días posoperatorios 2-7, siendo el aumento estadísticamente significativo en POD, 2,3, 4 y 7.

En otro estudio, SW033291 se sometió a prueba en una hepatectomía parcial model usando la cepa FVB de ratones a los que se les administró SW033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día (bid), empezando 1 hora antes de la cirugía. Se emplearon ratones macho de 10 semanas de edad, usándose 10 ratones tratados y 10 ratones de control para el análisis en cada punto de tiempo desde el día posoperatorio (POD) 1-7. En este estudio, se empleó anestesia de isoflurano. También se usaron ratones deficientes (KO) en 15-PGDH tratados con vehículo como

elemento de comparación adicional.

La figura 62 muestra un gráfico que representa los pesos corporales preoperatorios de ratones FVB usados para el análisis de regeneración del hígado en los días posoperatorios 2, 3, 4 y 7. Los ratones de control y tratados con SW033291 usados cada día coinciden bien.

La figura 63 muestra un gráfico que representa el peso del segmento de hígado resecado (LWt resecado) de ratones tratados o bien con SW033291 o bien con control de vehículo y sometidos a ensayo para determinar la regeneración del hígado en los días posoperatorios (POD) 2, 3, 4 y 7.

El peso de los hígados resecados coincide bien entre ratones de control y tratados con fármaco cada día, excepto en el día 7, cuando el peso del hígado resecado fue mayor en los ratones tratados con SW033291 que en los de control.

La figura 64 muestra un gráfico que representa los pesos de hígado obtenidos (Regenerado\_LWt) tras hepatectomía parcial en ratones tratados con SW033291 y de control en los días posoperatorios 2, 3, 4 y 7 (POD 2, 3, 4, 7). Los ratones tratados con SW033291 muestran pesos de hígado significativamente mayores frente a ratones de control en todos los puntos de tiempo, teniendo los ratones tratados con SW033291 un peso de hígado mayor en aproximadamente un 25% en el día posoperatorio 7 que los ratones de control.

La figura 65 muestra un gráfico que representa las razones de peso de hígado con respecto al corporal obtenidas (LBWR) tras hepatectomía parcial en ratones tratados con SW033291 y de control en los días posoperatorios 2, 3, 4 y 7 (POD 2, 3, 4, 7). Los ratones tratados con SW033291 muestran razones de peso del hígado con respecto al corporal significativamente mayores frente a ratones de control en todos los puntos de tiempo, teniendo los ratones tratados con SW033291 una razón de peso del hígado con respecto al corporal mayor en aproximadamente un 20% en el día posoperatorio 7 que los ratones de control.

La figura 66 muestra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal en el día posoperatorio 4 tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados dos veces al día con SW033291 5 mg/kg o con control de vehículo, con 10 ratones en cada rama. Las barras gruesas indican la mediana de la población. El margen de caja superior indica el límite inferior del cuartil superior. El margen de caja inferior indica el límite superior del cuartil inferior. Los ratones tratados con SW033291 muestran una razón de peso del hígado con respecto al corporal significativamente aumentada a  $P = 0,004$ .

La figura 67 muestra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal en el día posoperatorio 7 tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados dos veces al día con SW033291 5 mg/kg o con control de vehículo, con 10 ratones en cada rama. Las barras gruesas indican la mediana de la población. El margen de caja superior indica el límite inferior del cuartil superior. El margen de caja inferior indica el límite superior del cuartil inferior. Los ratones tratados con SW033291 muestran una razón de peso del hígado con respecto al corporal significativamente aumentada a  $P = 0,001$ .

La figura 68 muestra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara la razón de peso del hígado con respecto al corporal en el día posoperatorio 4 tras hepatectomía parcial de ratones FVB tratados dos veces al día con SW033291 5 mg/kg o con control de vehículo, con 10 ratones en cada rama. También se muestra la razón de peso del hígado con respecto al corporal en el día posoperatorio 4 de ratones deficientes en 15-PGDH (PGDH-KO) tratadas con vehículo solo. Las barras gruesas indican la mediana de la población. El margen de caja superior indica el límite inferior del cuartil superior. El margen de caja inferior indica el límite superior del cuartil inferior. Los ratones tratados con SW033291 muestran una razón de peso del hígado con respecto al corporal significativamente aumentada a  $P = 0,001$ . Los ratones deficientes en 15-PGDH también muestran una mayor razón de peso del hígado con respecto al corporal que los ratones de tipo natural 15-PGDH tratados con vehículo, lo que respalda que la regeneración de la actividad del hígado de SW033291 está mediada a través de la inhibición de 15-PGDH. El mayor efecto de desactivación génica de 15-PGDH sugiere además que el aumento del efecto de SW033291 puede lograrse con la modificación adicional del programa de dosificación y la administración.

La figura 69 muestra una visualización de células en fase S tras hepatectomía parcial en el día posoperatorio 2 en hígados de ratones tratados con SW033291 y de control tratados con vehículo. Se les inyectó a los ratones BrdU a 50 mg/kg por vía i.p. 2 horas antes del sacrificio, y entonces se visualizaron las células en fase S mediante tinción de los hígados con un anticuerpo que detecta BrdU que se ha incorporado en ADN. Campos representativos a 10X magnificación muestran el claro aumento de los números de células positivas para BrdU en el hígado tratado con SW033291.

La figura 70 muestra vistas de alta potencia (40X) de campos representativos del estudio de la figura 69.

La figura 71 muestra una representación gráfica de “cajas y bigotes” que compara el tanto por ciento de células positivas para BrdU en hígados de ratones tratados con SW033291 frente a tratados con control de vehículo en el día posoperatorio 2 tras hepatectomía parcial. Se representan gráficamente en cada grupo el tanto por ciento de

células positivas para BrdU de 100 campos de alta potencia (40X aumentos) aleatorios contados como 10 campos de cada uno de 10 ratones tratados con fármaco y cada uno de 10 ratones tratados con vehículo de control. Las barras de color negro gruesas muestran valores de mediana de cada distribución. El margen de caja superior indica el límite inferior del cuartil superior. El margen de caja inferior indica el límite superior del cuartil inferior. SW033291 muestra un aumento de más de 2 veces de la mediana de células en fase S en el día posoperatorio 2 (P<0,05).

**Ejemplo 9**

Análisis del efecto de SW033291 sobre la supervivencia tras sobredosis de paracetamol (Tylenol)

Este ejemplo proporciona datos que muestran los efectos de SW033291 en la mediación en la resistencia a dosis letales de la toxina hepática paracetamol (Tylenol).

En el estudio, se les inyecta a ratones C57BL/6J hembra de 11 semanas de edad por vía i.p. una suspensión de paracetamol en solución salina tamponada con fosfato administrada a la dosis DL50 de 600 mg/kg.

La tabla 10 proporciona un resumen tabular del número de ratones que sobrevivieron de una cohorte inicial de 6 ratones que se tratan todos con paracetamol (Tylenol) en solución salina tamponada con fosfato administrada por vía i.p. a la dosis DL50 de 600 mg/kg.

Tabla 10

1 dosis diaria, la primera dosis inmediatamente después de la inyección de Tylenol											
Tratamiento	0 h	16 h	24 h	40 h	48 h	64 h	72 h	88 h	96 h	112 h	120 h
Solución salina	6	6	5	4	3	3	3	3	3	3	3
SW033291 5 mg/kg	6	6	6	4	4	4	4	4	4	4	4
2 dosis diarias, la primera dosis inmediatamente después de la inyección de Tylenol											
Tratamiento	0 h	16 h	24 h	40 h	48 h	64 h	72 h	88 h	96 h	112 h	120 h
Solución salina	6	6	6	4	3	3	3	3	3	3	3
SW033291 5 mg/kg	6	6	6	4	3	3	3	3	3	3	3

Se tratan adicionalmente ratones de prueba con SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W empezando inmediatamente tras el paracetamol y continuando una vez al día, o dos veces al día. Se tratan adicionalmente ratones de control con vehículo solo una vez al día o dos veces al día. Se registra la supervivencia desde el punto de tiempo 0 de administración de paracetamol a lo largo de las 120 horas siguientes. No se observa diferencia entre la supervivencia de ratones tratados con SW033291 y de control.

La tabla 11 muestra un resumen del número de ratones que sobrevivieron de una cohorte inicial de 12 ratones C57BL/6J hembra de once semanas de edad que se tratan todos con paracetamol (Tylenol) en solución salina tamponada con fosfato administrada por vía i.p. a la dosis DL50 de 600 mg/kg. Los ratones se tratan adicionalmente o bien con SW033291 o bien con control de vehículo.

Tabla 11

Supervivencia	0 h	16 h	24 h	40 h	48 h	64 h	72 h	88 h	96 h	112 h	120 h
SW033291 5 mg/kg	12	12	12	11	10	10	10	10	10	10	10
Solución salina	12	12	12	6	5	5	5	5	5	5	5

Se administró SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W dos veces al día (bid) empezando 48 horas antes de la inyección de paracetamol y continuando durante 48 horas tras la inyección de paracetamol para un total de 9 dosis. A las 120 horas tras la inyección de paracetamol, han sobrevivido 10 de 12 ratones en la cohorte tratada con SW033291 frente a 5 de 12 ratones en la cohorte tratada con control de vehículo, P = 0,045 en una prueba exacta de Fisher unilateral. Por tanto, la administración previa de SW033291 protege frente a la hepatotoxicidad letal del paracetamol.

La tabla 12 muestra un resumen del número de ratones que sobrevivieron de una cohorte inicial de 6 ratones C57BL/6J hembra de once semanas de edad que se tratan con paracetamol (Tylenol) en solución salina tamponada con fosfato administrada por vía i.p. a la dosis DL50 de 600 mg/kg.

Tabla 12

Supervivencia	0 h	16 h	24 h	40 h	48 h	64 h	72 h	88 h	96 h	112 h	120 h
SW033291 5 mg/kg	6	6	5	4	3	3	3	3	3	3	3
Solución salina	6	6	5	3	2	2	2	2	2	2	2

5 Los ratones se tratan adicionalmente o bien con SW033291 o bien con control de vehículo. Se administró SW033291 5 mg/kg por vía i.p. en un vehículo del 10% de etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W dos veces al día (bid) empezando 3 horas antes de la inyección de paracetamol y continuando de 0 a 48 horas tras la inyección de paracetamol para 6 dosis totales. A las 120 horas tras la inyección de paracetamol 3 de 6 ratones sobrevivieron en la cohorte tratada con SW033291 frente a 2 de 6 ratones en la cohorte tratada con control de vehículo.

10 La tabla 13 muestra un resumen del número de ratones que sobrevivieron de una cohorte inicial de 7 ratones C57BL/6J de tipo natural (WT) 15-PGDH hembra de 25 semanas de edad o 7 C57BL/6J deficientes (KO) en 15-PGDH hembra de 25 semanas de edad tratados con paracetamol (Tylenol) en solución salina tamponada con fosfato administrada por vía i.p. a la dosis DL50 de 600 mg/kg.

Tabla 13

Supervivencia	0 h	16 h	24 h	40 h	48 h	64 h	72 h	88 h	96 h	112 h	120 h
WT	7	7	7	5	4	3	3	3	3	3	3
KO	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6

15 A las 120 horas tras la inyección de paracetamol, sobreviven 6 de 7 ratones deficientes frente a 3 de 7 ratones de tipo natural. El aumento de la supervivencia de ratones deficientes en 15-PGDH concuerda con el beneficio de supervivencia de SW033291 que está mediado a través de la inhibición de 15-PGDH.

## 20 Ejemplo 10

### Análisis del efecto de SW033291 en colitis inducida por dextrano-sulfato de sodio (DSS)

25 Este ejemplo proporciona datos de estudios del efecto de SW033291 en la prevención de inducción de colitis en los ratones tratados con dextrano-sulfato de sodio (DSS). En el estudio, se alimentan ratones macho FVB de 8-12 semanas de edad con DSS al 2% en agua potable de 1-7 días, y luego se cambian a agua potable normal comenzando el día 8, y se continúa hasta el día 22. Se tratan los ratones con SW033291 5 mg/kg por vía i.p. dos veces al día en un vehículo del 10% etanol, el 5% de Cremophor EL, el 85% de D5W, a 125 ug/200 ul, frente a un vehículo solo. Se registra diariamente la puntuación clínica (peso corporal, sangrado rectal, consistencia fecal), se somete a ensayo la puntuación endoscópica (número de úlceras, engrosamiento de la mucosa y patrón vascular) en los días 8, 11, 15. Se sacrifican los ratones en los días 1, 8, 15 y 22 para la evaluación de la longitud del colon, peso del colon, número de úlceras, área de úlcera y daño de criptas.

35 La tabla 14 muestra un resumen de las propiedades de nivel inicial de edad y peso de los 24 ratones tratados con SW033291 y los 24 ratones del grupo de control usados en el estudio. También se proporcionan las características de nivel inicial de 4 ratones macho FVB deficientes en 15-PGDH (KO) que se usan como grupo de comparación.

Tabla 14

Ratones FVB macho de 8-12 semanas de edad PGDH WT/ KO				
Estudio con DSS	Control-WT	Tratamiento-WT	KO	Valor de p
Número	24	24	4	
Sexo	M	M	M	
Edad (días)	74,1 ± 3,7	74,2 ± 4,0	73,9 ± 3,4	0,655
Peso (g)	26,3±1,19	26,8±1,78	27,4±1,4	0,391

40 La figura 72 muestra un gráfico de los cambios promedio con respecto al peso inicial de la cohorte de ratones de control frente a tratados con SW033291 durante los 22 días del estudio. Los ratones tratados con SW033291 muestran mayor peso en todos los puntos de tiempo, y en particular, muestran mayor aumento de peso después del lavado de DSS que los ratones de control, P = 0,001.

45 La figura 73 muestra un gráfico del índice de actividad de enfermedad (DAI) de la cohorte de ratones de control frente a tratados con SW033291 durante los 22 días del estudio. Se calcula el índice de actividad de enfermedad

como un promedio igualmente ponderado del cambio con respecto al peso inicial, la consistencia fecal y la presencia de sangrado rectal, con cada componente normalizado para abarcar un intervalo numérico idéntico. Los ratones tratados con SW033291 muestran un menor índice de actividad de enfermedad que los de control en cada día del estudio,  $P < 0,001$ .

5 La figura 74 muestra el diseño del estudio en el que el examen colonoscópico del colon izquierdo, hasta la flexión esplénica, se llevó a cabo en ratones vivos en los días 8, 11 y 15, bajo anestesia con isoflurano. Además, se llevó a cabo colonoscopia *post-mortem* de todo el colon en dos ratones tratados con SW033291 y dos ratones de control en el día 15, con hallazgos que confirmaban que las ulceraciones inducidas por DDS estaban confinadas en gran medida al colon descendente distal con respecto a la flexión esplénica.

15 Las figuras 75(A-B) muestran en la parte inferior izquierda el colon tal como se visualiza durante una colonoscopia de un ratón de control tratado con DSS que muestra pérdida del patrón muscular mucoso y una ulceración macroscópica. En la parte inferior derecha se muestran los hallazgos colonoscópicos de un ratón tratado con DSS que recibe SW033291, con solo una pequeña úlcera y por lo demás con el mantenimiento del patrón vascular mucoso normal. El gráfico de arriba muestra los números de úlceras presentes en los días 8, 11 y 15 en los ratones de control frente a tratados con SW033291. El tratamiento con SW033291 previene dos tercios de la formación de úlceras. Estudios adicionales de ratones deficientes en 15-PGDH muestran que la desactivación del gen 15-PGDH previene un 95% la formación de úlcera de colon. Estos hallazgos apoyan que la actividad de prevención de la colitis de SW033291 se regula a través de su actividad como inhibidor de 15-PGDH, y sugieren además que modificaciones de la dosificación y administración del fármaco pueden proporcionar prevención añadida de la colitis.

25 La figura 76 muestra la cuantificación de la carga de úlcera en el día 15 de ratones tratados con DSS tal como se determina mediante la incrustación de la longitud completa de los colones fijados con formalina en bloques de parafina, y luego inspección microscópica de una sección aleatoria de 5  $\mu\text{m}$  a lo largo de la longitud del colon completa para la visualización y medición de la mucosa ulcerada. El gráfico muestra que la longitud promedio de la mucosa ulcerada es 4,48 mm por sección de colon en ratones de control ( $N = 9$  ratones) y se reduce en un 61% hasta una longitud de 1,74 mm por sección de colon en ratones tratados ( $N = 6$  ratones) con SW033291 (fármaco),  $P = 0,045$ . De nuevo, la desactivación del gen 15-PGDH (KO) es altamente eficaz en la prevención de la ulceración del colon, apoyando que el efecto terapéutico de SW033291 se regula a través de la inhibición de 15-PGDH.

35 Las figuras 77(A-B) muestran ejemplos de puntuaciones de mucosa colónica murina según el Murine Endoscopic Index of Colitis Severity (MEICS) (Becker C. *et al.* Gut 2005; 54: 950-954). En la parte superior (A) se muestran los hallazgos colonoscópicos y puntuaciones de MEICS para un ratón tratado con DSS que recibe SW033291. En la parte de abajo (B) se muestran los hallazgos colonoscópicos y puntuaciones de MEICS de un ratón tratado con DSS que recibe vehículo sólo.

40 La figura 78 muestra gráficos de las puntuaciones de MEICS para ratones tratados con DSS que reciben SW033291 (tratamiento) frente a vehículo (control). Las puntuaciones de MEICS muestran significativamente menos actividad de colitis en ratones tratados con SW033291 en los días 8, 11 y 15 del estudio.

45 Además de la inspección visual macroscópica y la puntuación de actividad de colitis mediante el índice MEICS, se fijaron con formalina colones de longitud completa de ratones y se incrustaron en parafina y se llevó a cabo la puntuación microscópica del daño de criptas usando la escala de gravedad 0 - 4 de Cooper HS. *Et al.*, Lab Invest. 1993; 69:238-249. Para este análisis, se dividieron los colones en 3 segmentos de colon proximal, medio y distal, cada uno aproximadamente con una longitud de 1,6 cm, cada segmento se subdividió además en 4 secciones cada una de aproximadamente 4 mm de longitud. Para cada sección se multiplicó la puntuación de gravedad del daño de criptas por la longitud en mm de la zona dañada, creando un índice de gravedad de criptitis de 0-16. Se calculó un índice de gravedad de criptitis promedio para cada segmento (colon proximal, medio y distal) y se determinó el índice de gravedad de criptitis del colon total sumado en una escala de 0-48 para cada colon de ratón. En paralelo con la puntuación visual de MEICS, el índice de gravedad de criptitis microscópica en el día 8 del protocolo de DSS fue significativamente mayor en ratones de control (valor de 9,49) que en los ratones tratados con SW033291 (valor de 3,16),  $P < 0,05$  (datos descritos pero no mostrados en la figura).

55 La figura 79 muestra la evaluación del efecto de SW033291 sobre el mantenimiento de la síntesis de ADN en la mucosa colonica de ratones tratados con DSS. Se inyectó a los ratones BrdU a 100 mg/kg por vía i.p. 3 horas antes del sacrificio y entonces se fijaron con formalina y se incrustaron en parafina colones de longitud completa. Se visualizaron mediante tinción de inmunofluorescencia de secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor células en fase S, que han incorporado BrdU en el ADN, con un anticuerpo que detecta el BrdU. Se visualizaron las criptas colónicas mediante tinción inmunofluorescente con un anticuerpo frente al marcador epitelial E-cadherina. Los recuadros fotográficos muestran fotomicrografías de campos de alta potencia tomadas de la parte media del colon en el día 8 del protocolo de DSS de ratones de control, ratones tratados con SW033291 (tratamiento) y ratones deficientes en 15-PGDH (KO). La inmunofluorescencia de color rojo identifica núcleos positivos para BrdU, y la inmunofluorescencia de color verde identifica colonocitos positivos para E-cadherina. Se determina el número de células positivas para BrdU por cripta contando el número de células rojas y verdes doblemente marcadas por cripta promedio. No se cuentan las células sólo de color verde que no están en la fase S, y no se cuentan tampoco las células sólo de color rojo, que

son probablemente células estromales fuera de las criptas. En las fotomicrografía mostrada las criptas se presentan como orientadas horizontalmente en ratones de control y tratados con SW033291, y se presentan criptas como orientadas horizontalmente en los ratones deficientes en 15-PGDH. En las fotografías los números de células en fase S son menores en los ratones de control y aumentan en los ratones tratados con SW033291, y aumentan además en los ratones deficientes. En las fotografías particulares mostradas, los criptas de ratones de control tanto carecen de células en fase S como también disminuyen visualmente en altura; mientras que la altura de las criptas aumenta en las criptas mostradas de ratones tratados con SW033291, y la altura de las criptas aumenta adicionalmente en las criptas mostradas de ratones deficientes en 15-PGDH. El gráfico representa la suma del número promedio de células positivas para BrdU por cripta en el colon distal más el número promedio de células positivas para BrdU por cripta de colones medios de ratones de control (Cn), tratados con SW033219 (Tx) y deficientes en 15-PGDH (KO) en el día 1, día 8 y día 15 del protocolo de tratamiento con DSS. En el día 8, ratones tratados con SW033291 demuestran números 5,7 veces mayores de células positivas para BrdU que los ratones de control, que han perdido el 85% del valor del día 1 de células positivas para BrdU por cripta. Ratones deficientes en 15-PGDH no muestran pérdida de células positivas para BrdU en la cripta en el día 8, consecuente con el efecto protector de SW033291 que está mediándose mediante inhibición de 15-PGDH.

La tabla 15 muestra un resumen de la longitud del colon (en cm) en ratones tratados con DSS sacrificados en los días 8, 15 y 22, en ratones tratados con SW033291, frente a ratones de control tratados con vehículo, frente a ratones deficientes en 15-PGDH (KO), en donde la reducción del colon es una medida de la actividad de enfermedad.

Tabla 15

Reducción de la longitud del colon, puede correlacionarse con la gravedad de la ulceración del colon				
Punto de tiempo	Control	SW033291	KO	Valor de p
Nivel inicial	8,3+0,2	8,4+0,2		0,71
Día 8	6,6+0,4	6,6+0,1		1,0
Día 15	7,1+0,1	7,5+0,1	8,5+0,1	0,001
Día 22	7,4+0,2	8,6+0,3		0,012

Los ratones de control tratados con vehículo muestran significativamente mayor reducción del colon en el día 22 frente a ratones tratados con SW033291, P = 0,012. Esta comparación también se muestra gráficamente en la figura 80.

La tabla 16 muestra un resumen de los pesos de ratones (g) y longitudes del colon (cm) en el día del sacrificio para ratones tratados con DSS que reciben SW033291 o control de vehículo.

Tabla 16

<b>Peso en el sacrificio - g</b> Punto de tiempo	Vehículo	SW033291	KO
Nivel inicial	26,3+0,7	25,9+0,7	
Día 8	25,4+0,7	26,4+0,5	
Día 15	24,4+0,5	25,2+0,9	29,2+1,3
Día 22 *	26,3+0,7	28,2+0,5	
<b>Longitud del colon - cm</b> Punto de tiempo			
Nivel inicial	8,3+0,2	8,4+0,2	
Día 8	6,6+0,4	6,6+0,1	
Día 15	7,1+0,1	7,5+0,1	8,5+0,1
Día 22 *	<b>7,4+0,2</b>	<b>8,6+0,3</b>	

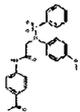
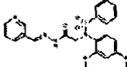
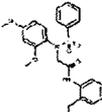
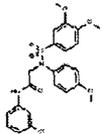
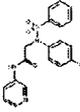
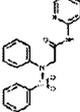
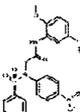
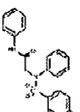
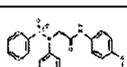
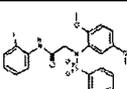
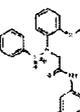
En el día 22 los ratones tratados con SW033291 muestran mayor peso corporal y mayores longitudes del colon, indicativo del efecto terapéutico de SW033291 que protege frente a la colitis inducida por DSS.

### Ejemplo 11

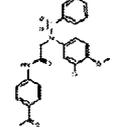
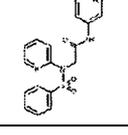
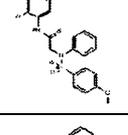
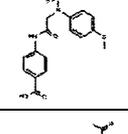
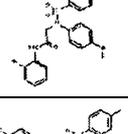
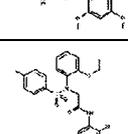
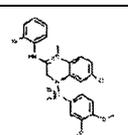
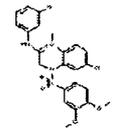
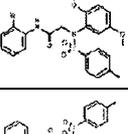
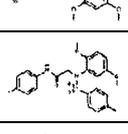
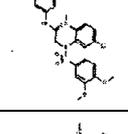
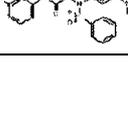
Análisis de análogos del compuesto principal SW054384, un activador de 15-PGDH

Este ejemplo proporciona datos sobre un grupo de análogos estructurales de SW054384. Los datos en la tabla 17 caracterizan análogos obtenidos por la Case Western Reserve University de una biblioteca química compartida con la University of Cincinnati. Los datos en la tabla 18 son análogos pedidos de fuentes comerciales. Los datos en la tabla 19 son análogos mantenidos en bibliotecas químicas o sintetizados por miembros del grupo de inventores en la University of Texas Southwestern.

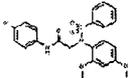
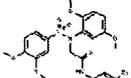
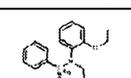
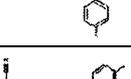
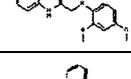
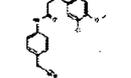
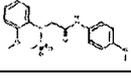
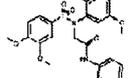
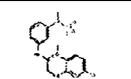
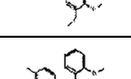
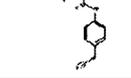
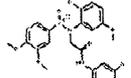
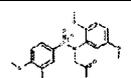
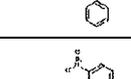
Tabla 17

Estructuras	Nombre	Actividad de indicador V9M (2,5 $\mu$ M)	Actividad de indicador V9M (7,5 $\mu$ M)	Actividad de indicador LS174T (2,5 $\mu$ M)	Actividad de indicador LS174T (7,5 $\mu$ M)	Actividad de indicador V503 (2,5 $\mu$ M)	Actividad de indicador V503 (7,5 $\mu$ M)
	292301	12,92	23,57	12,07	-3,67	-0,91	-3,60
	396087	-8,51	10,08	4,37	10,18	17,23	30,79
	407572	-8,45	-6,12	2,22	6,94	17,22	35,88
	408961	-12,39	0,56	2,46	-4,51	11,71	17,61
	414177	10,61	7,72	9,51	-0,62	-2,80	-5,73
	414183	-9,15	-3,89	5,35	-4,77	11,49	37,17
	414195	-13,95	-16,76	-1,15	2,34	13,14	19,47
	474738	-7,27	3,48	-0,36	3,50	17,03	24,59
	474759	2,58	6,40	5,54	-0,03	-5,04	-12,72
	503270	-4,47	24,06	12,29	32,82	29,88	42,14
	537833	-7,54	-7,44	4,94	9,04	42,31	73,22

ES 2 647 850 T3

	539430	21,27	21,35	5,62	10,45	38,75	103,04
	543512	36,82	79,64	18,05	8,33	-4,56	-4,26
	543716	4,20	-0,14	3,26	-2,08	-8,04	-8,60
	742790	13,79	23,09	12,77	17,32	5,94	34,38
	771064	43,32	-19,19	-2,11	-29,63	-13,75	-24,80
	771069	-22,56	-54,66	-29,88	-82,88	-62,71	-90,88
	771074	13,50	24,69	20,67	20,60	22,96	39,52
	771081	-14,22	7,58	5,74	15,38	31,87	51,68
	771130	8,67	5,84	8,66	-0,48	-10,19	-3,48
	771132	-2,26	12,24	13,98	13,54	24,75	40,76
	771138	-4,36	6,75	13,64	9,23	34,44	72,58
	771146	-38,07	-78,30	-31,58	-68,78	-49,73	-86,60
	771432	-7,11	-3,13	3,86	4,24	33,72	42,82
	785160	-15,99	21,00	5,93	48,64	33,85	44,75

ES 2 647 850 T3

	785161	0,54	3,48	10,68	-41,92	56,72	-52,51
	785254	-16,05	-8,48	2,93	4,29	16,14	28,28
	918280	-16,26	-77,26	-21,21	-72,09	-35,68	-74,96
	919570	87,71	127,26	78,80	102,68	80,94	104,40
	919576	49,89	63,03	17,49	30,74	49,20	73,74
	920847	9,26	17,73	6,18	2,97	-4,47	-10,57
	924740	-0,54	6,33	7,69	16,73	20,16	52,17
	924787	-1,45	18,08	4,32	13,10	21,87	47,97
	928861	64,65	134,49	74,89	124,37	73,17	138,59
	939417	-11,15	-9,81	6,50	-1,64	12,58	16,25
	967134	-10,12	-2,64	5,11	5,73	18,43	36,12
	1002065	7,38	18,64	9,90	15,22	38,12	52,53
	1002654	-2,58	-3,96	5,51	-1,24	0,78	19,23
	1003012	-10,45	-0,90	5,54	19,77	34,43	58,54

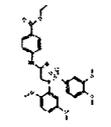
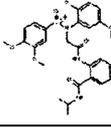
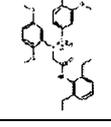
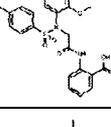
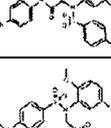
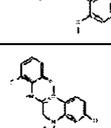
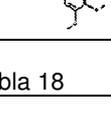
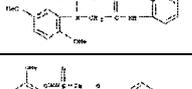
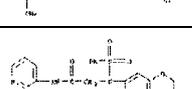
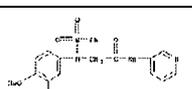
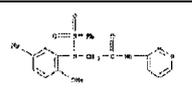
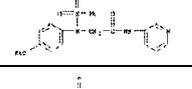
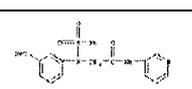
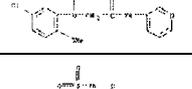
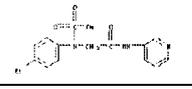
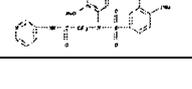
	1003132	-5,60	-0,21	5,16	1,73	15,40	16,05
	1003378	-4,42	-3,27	7,30	1,27	7,23	16,73
	1003429	12,60	4,17	8,82	-6,88	-7,46	-19,23
	1003669	6,30	7,58	5,98	-1,93	1,22	27,08
	1004292	0,88	-0,21	20,34	0,14	23,50	21,16
	1004571	-6,09	10,99	12,35	29,28	29,09	85,80
	1004631	-3,66	12,03	4,51	45,32	52,12	87,08

Tabla 18

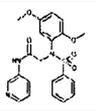
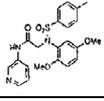
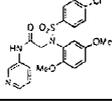
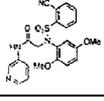
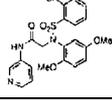
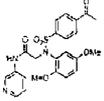
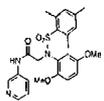
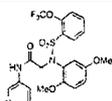
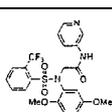
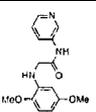
Estructura	Número CAS	Actividad de indicador V9M-SC3 (2,5 µM) (%)	Actividad de indicador V9M-SC3 % (7,5 µM)	Actividad de indicador Ls174T-SC1 % (2,5 µM)	Actividad de indicador Ls174T-SC1 % (7,5 µM)	Actividad de indicador V503-3H9-7 % (2,5 µM)	Actividad de indicador V503-3H9-7 % (7,5 µM)	% de inhibición enzimática (2,5 µM)	% de inhibición enzimática (7,5 µM)
	333447-10-2	-0,5	10	7,54	14,44	76,87	158,91	27,01	46,46
	332419-63-3	2,5	2	12,44	9,81	1,65	46,28	36,59	47,22
	311333-86-5	53	117,25	29,97	53,41	102,18	131,25	33,99	34,01
	428460-22-4	1,5	15,25	-7,63	-1,99	1,39	47,04	15,05	19,30
	426231-26-7	10	2,5	16,17	22,07	64,02	113,49	39,81	56,40
	339589-55-8	-7	8	-5,54	8,81	63,97	52,49	19,14	21,99
	339589-53-6	-1	4,25	51,18	89,74	199,56	105,28	35,46	37,35

ES 2 647 850 T3

	530107-57-4	59,5	116,5	5,45	8,27	52,62	84,39	21,74	9,25
	333449-58-4	6,5	71,25	-5,90	-3,99	50,08	20,72	9,72	-3,12
	333446-93-8	16,5	44	12,90	13,53	53,78	44,10	-5,31	5,85
	333450-97-8								
	311315-25-0			62,59	75,79			18,69	34,70
	701217-00-7	-2,05	79,49	-6,89	-0,54	20,078	33,42	10,07	13,12
	592469-85-7	-9,74	18,46	3,77	13,99	10,16	5,30	6,23	17,24
	526206-05-3	23,08	113,85	68,46	145,94	110,21	197,50	41,97	70,19
	428473-22-7	-17,95	2,051	-15,50	10,58	19,09	19,81	3,76	8,67
	418783-65-0	0,51	67,18	-12,59	5,81	11,63	6,68	10,85	12,12
	367929-80-4	-27,79	-19	18,80	-17,98	-0,87	-6,22	8,95	34,80
	335392-39-7	-12,82	7,18	-0,54	14,32	18,89	21,95	11,00	5,37
	331727-07-2	28,21	120	-7,53	9,47	8,13	1,14	9,65	17,53
	328012-52-8	-15,38	0,51	127,66	175,99	242,64	-4,89	67,39	82,06
	310875-38-8	-8,72	16,41	27,66	101,94	64,11	147,62	23,51	33,40
	833428-03-8	-4,10	17,44	25,08	47,36	96,38	149,97	16,39	49,25
	528580-69-0	4,71	-0,5	11,49	-4,81	66,03	110,41	-8,22	10,23
	461439-84-9	-30,29	-41,75	4,83	-34,97	1,57	5,41	9,28	3,35
	680599-58-0	-5,29	-22,5	11,489	-13,81	16,66	28,86	31,81	50,71

	505072-23-1	94,71	71,5	100,91	109,26	242,42	238,88	67,44	84,57
	527699-66-7	-31,03	-37,25	7,31	-29,61	38,78	70,92	-20,58	27,93

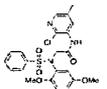
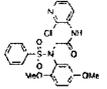
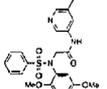
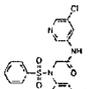
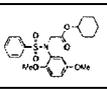
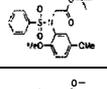
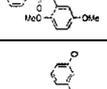
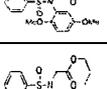
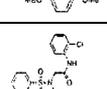
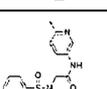
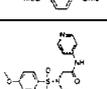
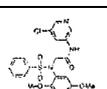
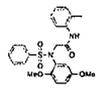
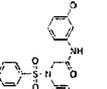
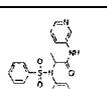
Tabla 19

Estructura	ID de UTSW	Actividad de indicador V9M-SC3 (2,5 µM) (%)	Actividad de indicador V9M-SC3 (7,5 µM) %	Actividad de indicador Ls174T-SC1 % (2,5 µM)	Actividad de indicador Ls174T-SC1 % (7,5 µM)	Actividad de indicador V503-3H9-7 % (2,5 µM)	Actividad de indicador V503-3H9-7 % (7,5 µM)	% de inhibición enzimática (2,5 µM)	% de inhibición enzimática (7,5 µM)	Inhibición enzimática (CI50)	Disminución de PGE-2 (L-1beta-A549, %)	Disminución de la Viabilidad celular en célula A549 (%)	Disminución de la formación de colonias %
	SW054384	116,34	147,89	129,91	155,75	148,89	157,49	20,17	58,20		41,96		
	SW202939	75,34	127,84	75,46	166,46	26,60	27,30	53,54	78,32				
	SW202942	52,69	104,86	53,59	122,86	37,26	86,87	48,39	64,86				
	SW202945	28,49	89,98	45,67	134,54	33,99	127,43	8,83	11,07				
	SW202949	5,76	-5,69	-1,58	-5,87	-12,46	5,32	12,52	34,37				
	SW202950	12,59	23,87	-2,70	10,69	-6,56	12,95	46,26	56,39				
	SW202953	12,97	34,79	20,69	30,69	31,98	50,93	8,81	15,06				
	SW202954	2,70	4,80	-4,59	-6,99	-8,94	2,39	6,02	9,88				
	SW202944	-0,95	-3,73	32,47	15,76	130,94	94,57	28,28	57,78				
	SW202948	-21,99	-23,05	-6,73	8,36	16,44	7,54	28,27	56,73				

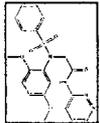
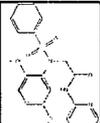
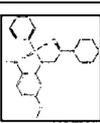
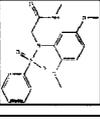
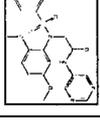
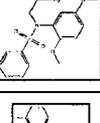
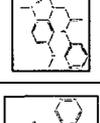
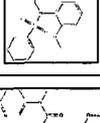
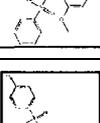
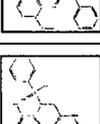
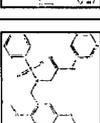
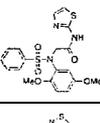
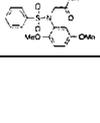
ES 2 647 850 T3

	SW202947	21,89	2,57	52,05	21,22	142,96	97,85	28,80	59,19				
	SW202952	-20,74	-19,53	-10,30	10,58	26,18	7,16	29,01	57,03				
	SW202940	146,58	181,17	147,86	210,71	180,73	182,58	24,30	63,29	~5 µM	80,46	45,18	
	SW202942	1,00	32,05	46,96	86,98	95,39	129,34	-3,72	28,87				
	SW202943	7,12	17,84	33,07	55,73	72,27	146,87	-7,42	21,84				
	SW202946	64,59	-41,52	105,33	-23,62	136,73	34,27	81,60	89,84				
	SW202951	4,56	17,661	34,26	47,64	97,53	131,49	-15,43	-8,59		-1,01		
	SW122063	1,67	4,80	22,56	19,86	42,51	44,12	-12,23	-10,49				
	SW202938	154,92	230,12	216,99	240,95	309,09	300,99	52,66	75,64	2,67 µM	-47,55		
	SW202941	-10,89	2,57	-23,79	-43,20	75,94	83,54	10,86	35,61				
	SW202965	-30,92	-25,80	-23,51	3,52	23,76	98,06	11,26	33,13				
	SW202966	-0,84	67,67	1,82	78,15	115,05	248,97	44,66	61,39				
	SW202967	-15,98	0	-11,69	9,37	34,05	69,62	-11,56	0,94				
	SW202968	-21,10	-7,36	-17,50	6,08	35,18	53,87	-7,09	0,78				
	SW202969	-20,96	-14,30	-15,87	17,90	62,42	126,16	0,91	9,43				
	SW202970	32,74	17,81	47,94	55,89	179,12	121,93	17,46	48,04				
	SW202971	-14,51	9,67	-7,91	34,55	85,50	169,04	-0,72	-13,18				

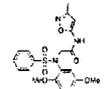
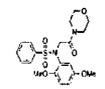
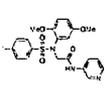
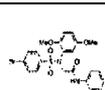
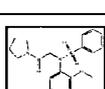
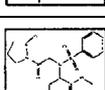
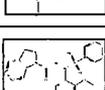
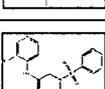
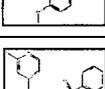
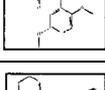
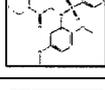
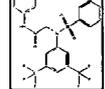
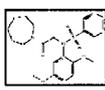
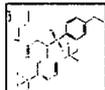
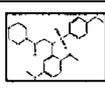
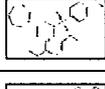
ES 2 647 850 T3

	SW202972	-15,42	0,14	-17,45	16,64	39,42	100,21	-6,29	-2,94				
	SW202973	-15,63	5,61	-16,38	19,29	41,53	106,91	3,3	13,55				
	SW202974	-9,04	35,90	-8,77	34,79	59,88	179,28	-4,42	24,85				
	SW202977	-8,69	26,22	-16,61	15,09	16,92	85,24	-14,95	-8,63				
	SW202978	-13,81	-0,07	-10,05	20,43	46,77	116,46	4,14	3,12				
	SW202979	-14,44	10,79	-8,92	17,83	41,64	133,05	3,92	6,24				
	SW202980	-27,55	-13,39	-7,34	5,17	11,41	50,62	-4,19	1,44				
	SW202985	-27,34	-21,87	-4,89	26,32	79,56	149,89	13,79	30,87				
	SW202986	-22,86	-9,60	0,21	33,80	60,17	175,41	-2,22	2,58				
	SW202987	-22,01	-21,03	-8,30	20,65	70,129	145,13	4,61	6,13				
	SW202988	7,36	54,41	40,50	125,44	125,39	258,27	10,27	33,70	~10 µM	16,79		
	SW202989	187,65	183,80	158,81	171,45	207,62	213,94	81,32	89,86	427 nM	69,40	30,59	
	SW202990	3,57	23,49	32,01	106,56	172,00	214,22	22,88	47,16				
	SW202975	-26,64	-8,97	-7,32	17,21	47,35	116,21	-14,82	4,53				
	SW202976	-18,51	9,60	-9,97	30,14	36,75	138,31	7,87	29,78				
	SW202991	-25,03	-7,50	-15,58	2,09	-6,08	8,90	-14,71	-6				

ES 2 647 850 T3

	SW203680	13,98	25,21	11,73	45,97	10,43	32,98	34,82	62,10				
	SW203681	17,99	121,71	120,56	151,88	90,42	72,37	36,77	64,87				
	SW131633	77,21	140,98	8,42	149,84	103,52	-40,56	23,13	35,21				
	SW203682	15,31	22,45	187,26	13,76	-32,19	79,19	15,73	36,23				
	SW203683	137,32	190,83	3,76	209,77	103,81	-41,03	23,41	57,09	~7 µM	-3,41		
	SW131635	11,39	15,05	110,93	14,07	-37,66	14,39	11,80	35,44				
	SW203684	50,72	74,89	170,37	119,07	81,19	52,46	36,35	64,72				
	SW203685	99,95	204,48	22,34	253,97	121,53	-33,18	44,34	73,30	5 µM	17,84		
	SW203686	15,05	30,30	116,07	28,49	-11,03	65,60	14,86	34,24				
	SW202942	85,24	132,15	30,25	143,05	69,32	3,29	36,78	53,24				
	SW203687	28,25	47,51	1,75	56,00	45,74	-41,65	15,07	33,55				
	SW203688	12,10	6,04	12,59	14,75	-28,10	-99,52	13,13	39,96				
	SW203691	7,78	19,82	5,47	22,03	47,07	90,04	2,62	3,12		36,76	0,00	
	SW203703	108,15	105,91	85,80	80,20	142,81	77,97	26,50	58,88		31,90	-1,97	

ES 2 647 850 T3

	SW203704	8,71	8,04	8,64	12,47	52,84	37,84	4,19	7,26		22,33	-2,70	
	SW125991	77,40	74,63	67,28	83,33	160,61	148,71	11,61	31,62		31,33	-2,13	
	SW203736	132,36	145,08	126,75	155,67	244,43	203,63	1,70	24,86		31,86	-3,06	2,5 $\mu$ M (3,12%), 7,5 $\mu$ M (5,18%)
	SW203737	93,37	103,47	76,65	85,09	175,94	153,58	23,81	42,45		47,78	-2,56	2,5 $\mu$ M (10,25%), 7,5 $\mu$ M (82,15%)
	SW208001	19,59	23,31	-0,61	1,87	-4,07	6,68	21,79	27,74				
	SW208002	-12,39	-21,84	-14,51	-14,57	-15,65	-16,54	34,73	59,23				
	SW208003	13,32	-11,46	37,00	45,62	117,02	75,883	15,19	20,91				
	SW208004	43,68	76,14	62,19	118,21	146,61	176,82	52,33	57,00				
	SW208005	42,44	19,75	63,86	53,93	102,72	61,24	44,10	52,02				
	SW208006	34,85	0,15	38,20	42,18	89,69	43,90	15,71	24,78				
	SW208007	-25,48	-26,41	-9,01	-5,15	-3,17	-2,10	48,27	38,41				
	SW208000	33,54	36,63	41,98	70,53	121,50	138,25	5,82	12,47				
	SW208008	-5,96	-0,92	-2,16	10,01	31,93	39,63	58,70	70,90				
	SW207997	59,48	71,03	87,60	94,08	148,77	156,90	-7,08	-0,86				
	SW207998	53,36	58,94	65,15	76,99	143,67	147,18	8,09	14,38				
	SW207999	128,11	124,32	98,00	122,98	123,99	110,28	-0,86	3,34				

Los datos proporcionados incluyen el nivel de inducción de un indicador de gen de fusión 15-PGDH-luciferasa, registrado como el % de inducción de la actividad luciferasa con respecto al nivel basal, en tres líneas celulares de

cáncer de colon, V9m, V503 y LS174T, modificadas por ingeniería genética para contener el indicador, y tratadas con compuesto o bien 2,5  $\mu\text{M}$  o bien 7,5  $\mu\text{M}$ . También se registró para algunos compuestos la inhibición de la actividad enzimática de proteína 15-PGDH recombinante tratada con compuestos 2,5  $\mu\text{M}$  o 7,5  $\mu\text{M}$ . También se registró para algunos compuestos la  $\text{CI}_{50}$  de cada compuesto para inhibir la actividad enzimática de 15-PGDH recombinante en un ensayo *in vitro*. Adicionalmente, para compuestos seleccionados se registra la disminución de los niveles de PGE2 en los medios de células A549 tratadas con compuesto que se han estimulado con IL-1 beta. Se registra adicionalmente para compuestos seleccionados el efecto sobre la viabilidad de células A549 tal como se mide mediante un ensayo Cell Titer-Glo, y el efecto de los compuestos sobre la formación de colonias de células A549.

Se indica en primer lugar que el grupo amino que participa en el enlace peptídico en SW054384 puede modificarse tal como se muestra en el compuesto MCD-03-025, y que el compuesto derivado conserva la capacidad para activar la expresión del indicador 15-PGDH luciferasa en líneas celulares indicadoras, y de hecho muestra menor inhibición de 15-PGDH recombinante a 2,5  $\mu\text{M}$  en el tubo de ensayo que el compuesto original SW054384.

Se indica también que la adición de flúor (SW203736) o bromo (SW203737) al anillo fenilo de SW054384, se tolera bien, y proporciona un compuesto que es activo en la inducción de actividad indicadora 15-PGDH luciferasa en líneas celulares, es similar o está mejorado en comparación con SW054383 original en la inhibición mínima de 15-PGDH recombinante a 2,5  $\mu\text{M}$ , y es similar o está mejorado a SW054384 original en la reducción de los niveles de PGE2 en el medio de células A549 tratadas con compuesto que se han estimulado con IL-1 beta. El anillo de fenilo de SW054384 también tolera la adición de un grupo metoxilo (SW202940), que proporciona un compuesto que es activo en la inducción de actividad indicadora 15-PGDH luciferasa en líneas celulares, y es similar a SW054384 original en la no inhibición de 15-PGDH recombinante a 2,5  $\mu\text{M}$ .

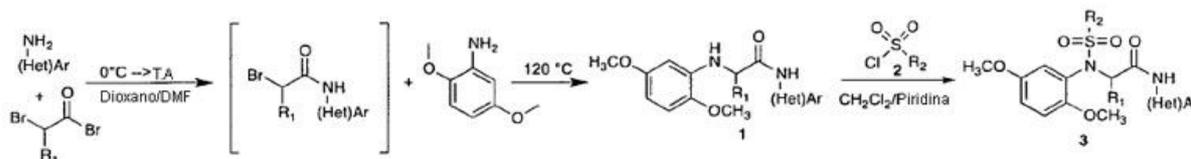
Se indican también las propiedades favorables del compuesto SW125591, también denominado SW125991, que convierte el nitrógeno en el enlace peptídico de SW054384 de un grupo -NH-(arilo) a una amina cíclica. Este compuesto conserva la actividad en la inducción del ensayo de indicador de 15-PGDH luciferasa. Muestra menos inhibición de 15-PGDH a una alta concentración de compuesto que lo que hace el activador enzimático principal SW054384. SW125991 muestra actividad similar a SW054384 en la reducción de los niveles de PGE2 en células A549 estimuladas con IL1-beta. SW125991 no muestra toxicidad tal como somete a ensayo mediante el efecto en ensayos CellTiter-Glo realizados a las 24 horas. Además, SW125991 muestra una marcada mejora en la estabilidad metabólica.

Se indican también las propiedades favorables de los compuestos SW207997, SW207998 y SW207998. Estos tres compuestos, como SW125991, han convertido todos el nitrógeno del enlace peptídico en SW054384 de un grupo -NH-(arilo) a una amina cíclica. Además, SW207997, SW207998 y SW207998, han añadido todos un grupo metoxilo al anillo de fenilo en SW054384. SW207997, SW207998 y SW207998 muestran todos actividad igual a, o en algunos ensayos mayor que, SW054384 en la inducción del constructo indicador de fusión génica 15-PGDH luciferasa, y todos muestran mucho menos inhibición de la actividad enzimática de 15-PGDH a 2,5  $\mu\text{M}$  y 7,5  $\mu\text{M}$  que SW054384.

## Ejemplo 12

El siguiente ejemplo describe la síntesis de SW054384 y análogos del mismo así como proporciona confirmación mediante RMN y espectroscopia de masas de las estructuras.

### Procedimiento general 1:



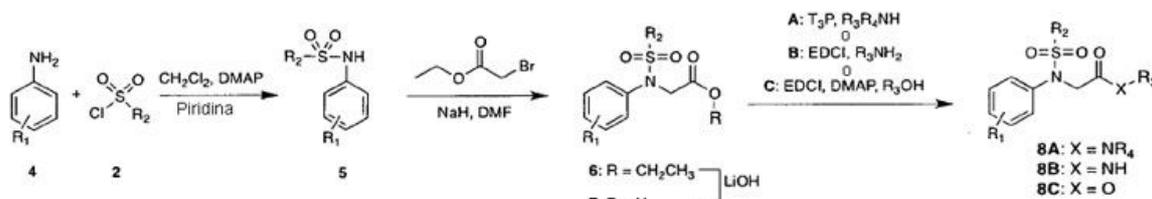
### Procedimiento

Se disolvió (hetero)arilamina en una mezcla 1:1 de DMF/dioxano (1,215 M basándose en la amina) y se enfrió hasta 0°C. Se añadió gota a gota bromuro de bromoacetilo (1,26 equiv.) y se permitió que se calentase hasta temperatura ambiente durante la noche. Se eliminaron el dioxano y el bromuro de ácido en exceso a presión reducida, y se añadió 2,5-dimetoxianilina (3,5 equiv.). Se calentó el material en bruto hasta 120°C durante tres horas. La reacción se enfrió hasta temperatura ambiente, se diluyó con EtOAc, y se filtró a través de Celite. El filtrado se lavó con agua (3x), bicarbonato de sodio y salmuera. La fase orgánica se secó con  $\text{MgSO}_4$  y se concentró para dar la amida en

bruto (1). El producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida para dar la N-arilglicinamida 1 pura.

- 5 Se disolvió la N-arilglicinamida (1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 M). Se añadió piridina (4,9 equiv.) y cloruro de sulfonilo (2) (1,3 equiv.) y la reacción se agitó durante la noche. La disolución se diluyó con EtOAc, se lavó con agua (3x) y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró a presión reducida para dar la sulfonamida 3 en bruto. El producto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida.

10 Procedimiento general 2:



Procedimiento

- 15 Se disolvió la anilina 4 (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 M basándose en 4). Se añadió DMAP (0,3 equiv.) y piridina (4,9 equiv.) seguido por cloruro de sulfonilo (1 equiv.). La reacción se agitó durante 36 horas, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua, HCl (1 M), bicarbonato de sodio, y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y se eliminó el disolvente a presión reducida para obtener 5.
- 20 Sin purificación, se disolvió la sulfonamida 5 secundaria (1 equiv.) en una disolución de DMF (0,1 M) y bromoacetato de etilo (4 equiv.). Se añadió esta disolución gota a gota a hidruro de sodio a 0°C. Tras el cese del burbujeo, la reacción se calentó hasta temperatura ambiente y se dejó agitando durante la noche. Después de 12-18 horas, se añadió agua y se extrajo la fase acuosa 3 veces con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los extractos orgánicos combinados se lavaron de nuevo con agua seguido por salmuera, se secaron con MgSO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida para proporcionar un aceite. La adición de hexanos dio como resultado la precipitación del producto en bruto, que se aisló mediante filtración y se usó sin purificación.
- 25
- 30 Se disolvió el éster 6 en una razón 3:3:1 de MeOH:THF:agua. Se añadió hidróxido de litio y la reacción se agitó hasta que se completó (1-3 h). La reacción se concentró a presión reducida y entonces se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se extrajo el ácido (7) en bicarbonato de sodio saturado. La fase acuosa se neutralizó con HCl 1 M (pH ~5) y se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> para obtener 7, que se usó sin purificación.

Procedimiento general 2A:

- 35 Se disolvió el ácido 7 (1 equiv.) en EtOAc (2 vol.). Se añadieron piridina (1 vol.) y amina secundaria (1,1 equiv.) seguido por T3P (2 equiv., el 50% en EtOAc) y la reacción se agitó durante la noche. La reacción se extinguió con HCl (0,5 M, 3 vol.) y la mezcla se diluyó con EtOAc, se lavó con agua, bicarbonato y salmuera, se secó con sulfato de sodio y se concentró. El compuesto 8A se purificó mediante cromatografía ultrarrápida.

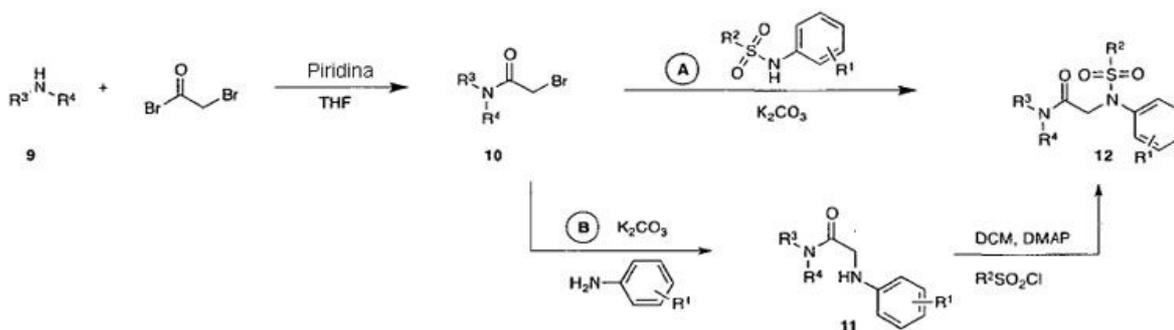
40 Procedimiento general 2B:

- Se añadieron la amina primaria (1 equiv.), DMAP (0,3 equiv.) y EDCI (1,3 equiv.) a una disolución de ácido 7 (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 M). Se purgó el vial de reacción con nitrógeno agitado durante 12-24 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con salmuera, agua, HCl (1 M), bicarbonato de sodio y nuevamente con salmuera. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró para obtener 8B. Si era necesario el compuesto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida.
- 45

Procedimiento general 2C:

- 50 Se añadieron alcohol (4 equiv.), DMAP (0,3 equiv.) y EDCI (1,1 equiv.) a una disolución de ácido 7 (1 equiv.) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,5 M) a 0°C. Después de cinco minutos se permitió que la reacción se calentase hasta temperatura ambiente y se agitó hasta que se completó. La mezcla de reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavo con salmuera, HCl (1 M) y agua. La fase orgánica se secó con MgSO<sub>4</sub> y se concentró para obtener el éster 8C puro.

55 Procedimiento general 3



Procedimiento: Se añadió piridina (1,1 equiv) a una disolución de la amina 9 secundaria en THF (0,5 M) y la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C. Se añadió entonces gota a gota bromuro de bromoacetilo (1 equiv.) y la reacción se calentó hasta temperatura ambiente. Se agitó la reacción durante dos horas a esta temperatura y entonces se diluyó con EtOAc y se lavó con agua. La fase orgánica se seco con sulfato de sodio y se concentró para obtener la bromoacetamida 10, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice.

Procedimiento general 3A: Se añadió una disolución de la amida 10 en DMF (0,075 M) a una disolución de sulfonamida 12 (1,5 equiv.; síntesis idéntica a la sulfonamida 5 en el procedimiento 2), carbonato de potasio (2 equiv.) y DMF (0,075 M). Se agitó la reacción durante la noche y entonces se diluyó con EtOAc y se lavó con agua y salmuera. Se eliminó EtOAc a presión reducida para obtener 12 en bruto, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice.

Procedimiento general 3B: Se añadió una disolución de amida 10 en DMF (0,075 M) a una disolución de anilina, carbonato de potasio (2 equiv.) y DMF (0,075 M). Se agitó la reacción durante la noche y se diluyó entonces con EtOAc y se lavó con agua y salmuera para obtener la amida 11 en bruto, que se usó sin purificación.

Se añadieron DMAP (0,3 equiv.), piridina (4,9 equiv.) y luego cloruro de sulfonilo (1 equiv.) a una disolución de la amida 11 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 M). Se agitó la reacción durante 12-24 horas, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con agua, HCl (1 M), bicarbonato de sodio y salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> y el compuesto se concentró a presión reducida para obtener la sulfonamida 12, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida.

### Ejemplo 13

#### Propiedades de análogos seleccionados del compuesto principal SW054384, un activador de 15-PGDH

Este ejemplo proporciona datos sobre las propiedades de análogos seleccionados de SW054384.

La figura 81 muestra las estructuras de análogos seleccionados de SW054384.

Las figuras 82(A-C) muestran gráficos que muestran el nivel de actividad en la inducción del indicador de fusión de 15-PGDH-luciferasa en tres antecedentes de líneas celulares de prueba diferentes, V9m, LS174T y V503. Se sometió a prueba cada compuesto a dos concentraciones, 2,5 uM y 7,5 uM. El eje Y es la actividad luciferasa. Los compuestos activos en la inducción del indicador de 15-PGDH luciferasa incluyen SW20370, SW203704, SW125991, SW203736, SW203737.

La figura 83 muestra la actividad de compuestos sometidos a prueba en la inhibición de la actividad enzimática de 15-PGDH recombinante cuando se someten a prueba a altas concentraciones de 2,5 uM y 7,5 uM. SW125991 y SW203736 muestran menos actividad inhibitoria a altas concentraciones que el activador de 15-PGDH principal, SW054384. SW203737 a estas concentraciones muestra actividad inhibitoria contra 15-PGDH recombinante que es similar a SW054384.

Las figuras 84(A-C) muestran a la izquierda (84A) la actividad en la reducción de los niveles de PGE2 en medios de células A549 que se estimulan para producir PGE2 mediante tratamiento con IL1-beta. Todos los compuestos sometidos a prueba, incluyendo SW054384, SW203703, SW125991, SW203736 y SW203737, muestran actividad en la reducción de PGE2, consecuente con su acción *in vivo* como inductores de la actividad de 15-PGDH. La figura 84B muestra a la derecha que ninguno de los compuestos sometidos a prueba demuestra toxicidad contra células A549 tal como se somete a ensayo mediante los niveles de ensayo CellTitre-Glo a las 24 horas de tratamiento. La figura 84C muestra en la parte inferior fotografías de células A549 sometidas a prueba en el ensayo CellTitre-Glo ordenadas de izquierda a derecha en el mismo orden que en la representación gráfica de los datos de CellTitre-Glo en la parte superior derecha.

La figura 85 muestra la medición de la estabilidad metabólica de SW054384 mediante incubación con microsomas

S9 de hígado murino. La semivida medida es de 21,72 minutos. Se incubó SW054384 (2 mM en DMSO) con una fracción de murino S9 (lote KWB) y cofactores de fase I (sistema de regeneración de NADPH) durante 0-240 minutos. Se extinguieron las reacciones con 1 ml (1:1) de MeOH/(+)IS/ácido fórmico al 0,2%, se agitó con vórtex durante 15 segundos, se incubó a TA durante 10 minutos y se centrifugó durante 5 minutos a 2400 rpm. Se transfirió entonces el sobrenadante (1 ml) a un tubo Eppendorf y se centrifugó en una centrífuga refrigerada de sobremesa durante 5 minutos a 13,2 K rpm. Se transfirió el sobrenadante (800 µl) a un vial de HPLC (con/sin inserto) y se analizó mediante HPLC/EM. A: dH<sub>2</sub>O + el 0,1% de FA B: MeOH + el 0,1% de FA.

La figura 86 muestra la medición de la estabilidad metabólica de SW125991 mediante incubación con microsomas S9 de hígado murino. La semivida medida es de 204 minutos. Se incubó SW125991 (2 mM en DMSO) con una fracción de murino S9 (lote KWB) y cofactores de fase I (sistema de regeneración de NADPH) durante 0-240 minutos. Se extinguieron las reacciones con 1 ml (1:1) de metanol que contenía ácido fórmico al 0,2% e IS 100 ng/ml (conc. final de IS = 50 ng/ml). Se agitaron las muestras con vórtex durante 15 segundos, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugaron durante 5 minutos a 2400 rpm. Se transfirió entonces el sobrenadante (1 ml) a un tubo Eppendorf y se centrifugó en una centrífuga refrigerada de sobremesa durante 5 minutos a 13,2 K rpm. Se transfirió el sobrenadante (800 µl) a un vial de HPLC (con/sin inserto). Se analizó mediante un espectrómetro de masas Qtrap 3200.

La figura 87 muestra las estructuras de análogos adicionales de SW054384.

Las figuras 88-90 muestran gráficos que muestran el nivel de actividad en la inducción del indicador de fusión de 15-PGDH-luciferasa en tres antecedentes de líneas celulares de prueba diferentes, V9m, LS174T y V503. Se sometió a prueba cada compuesto a dos concentraciones, 2,5 µM y 7,5 µM. El eje Y es la actividad luciferasa. Los compuestos activos en la inducción del indicador de fusión de 15-PGDH-luciferasa incluyen (pero no se limitan a): SW207997, SW207998 y SW207999.

La figura 91 muestra la actividad de los compuestos sometidos a prueba en la inhibición de la actividad enzimática de 15-PGDH cuando se someten a prueba a altas concentraciones de 2,5 µM y 7,5 µM. SW207997, SW207998 y SW207999 muestran menos actividad inhibidora a una alta concentración que el activador de 15-PGDH principal, SW054384.

La figura 92 repite las estructuras de los activadores de 15-PGDH SW054383, SW125991, SW207997, SW207998, SW207999.

La figura 93 muestra la representación gráfica de las actividades de SW054383, SW125991, SW207997, SW207998, SW207999 en la reducción de los niveles de PGE2 en medio de células A549 que se han tratado con 2,5 µM de cada compuesto durante 24 horas, junto con adición de IL1-beta 2,5 ng/ml durante las últimas 16 horas de la incubación, y luego con la recogida y el ensayo de la concentración de PGE2 en el medio en el punto de tiempo de 24 horas. La actividad de los compuestos en la reducción de 15-PGDH en las células A549 estimuladas con IL1-beta es consecuente con que estos compuestos activan 15-PGDH intracelular.

La figura 94 muestra curvas de titulación de compuestos activadores de 15-PGDH en un ensayo que mide los efectos sobre los niveles de PGE2 en el medio de células A549 que se han estimulado con IL1-beta en el mismo diseño experimental descrito para la figura 93. A una concentración de 100 nM de fármaco, la mayor reducción en los niveles de PGE2 en el medio se logran mediante el tratamiento de las células con SW207997 o con SW207998, seguido por SW125991. SW054384 y SW207999 consiguen niveles comparables de reducción de PGE2 en el medio a dosis de entre 0,5 µM-1,0 µM.

La figura 95 muestra la evaluación de la toxicidad de SW 125991 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503). No se observa reducción en la actividad de formación de colonias a dosis hasta 7,5 µM de compuesto.

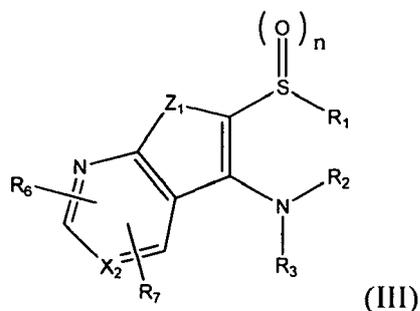
La figura 96 muestra la evaluación de la toxicidad de SW207997 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503). No se observa reducción en la actividad de formación de colonias a dosis hasta 7,5 µM de compuesto.

Las figura 97 muestra la evaluación de la toxicidad de SW207998 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503). No se observa reducción en la actividad de formación de colonias a dosis hasta 7,5 µM de compuesto.

La figura 98 muestra la evaluación de la toxicidad de SW207999 sometiendo a prueba el efecto de dosis crecientes sobre la formación de colonias de células A549, células Vaco9M (V9m), células LS174T y células Vaco503 (V503). No se observa reducción en la actividad de formación de colonias a dosis hasta 7,5 µM de compuesto.

## REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que comprende un inhibidor de 15-PGDH para su uso en la potenciación del trasplante de células, trasplante de órganos, injerto de injertos de tejidos, regeneración de órganos, regeneración de tejidos, reparación de tejidos, cicatrización de heridas, crecimiento y/o proliferación celular y/o paliación del rechazo de injertos de células y/o tejidos, en la que el inhibidor de 15-PGDH tiene la siguiente fórmula (III):



10 en la que:

n es 0-2;

R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1-8</sub>, que es lineal, ramificado o cíclico y que no está sustituido o está sustituido;

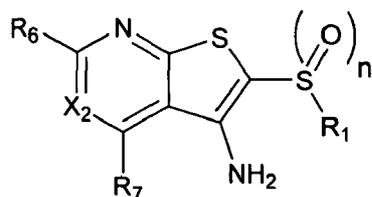
15 R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en H, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n<sub>1</sub> = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R' y COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior);

20 Z<sub>1</sub> es NR', O o S (en el que R' es H o un grupo alquilo inferior);

X es N o CH;

25 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son opcionales y, si están presentes, son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n<sub>1</sub> = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior); arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo sustituido o no sustituido, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

30 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de 15-PGDH tiene la fórmula:



35 en la que

n es 0-2;

X<sub>2</sub> es N o CH;

40 R<sub>1</sub> es un alquilo C<sub>1-8</sub>, que es lineal, ramificado o cíclico y que no está sustituido o está sustituido;

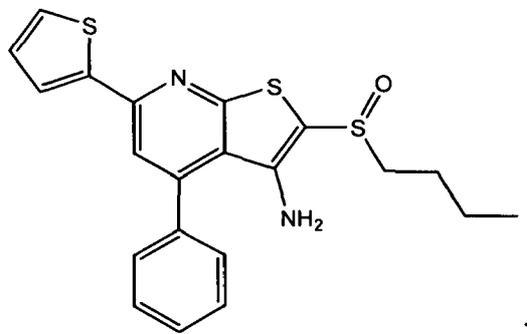
45 R<sub>6</sub> y R<sub>7</sub> son opcionales y, si están presentes, son iguales o diferentes y se seleccionan cada uno del grupo que consiste en un H, F, Cl, Br, I, un grupo alquilo inferior, (CH<sub>2</sub>)<sub>n1</sub>OR' (en el que n<sub>1</sub> = 1, 2 ó 3), CF<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X, O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>X (en los que X = F, Cl, Br o I), CN, (C=O)-R', N(R')<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, (C=O)N(R')<sub>2</sub>, O(CO)R', OR', SR', COOR' (en los que R' es H o un grupo alquilo inferior); arilo, heteroarilo, cicloalquilo o heterociclilo sustituido o no sustituido, y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

3. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que n es 1 y X<sub>2</sub> es

CH.

4. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que el inhibidor de 15-PGDH tiene la fórmula:

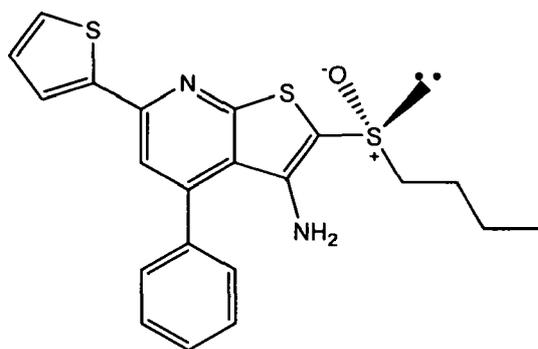
5



;

y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 5. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que el inhibidor de 15-PGDH consiste esencialmente en un compuesto que tiene la fórmula:



;

15 y sales farmacéuticamente aceptables del mismo.

6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en la que el inhibidor de 15-PGDH incluye más del 99% en peso del isómero R(+) y menos del 1% en peso del isómero S(-).

20 7. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento de las células madre tisulares en tejido de un sujeto.

8. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento del estado físico de un injerto de médula ósea de donante o un injerto de células madre hematopoyéticas de donante.

25 9. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento de al menos uno de células madre en el sujeto y/o el estado físico de la médula como injerto de donante y/o la regeneración de la médula.

30 10. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento del estado físico de una preparación de células madre como injerto de donante y/o la disminución del número de unidades de células madre requeridas para trasplante.

35 11. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la paliación del rechazo de injertos de células, células madre, médula ósea, órganos y/o tejidos y/o potenciar el injerto de injertos de células, células madre, médula ósea y/o tejidos.

40 12. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento de la densidad ósea, tratar osteoporosis, fomentar la consolidación de fracturas o fomentar la consolidación de hueso.

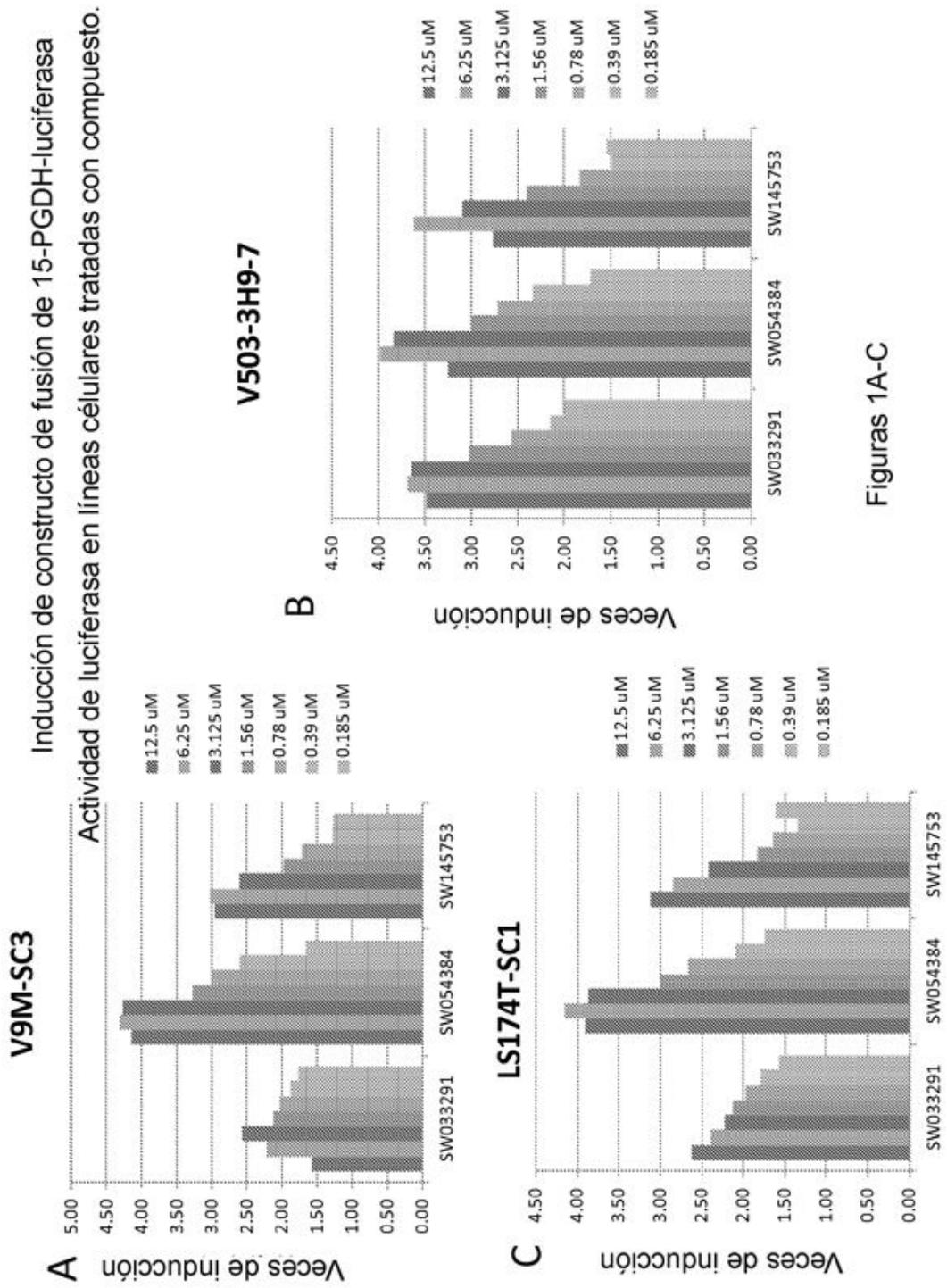
13. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en la

curación o prevención de lesión intestinal.

5 14. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso para conferir resistencia y/o curación frente a los efectos tóxicos o letales de la exposición a radiación o quimioterapia, o lesión debida a enfermedad inflamatoria del intestino.

10 15. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el fomento de la regeneración del hígado en entornos que incluyen después de cirugía hepática o lesión hepática o trasplante de hígado.

16. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el aumento de los recuentos de neutrófilos y/o los recuentos de plaquetas y/o los recuentos de glóbulos rojos y/o hematocrito y/o nivel de hemoglobina y/o células madre de médula ósea.



Figuras 1A-C

Los tres compuestos aumentan el nivel de proteína 15-PGDH (7.5  $\mu$ M)

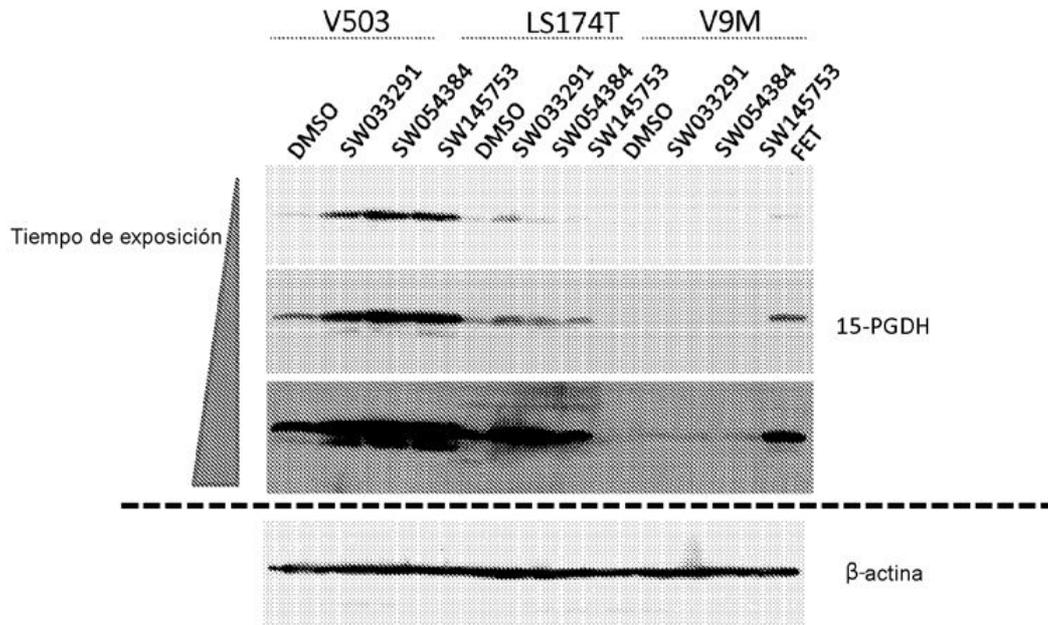


Fig. 2

Immunotransferencia de tipo Western: Líneas celulares tratadas con SW124531 (5 uM, 48 horas)

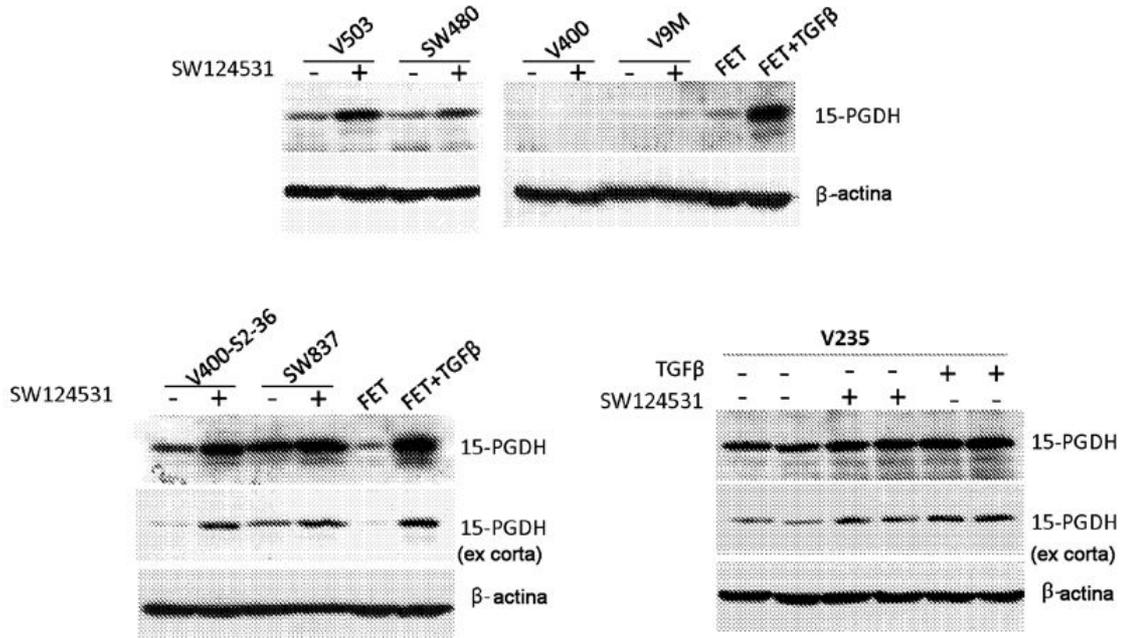
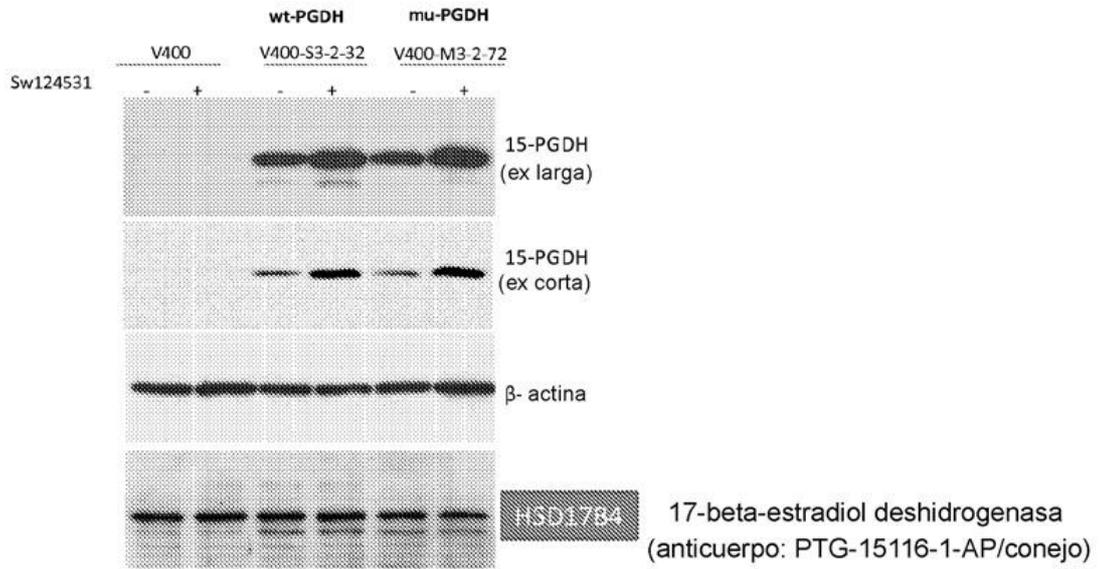


Fig. 3

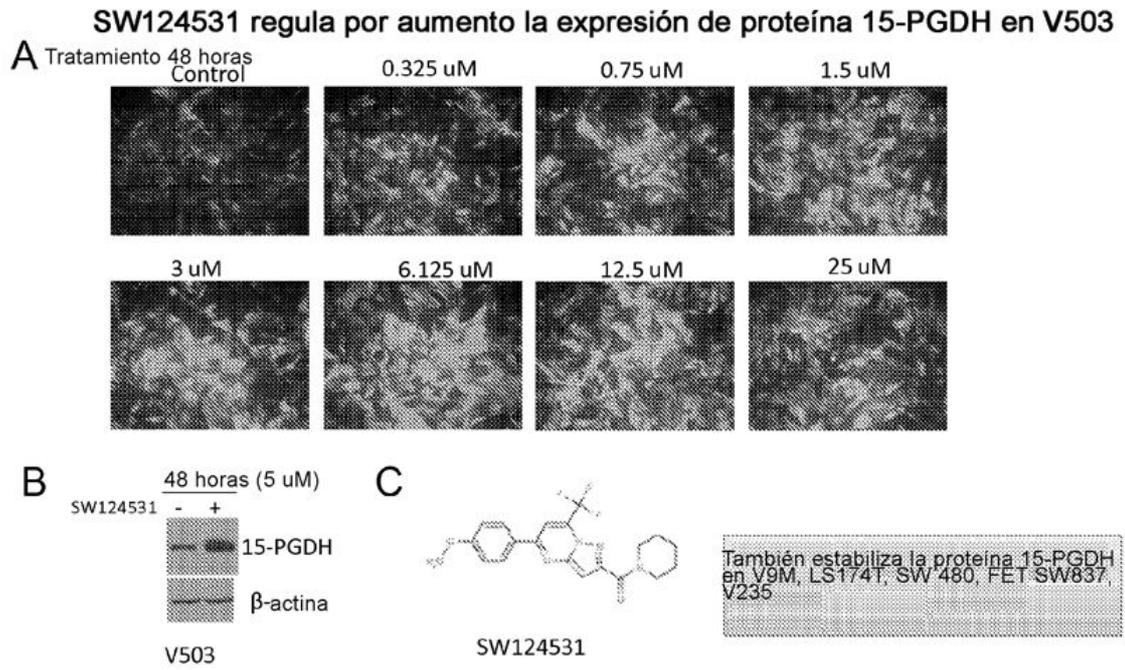
**SW124531:**

- 1) WT/MU 15-PGDH estabilizada
- 2) No cambió el nivel de proteína HSD17B4



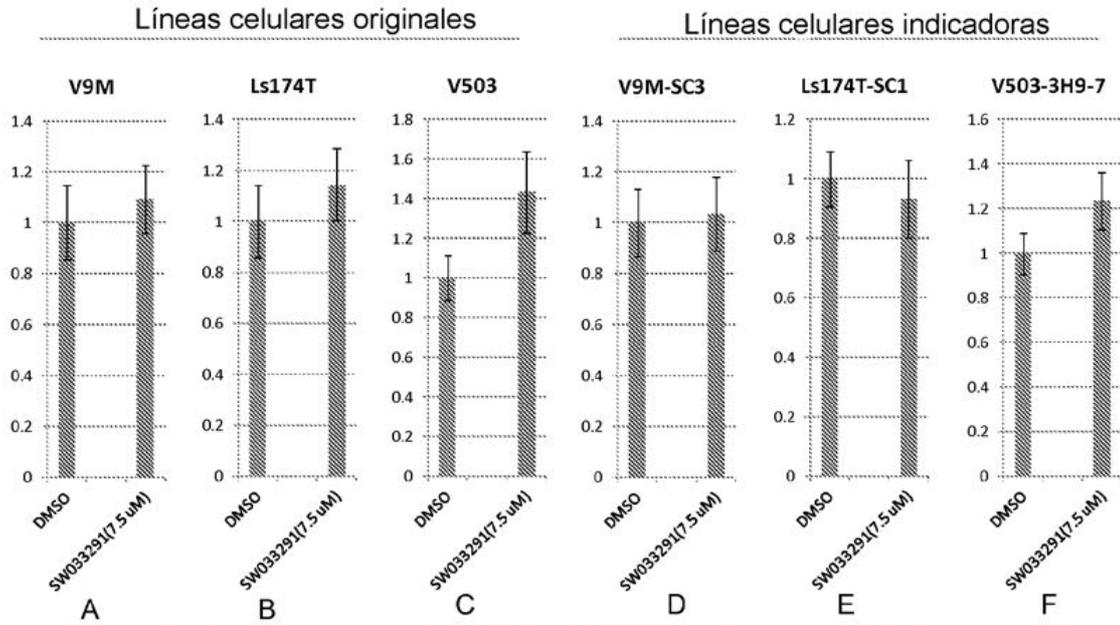
PGDH mutante: (Y151L y K155E): carece de actividad enzimática

Fig. 4



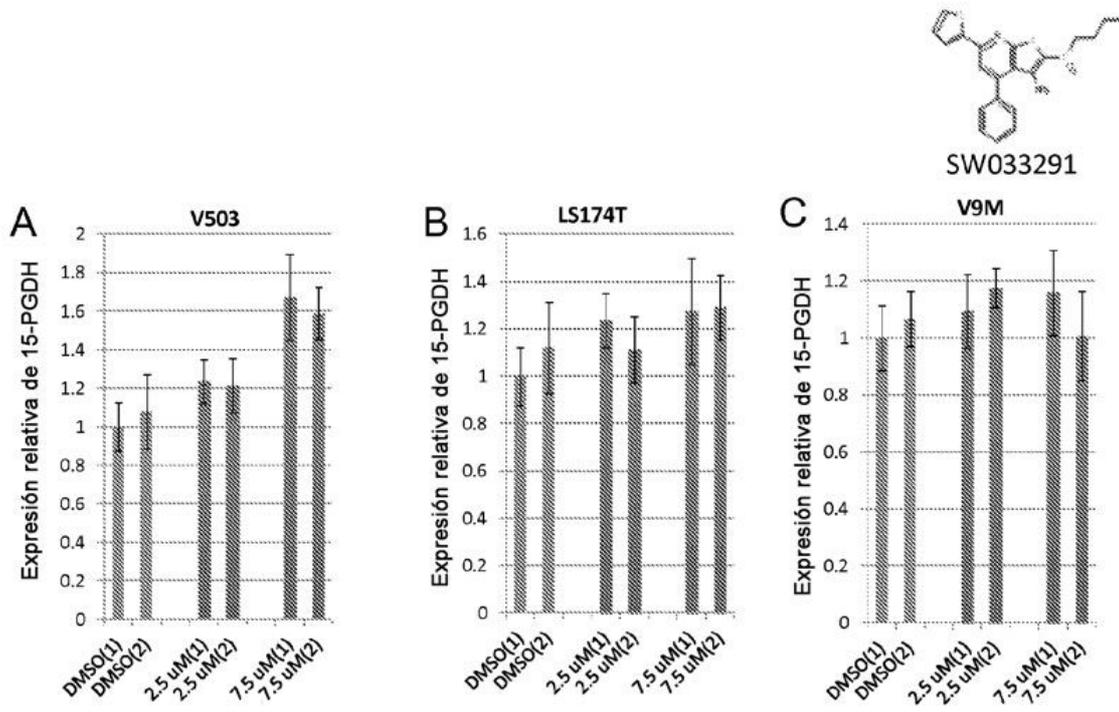
Figuras 5A-C

**El tratamiento con SW033291 (7.5  $\mu$ M) no cambia el nivel de ARNm de 15-PGDH**

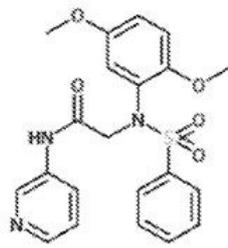


**Tratamiento con compuestos a 7.5  $\mu$ M, PCR en tiempo real de la expresión de 15-PGDH.**

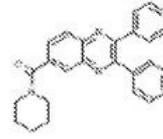
Figuras 6A-F



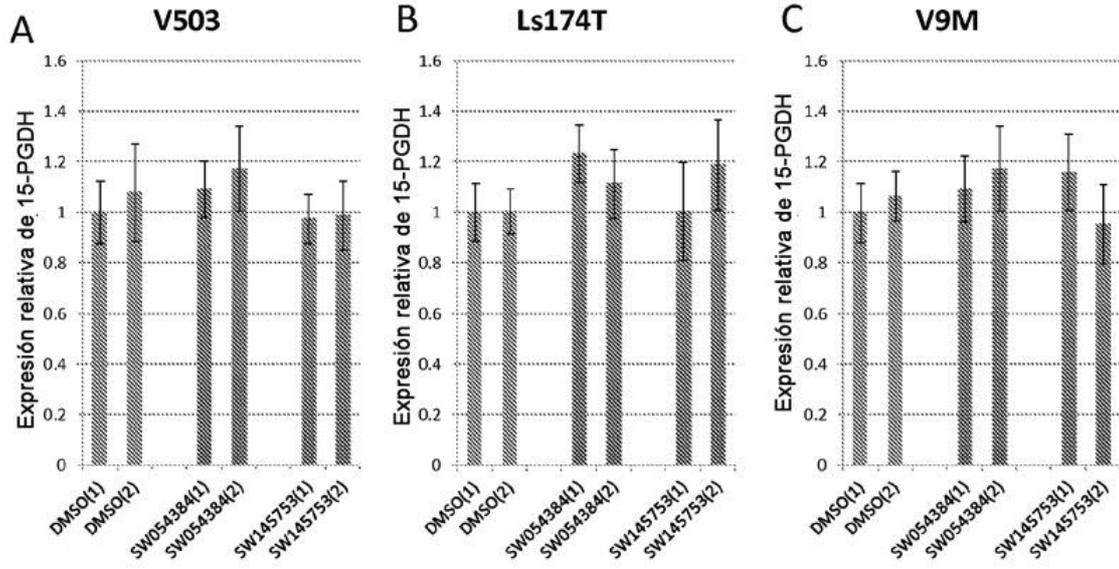
Figuras 7A-C



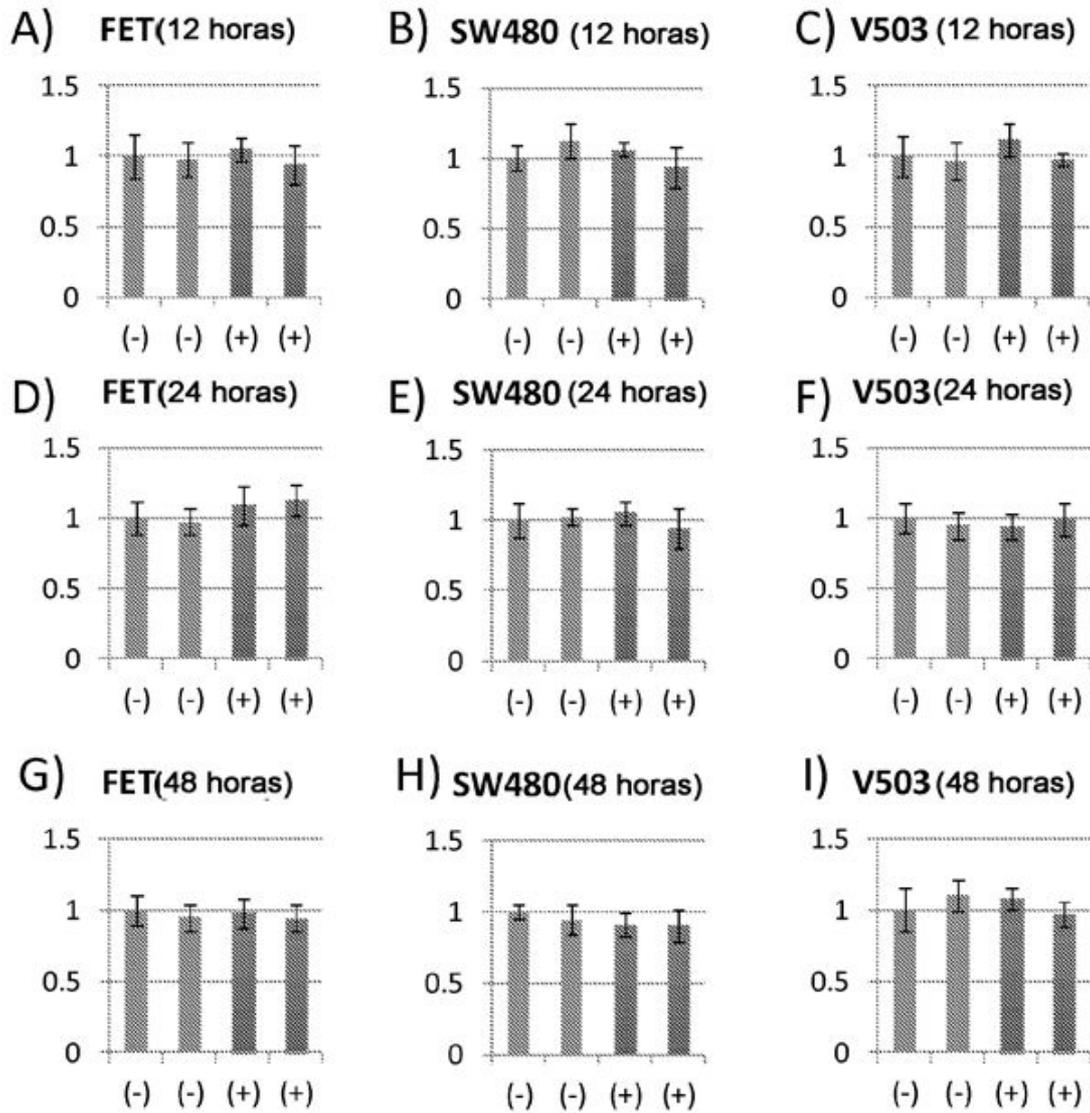
SW054384



SW145753

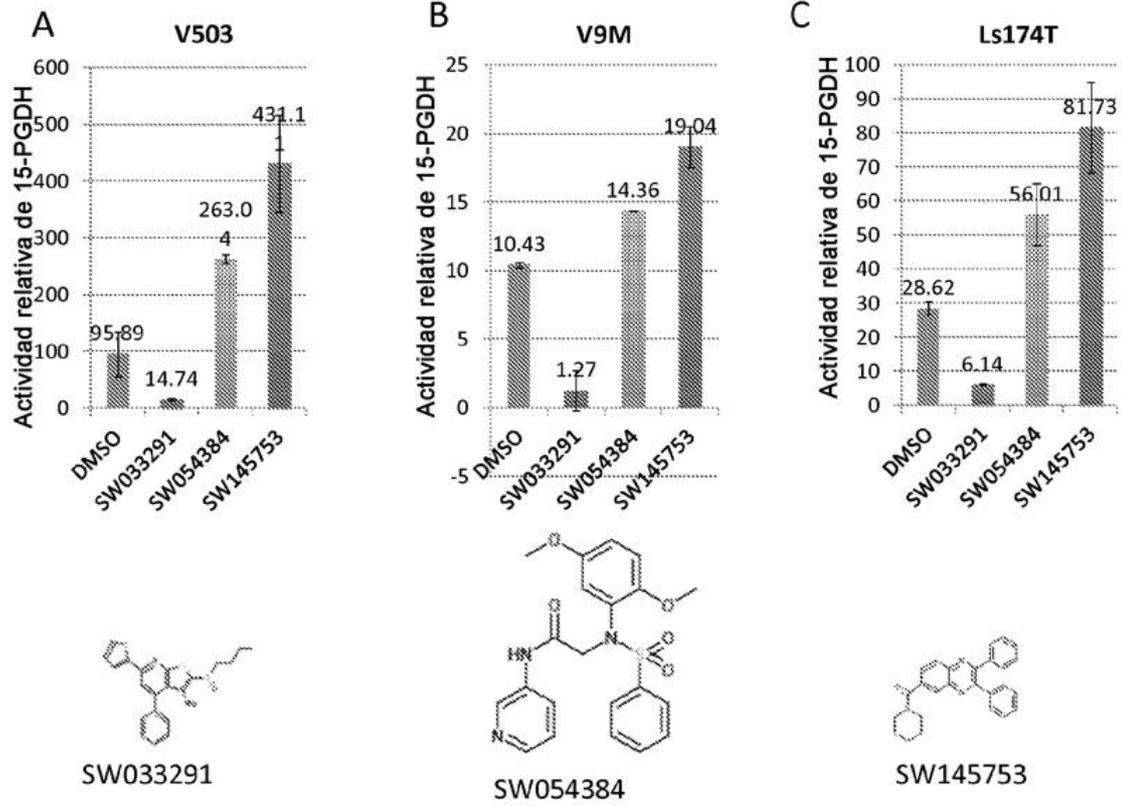


Figuras 8A-C



Eje Y: Nivel relativo de ARNm de 15-PGDH  
 Eje X: No tratado (-) o tratado (+) con 5 uM de SW124531

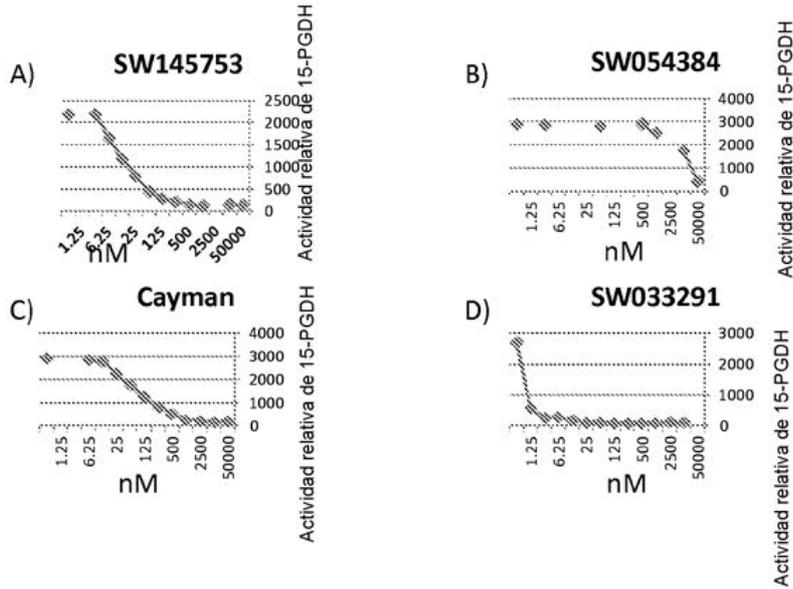
Figuras 9A-I



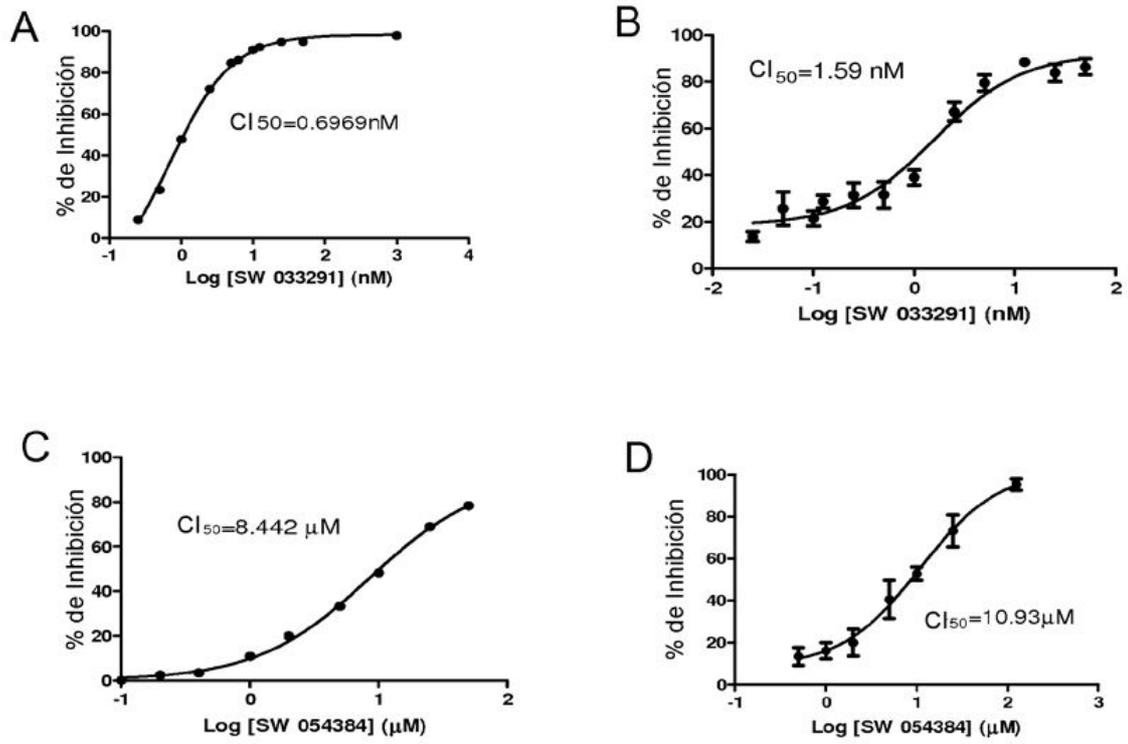
Figuras 10A-C

Ensayo de la actividad in vitro del 15-PGDH recombinante cuando se trata con compuestos (28/04/2011)

[Fármaco]	50000	5000	2500	1250	500	250	125	50	25	12.5	6.25	5	1.25	0	IC50
sw0543															
84	438	1767		2504	2904			2809					2857	2869	>5000
sw1457															
53	141	151		125	145	217	291	441	798	1186	1652	2198		2198	<12.5 25 hasta
Cay1	213	163	223	278	538	815	1272	1781	2286	2782	2870			2959	62.5
SW033291		117	139	113	95	96	81	135	113	204	303	260	598	2729	<1nm



Figuras 11A-D



Figuras 12A-D

Actividad de PGDH aumentada en sedimentos de células tratadas con SW124531

Tabla A

Actividad celular	Tratamiento					
	DMSO(1)	DMSO(2)	SW124531(1)	SW124531(2)	TGFb(1)	TGFb(2)
SW480	87.5	139.0476	204.3796	191.0256		
V235	634.0336	691.2371	1049.474	1068.852	1054.327	854.2017
V9M	16.28788	9.803922	19.55128	21.69118		
V503	101.2987	105.5556	296.5278	284.8684		
V400	7.420925	5.080831	6.730769	5.865103		
V400-S2-36	652.2059	653.5354	1428.235	2004.487		
SW837	905.102	885.1351	1122.34	1180.899		

SW124531 es un inhibidor in vitro de PGDH

Fig. B

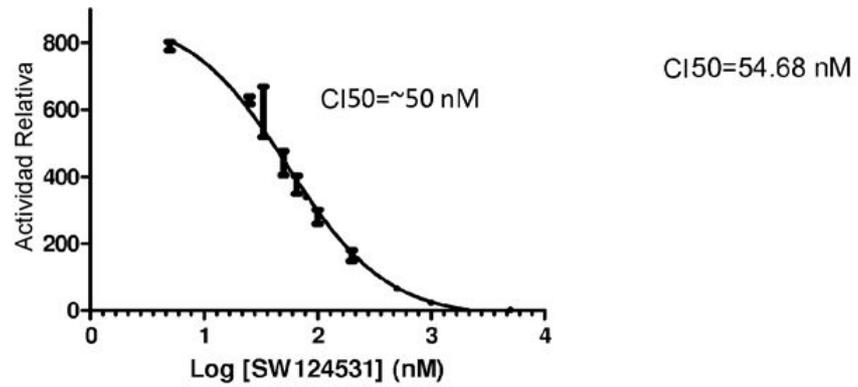
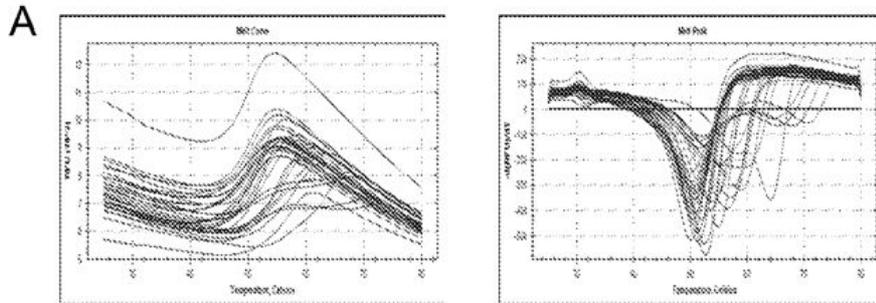


Fig. 13

DSF para compuestos a 10 uM para WT-PGDH

----- Prueba de la unión del compuesto con 15-PGDH

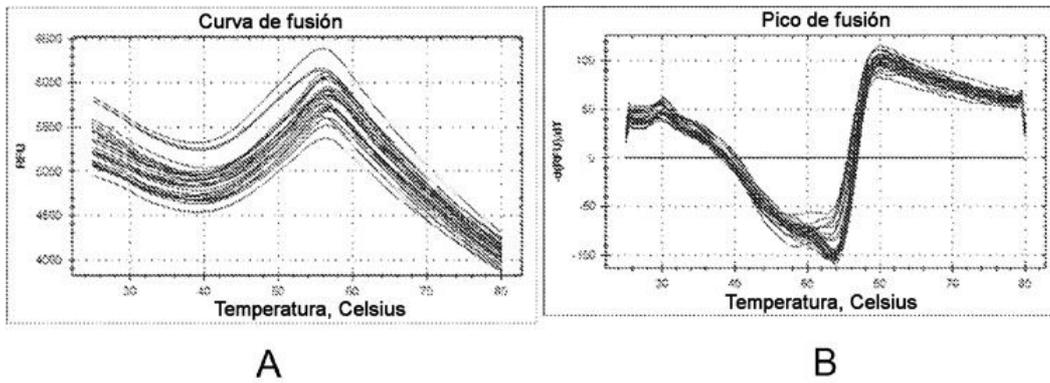


**B**

CF	Tm	CP						
		DMSO	SW054384	SW145753	SW033291	SW124531	Inhibidor de 15-PGDH (Cayman)	Lapatinib
Agua		50	50.5	50	50	50	50.5	50.5
NAD(+), 10 uM		50	50	56.5	51.5, 64.5	53	51.5	50.5
NADH, 10 uM		50.5	50.5	57	51.5, 65.5	53.5	51.5	50.5
NAD(+), 100 uM		52	52.5	58, 64	53, 70.5	59.5	57.5	52.5
NADH, 100 uM		51	51	59	52, 68	54.5	55	50.5

Figuras 14A-B

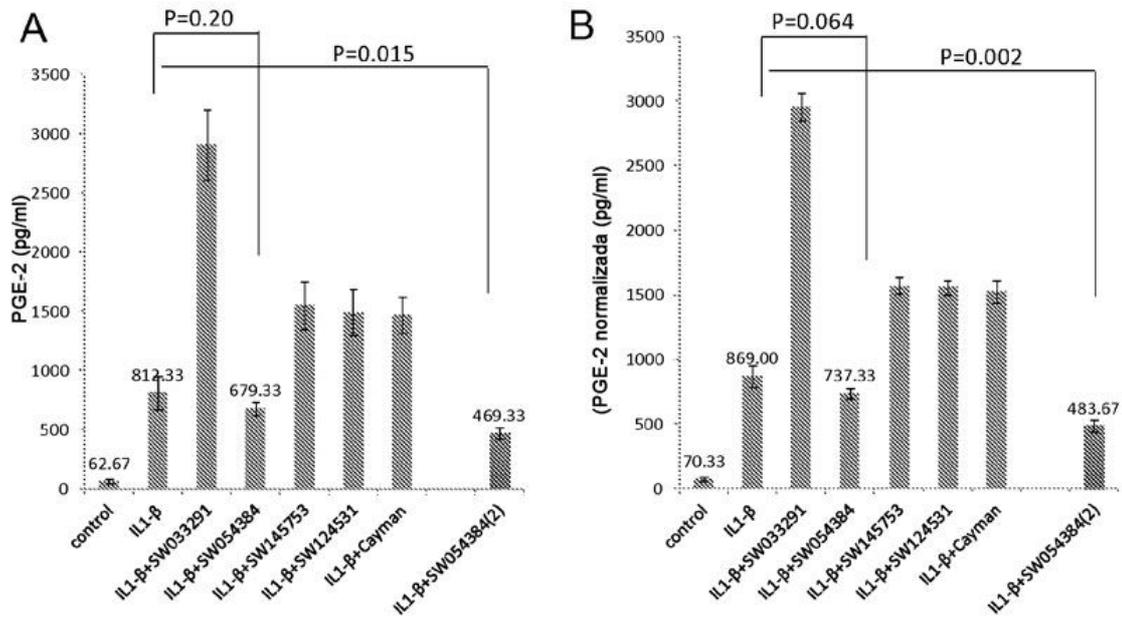
## DSF para compuestos a 10 $\mu$ M para Mu-PGDH



Desplazamiento  $T_m$  no obvio, puede ser debido a la ausencia de unión o unión débil

PGDH mutante: (Y151L y K155E)

Fig. 15



IL1 $\beta$ , 18 horas -> compuesto 2.5 uM 5 horas,  
 IL1 $\beta$ +SW054384(2), pretratada con SW054384 a 2.5 uM 24 horas.

Figuras 16A-B

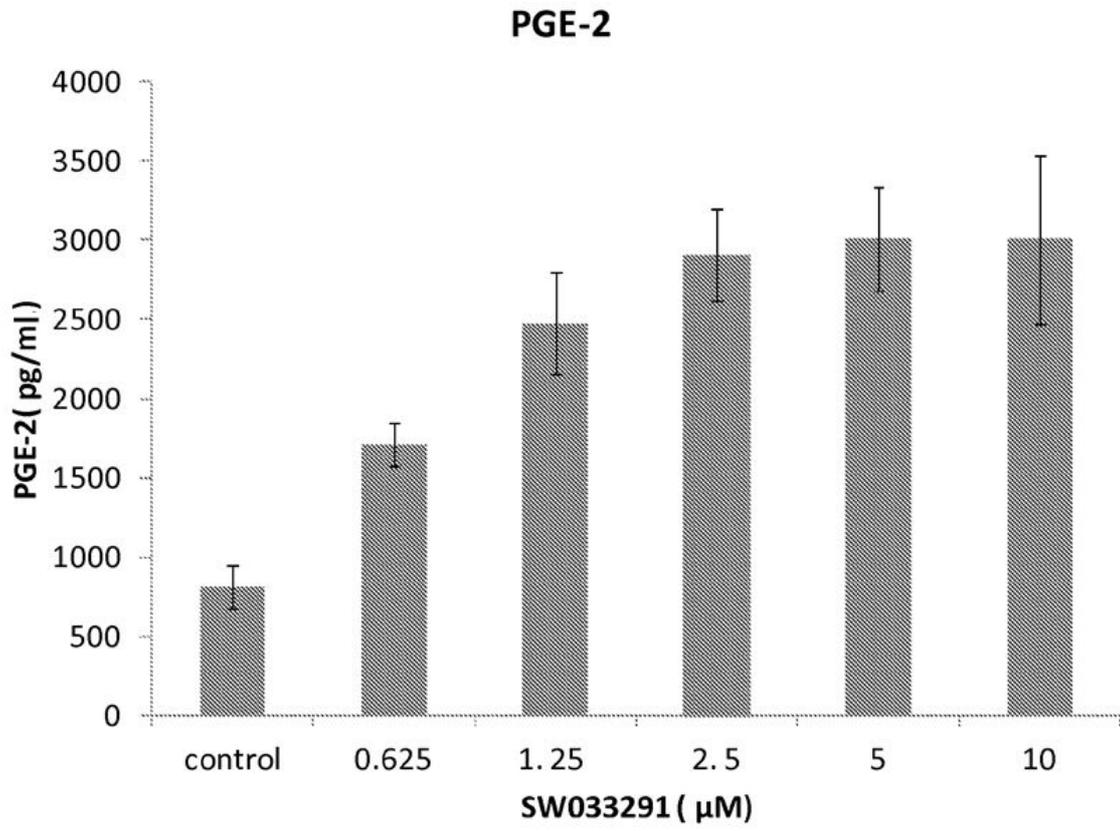
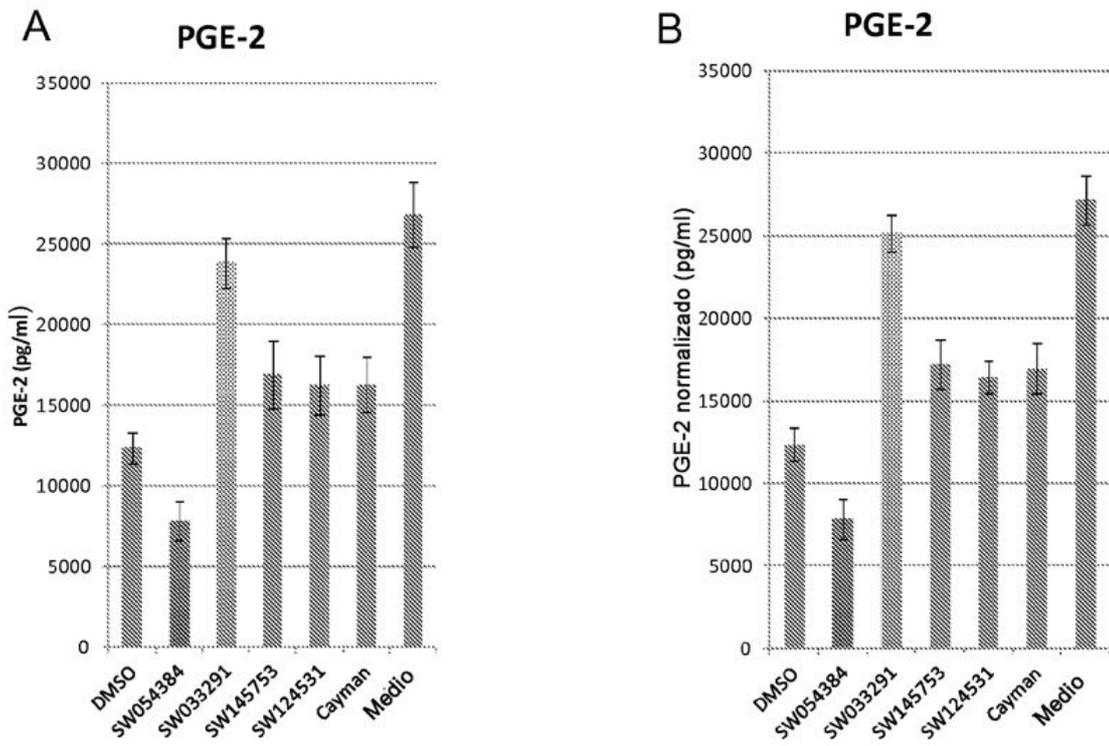


Fig. 17



Pretratamiento con compuesto durante 24 horas, añadir PGE-2 durante 24 horas

Figuras 18A-B

Cicatrización de herida por arañazo de monocapa confluyente de HaCaT tratada con inhibidor de PGDH SW033291 o con TGF-beta

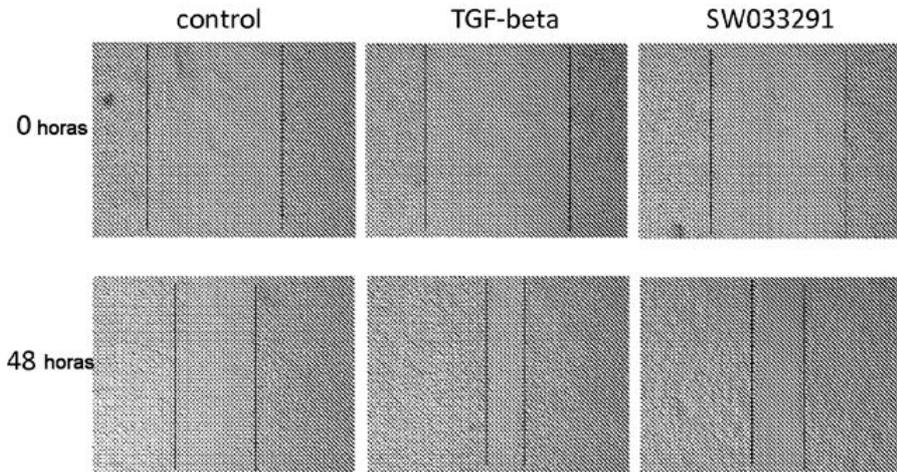
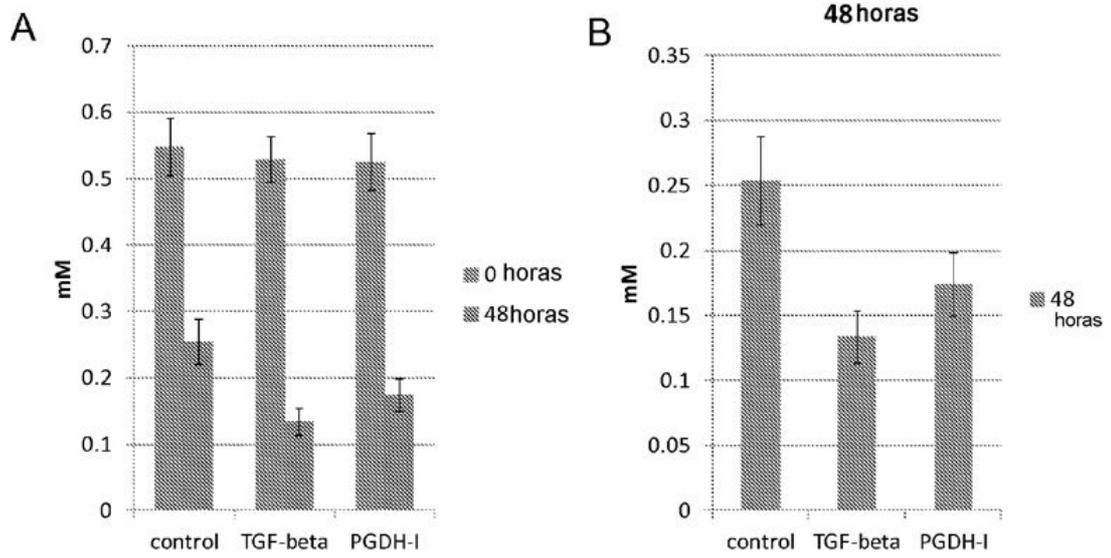
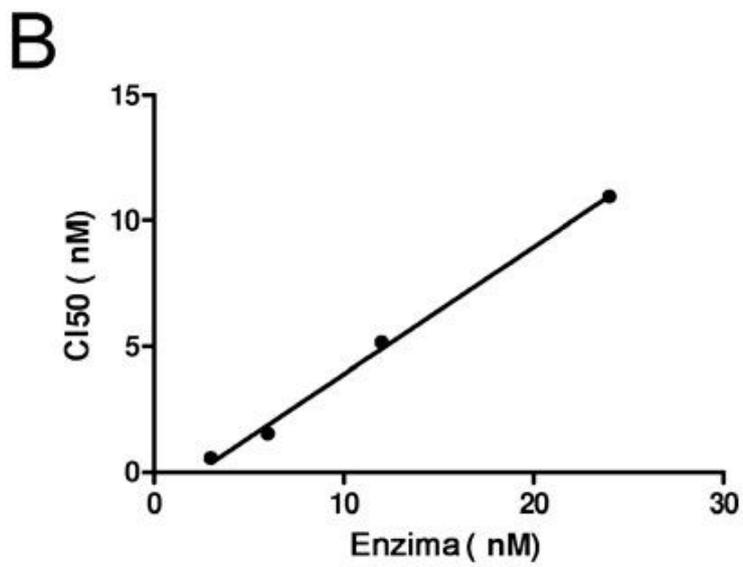
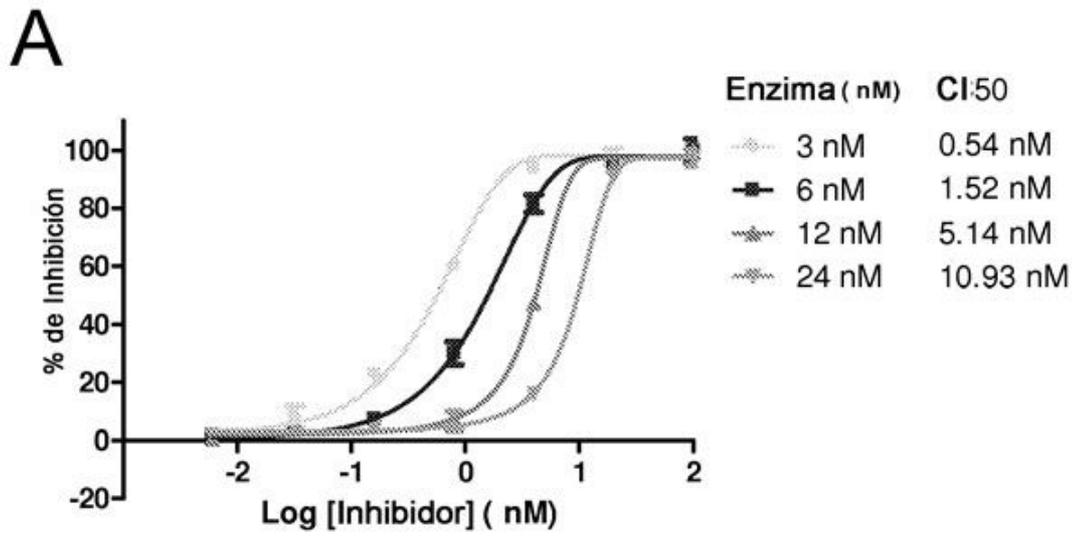


Fig. 19

**Anchura del arañazo de monocapa de HaCaT a 0 y 48 horas cuando se trata con TGF-beta o con inhibidor de PGDH SW033291 (denominado PGDH-I)**

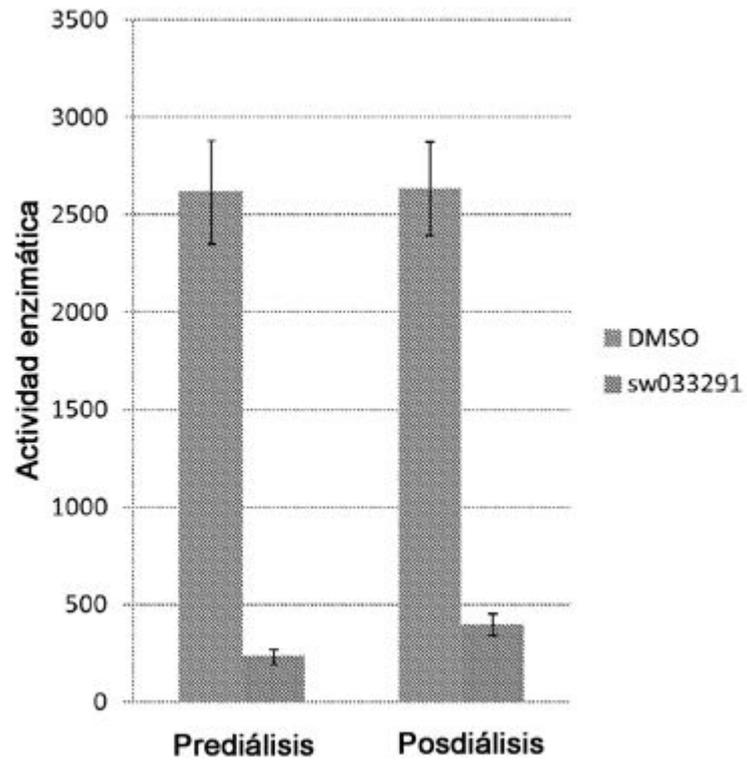


Figuras 20A-B

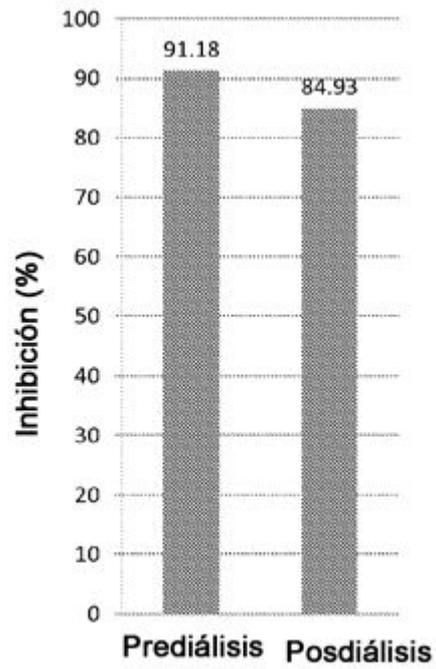


Figuras 21A-B

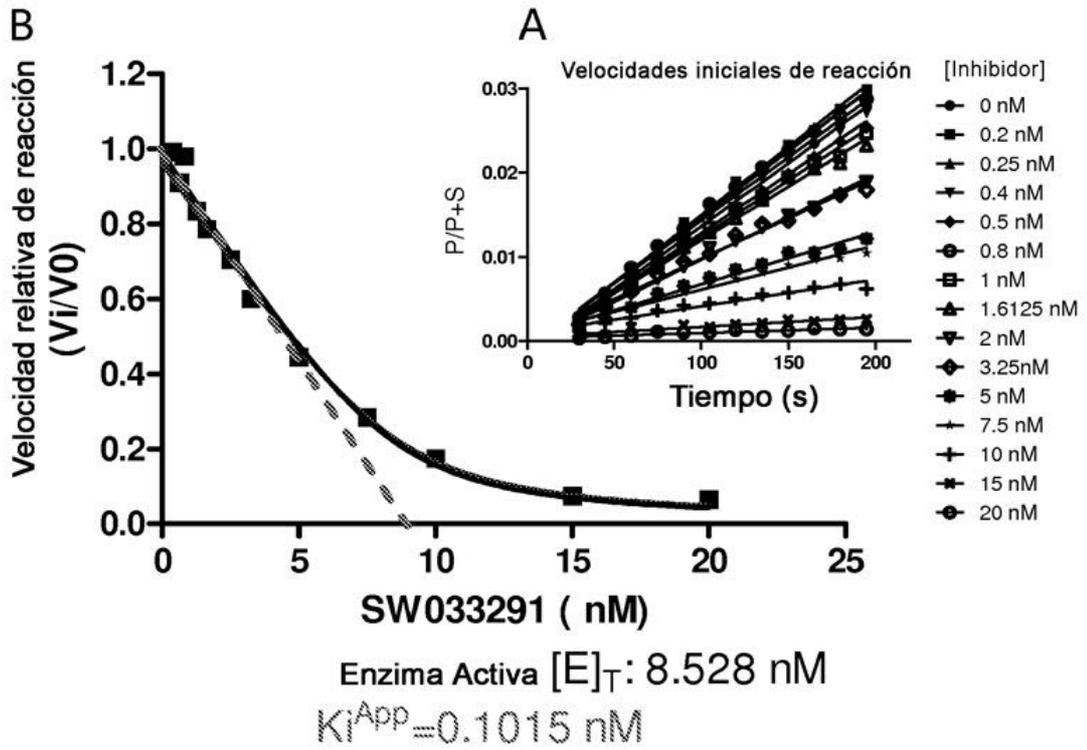
**A**



**B**

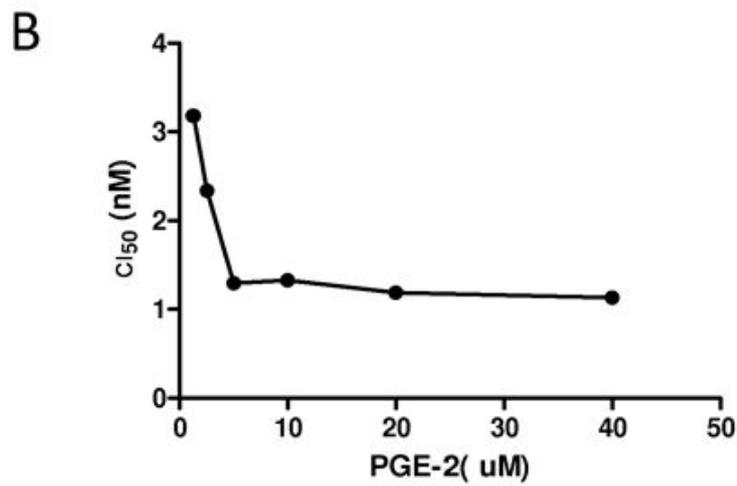
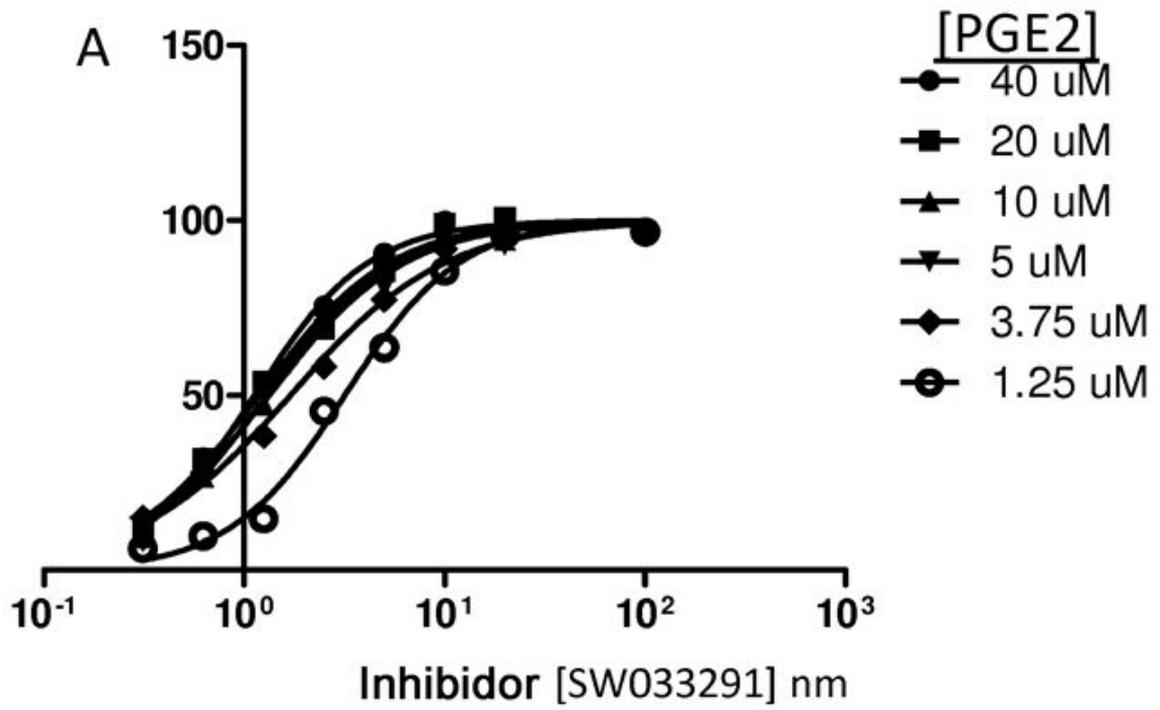


Figuras 22A-B



$$Y=V_0 \cdot \left( 1 - \frac{\left( (E_t + X + (K_i \cdot (1 + (S/K_m)))) - \sqrt{(E_t + X + (K_i \cdot (1 + (S/K_m)))^2 - 4 \cdot E_t \cdot X)} \right)}{2 \cdot E_t} \right)$$

Figuras 23A-B



Figuras 24A-B

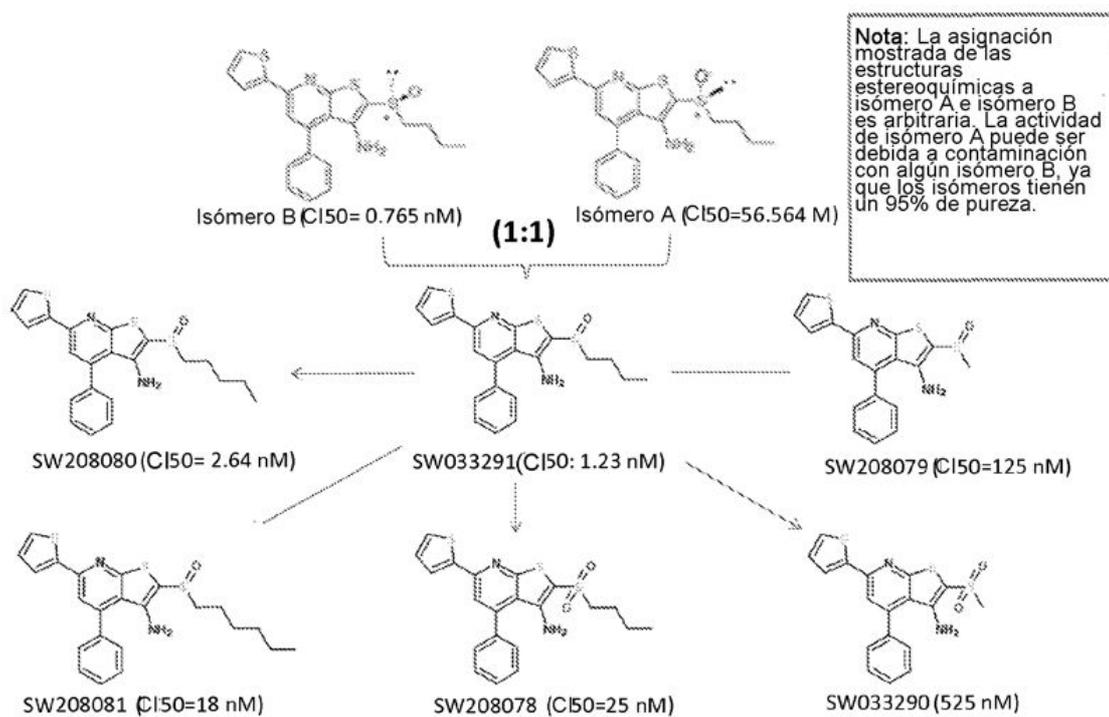


Fig. 25

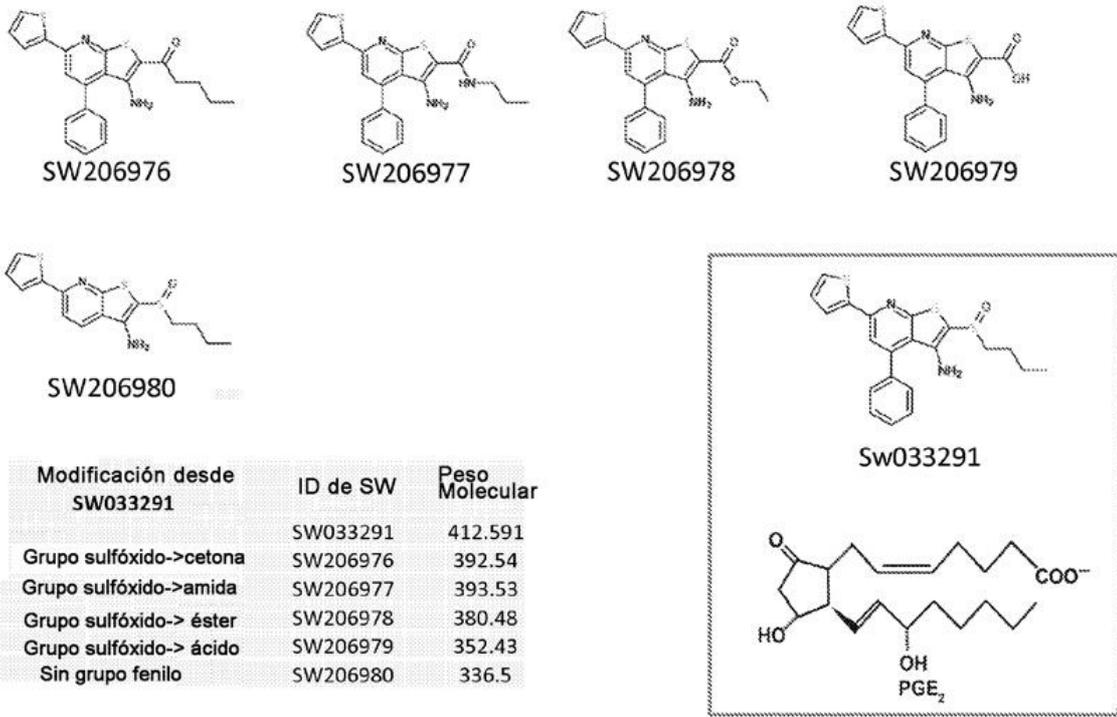
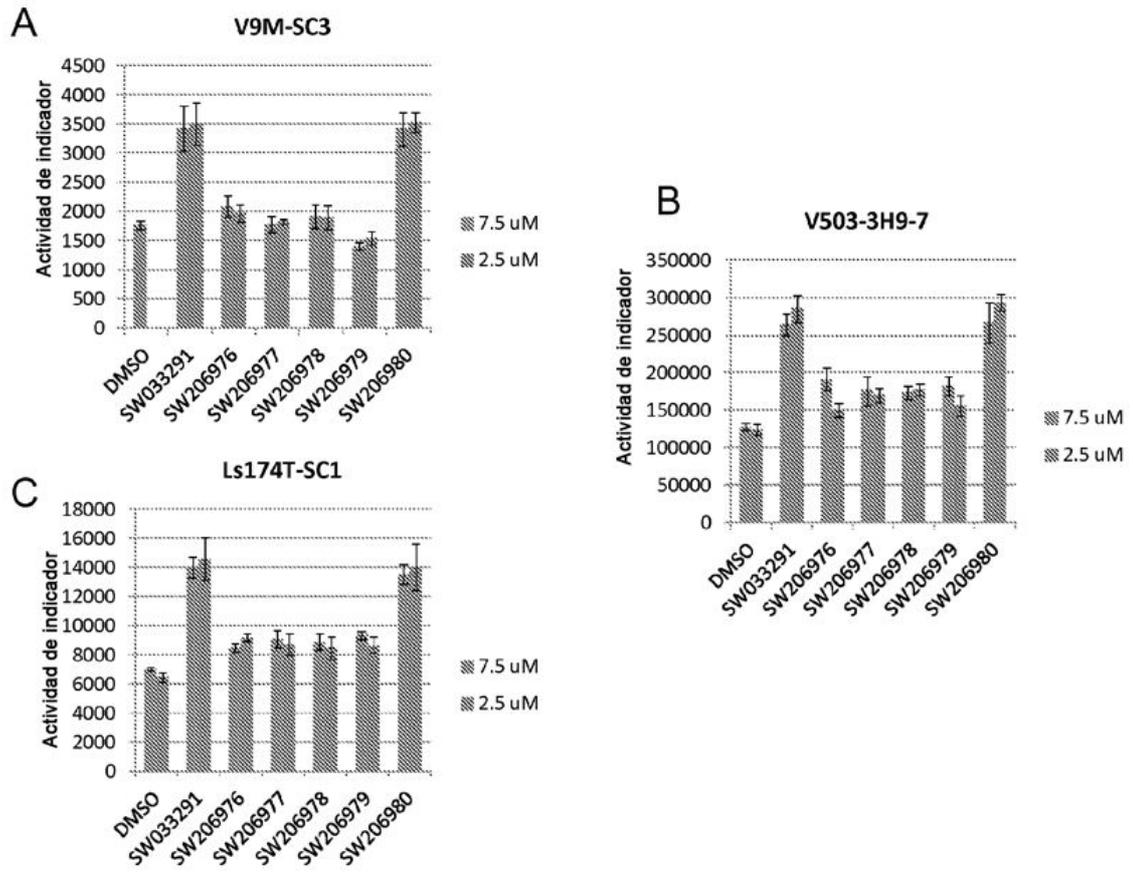


Fig. 26



Figuras 27A-C

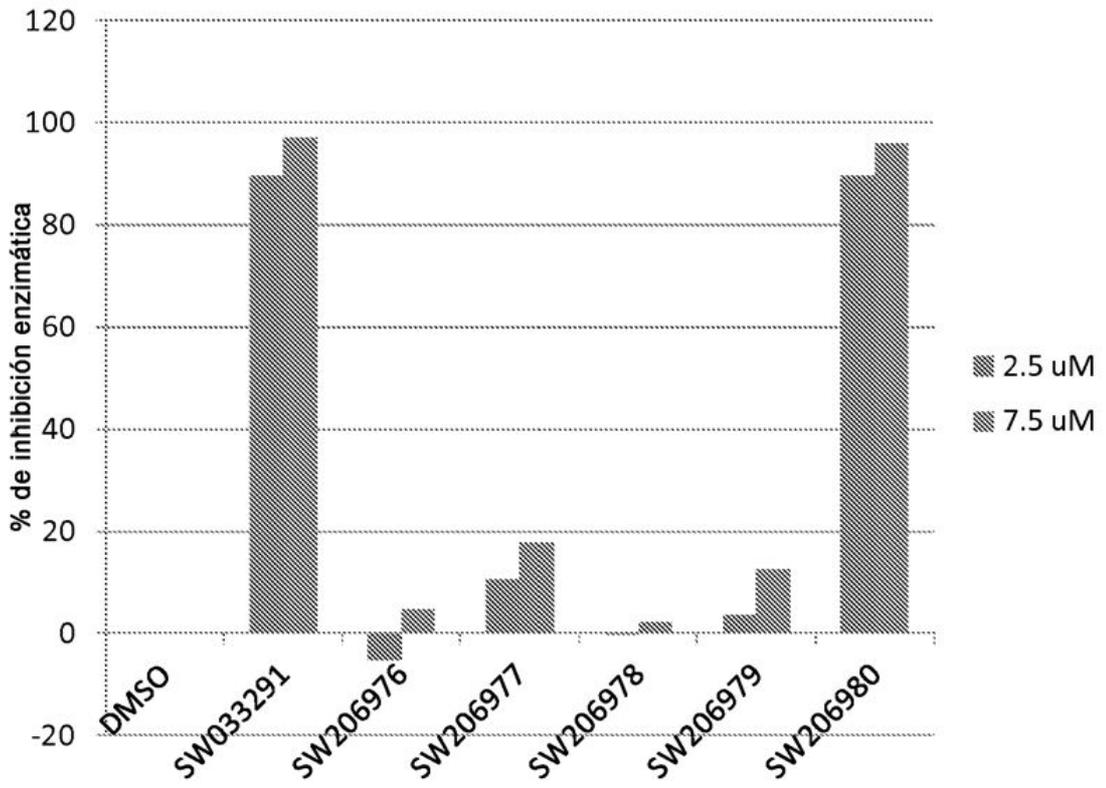
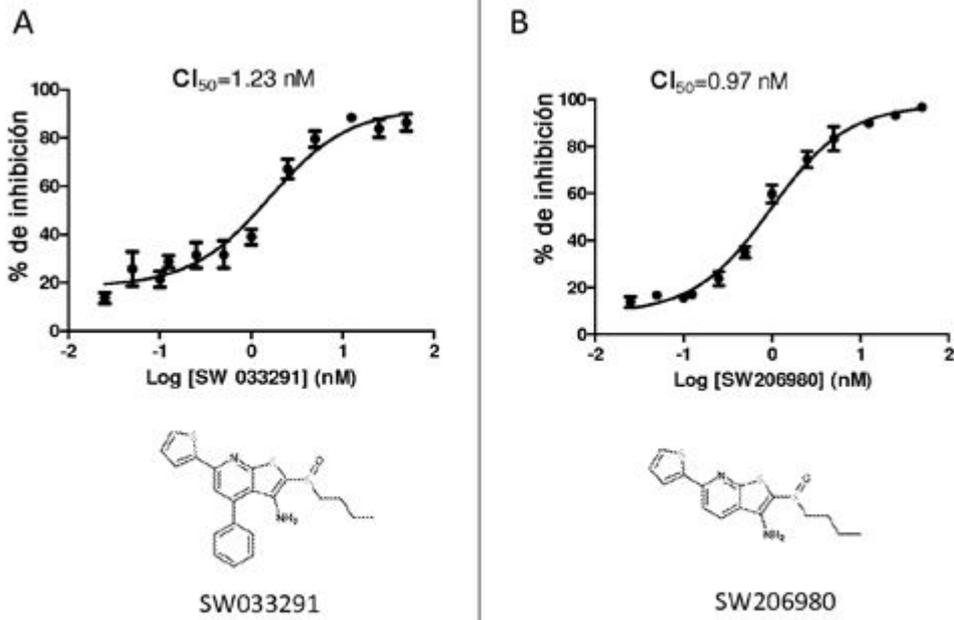
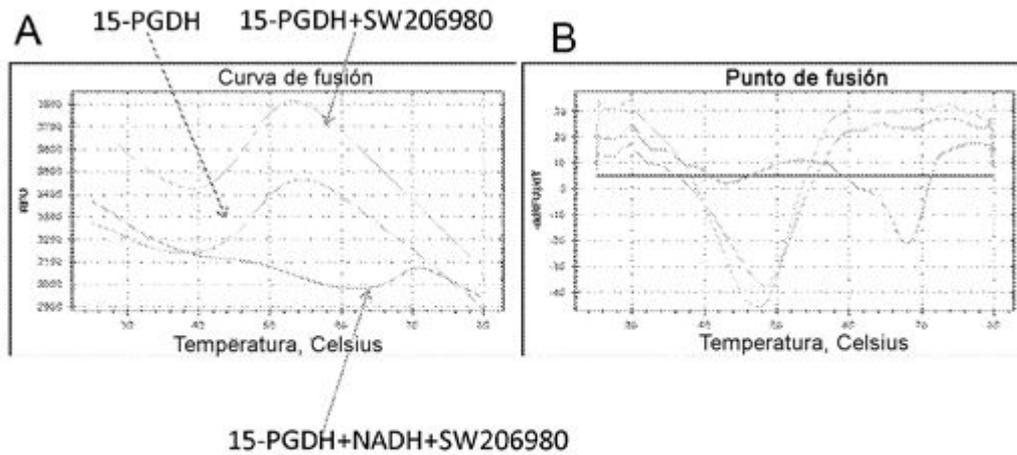


Fig. 28



SW206980 es un inhibidor de 15-PGDH ligeramente más potente que SW033291

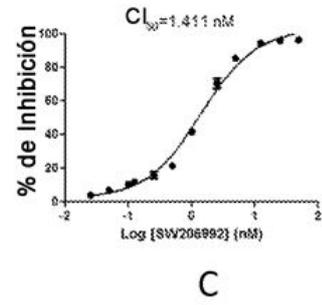
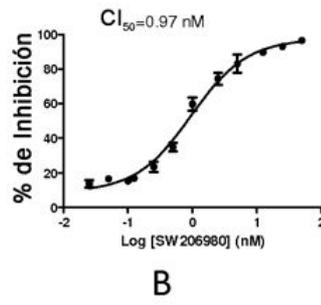
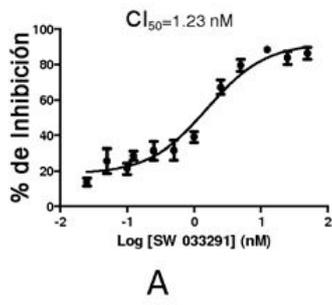
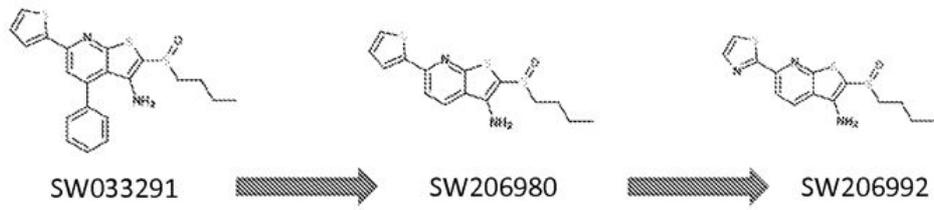
Figuras 29A-B



El mismo perfil de fusión que SW033291, pico principal a 68c

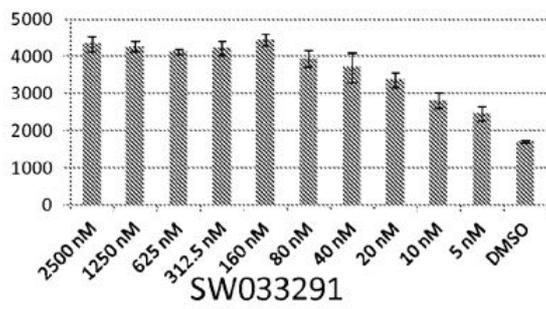
10 uM de proteína +125 uM de NADH + 10 uM de compuesto

Figuras 30A-B

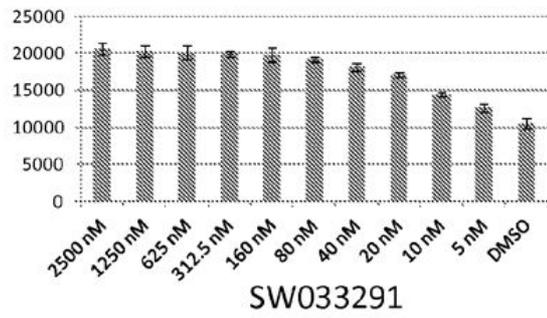


Figuras 31A-C

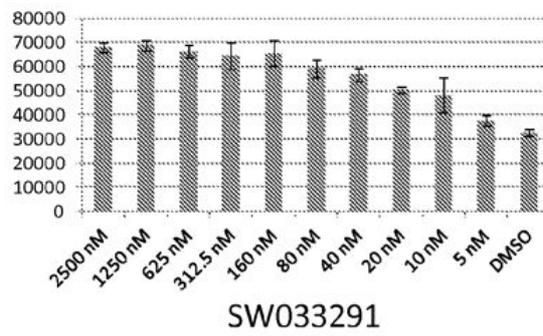
**A** Línea indicadora V9m-SC3



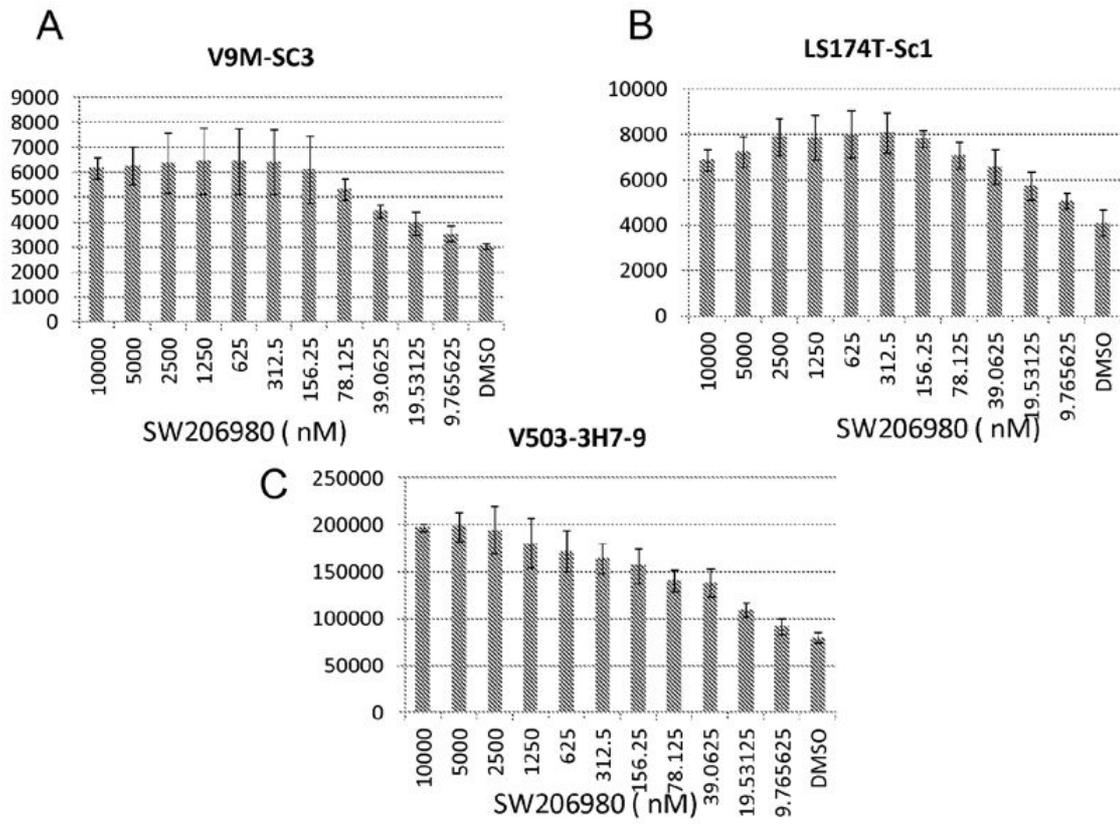
**B** Línea indicadora LS174T-SC1



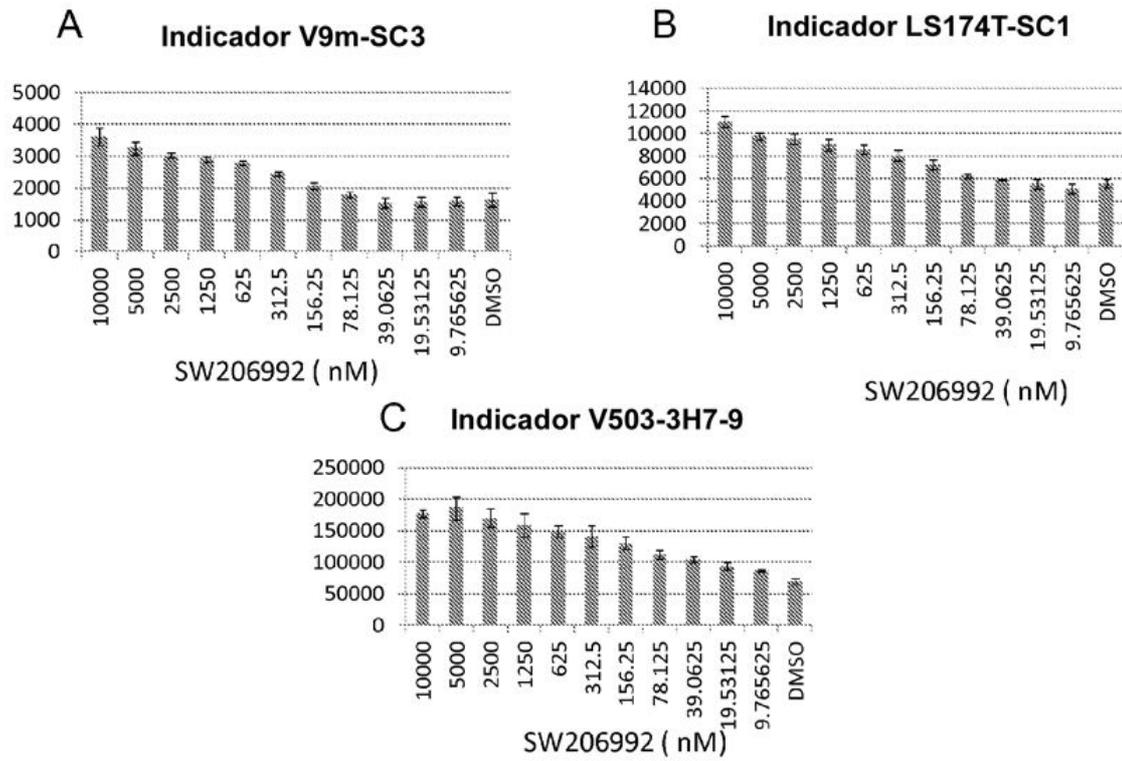
**C** Línea indicadora V503



Figuras 32A-C

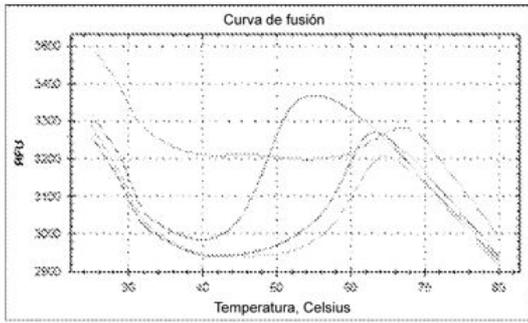


Figuras 33A-C

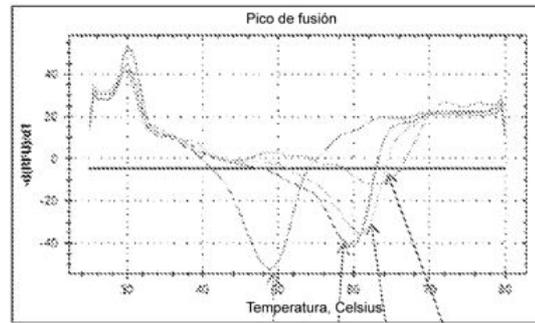


Figuras 34A-C

A



B



Proteína PGDH: 10  $\mu$ M  
 Compuesto: 20  $\mu$ M  
 NAD(+): 100  $\mu$ M

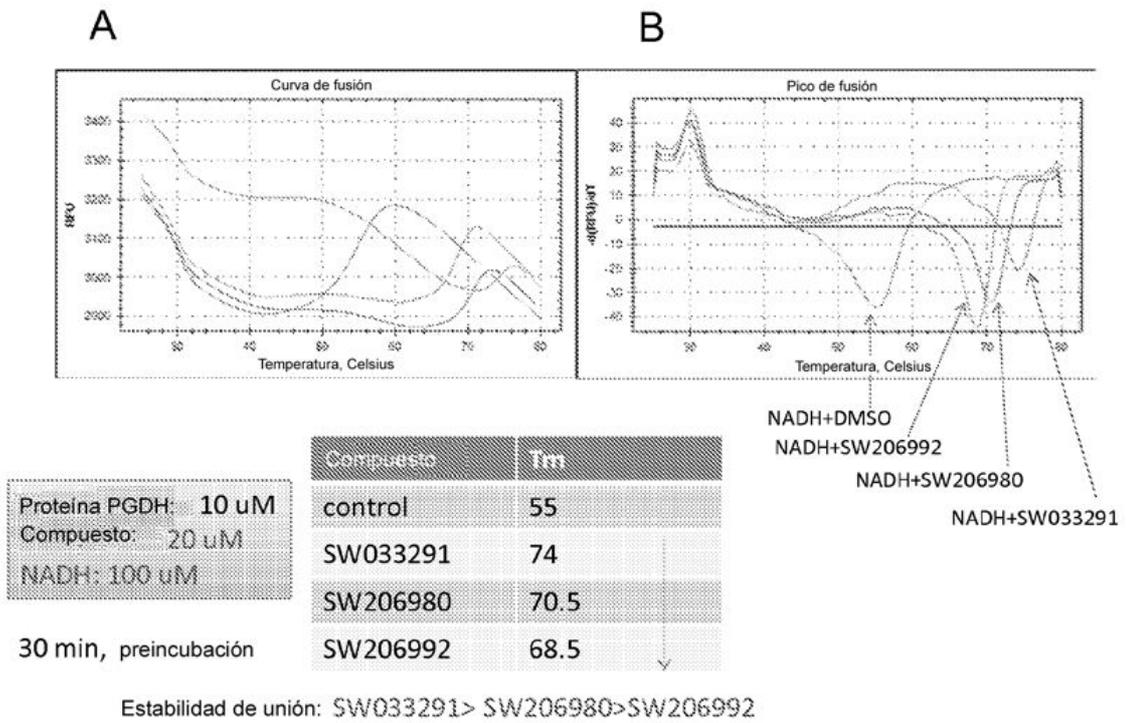
30 min, preincubación

Compuesto	$T_m$
control	49
SW033291	63
SW206980	61
SW206992	59

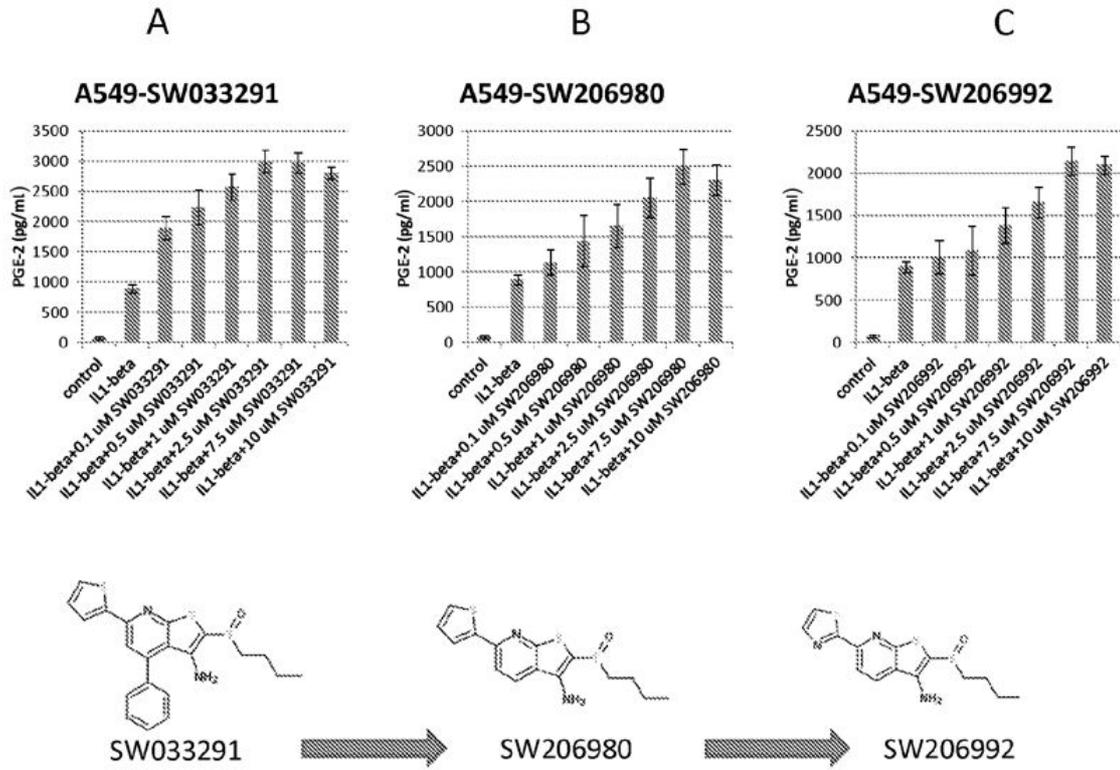
NAD(+)+DMSO  
 NAD(+)+SW206992  
 NAD(+)+SW206980  
 NAD(+)+SW03329

Estabilidad de unión: SW033291 > SW206980 > SW206992

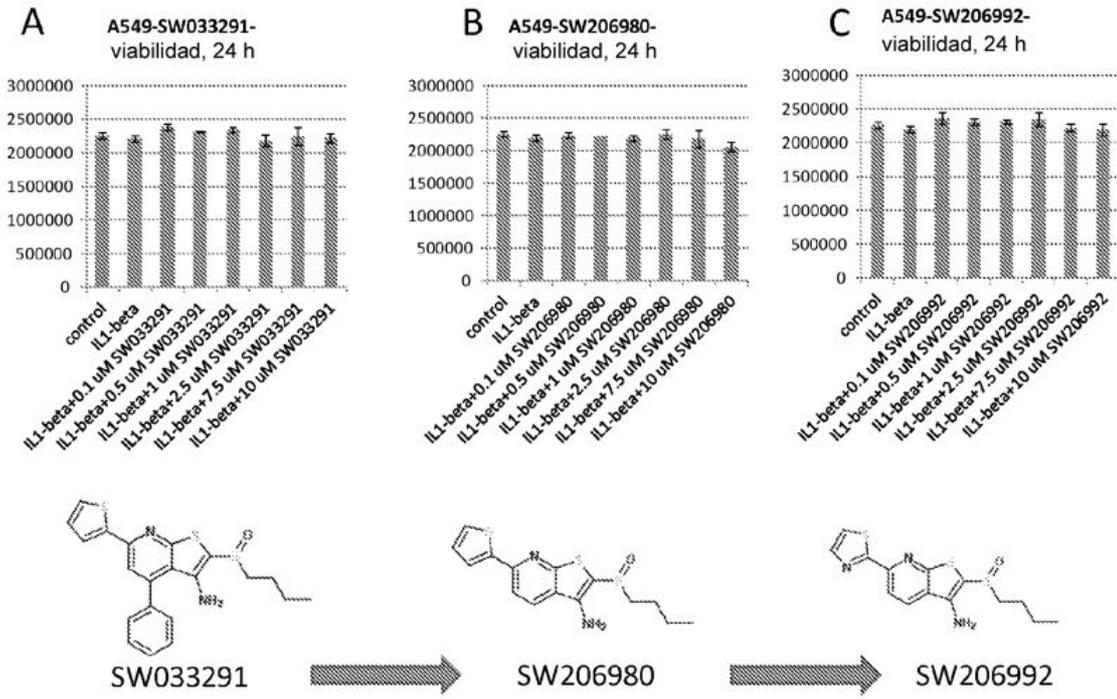
Figuras 35A-B



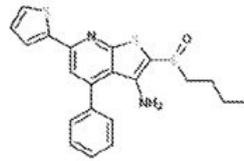
Figuras 36A-B



Figuras 37A-C



Figuras 38A-C



SW033291

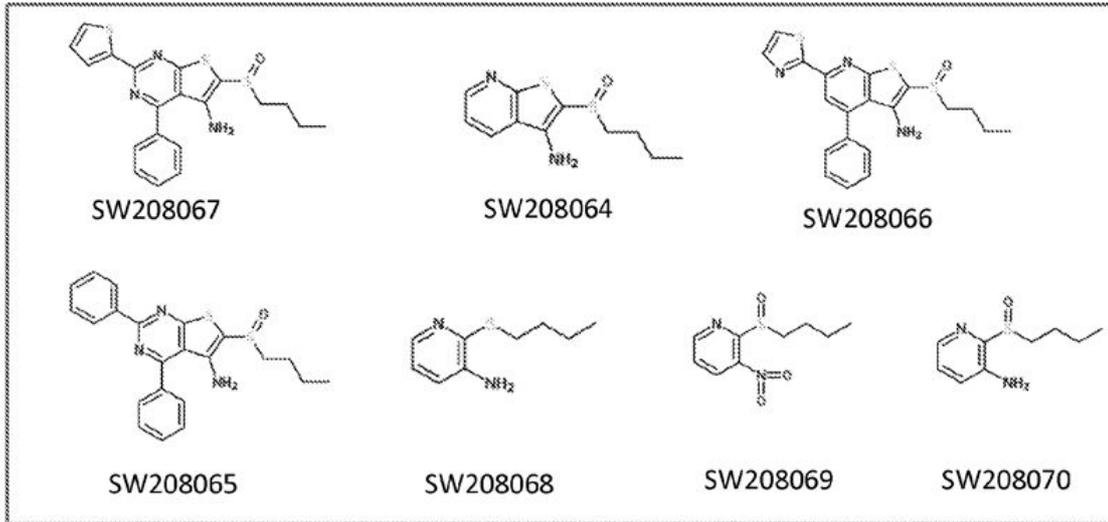
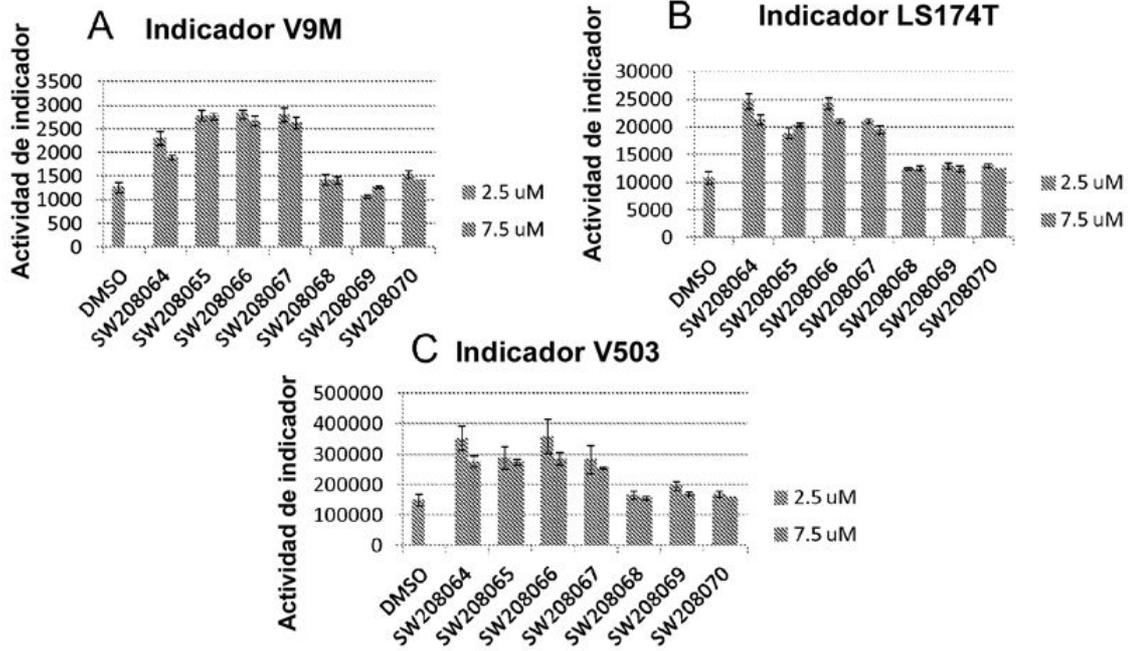


Fig. 39



Figuras 40A-C

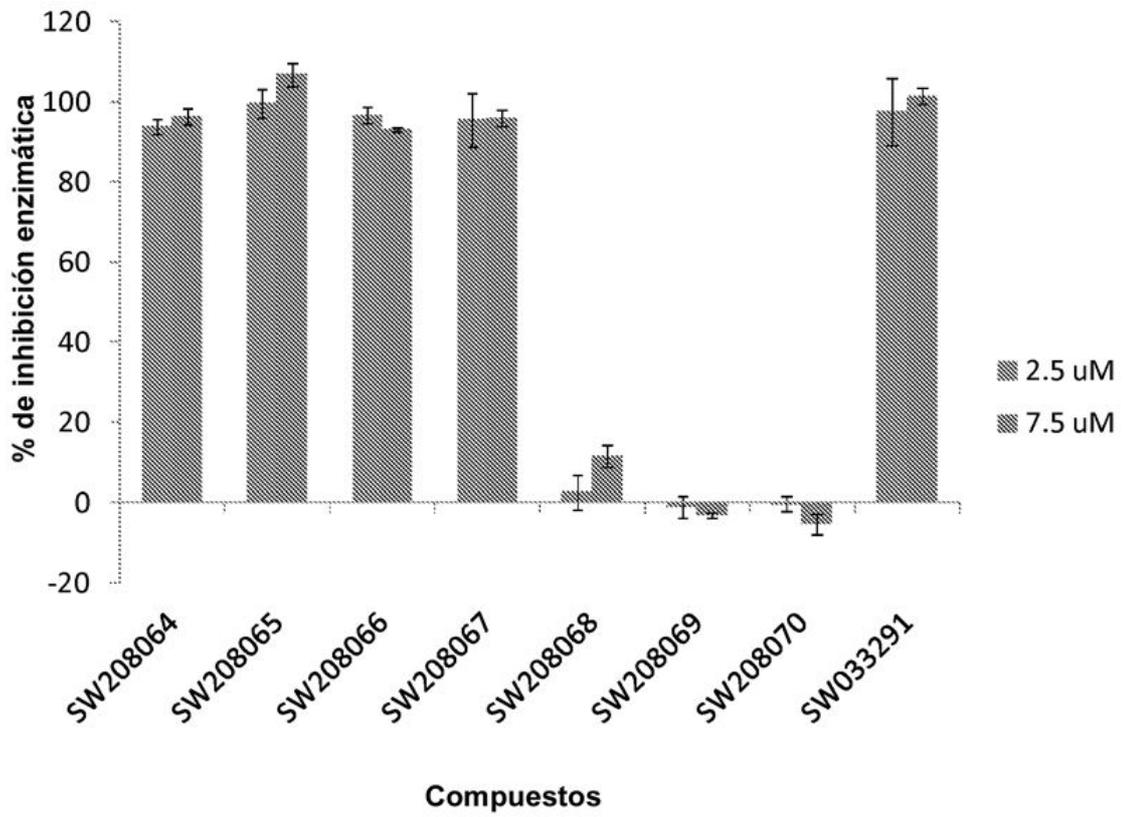
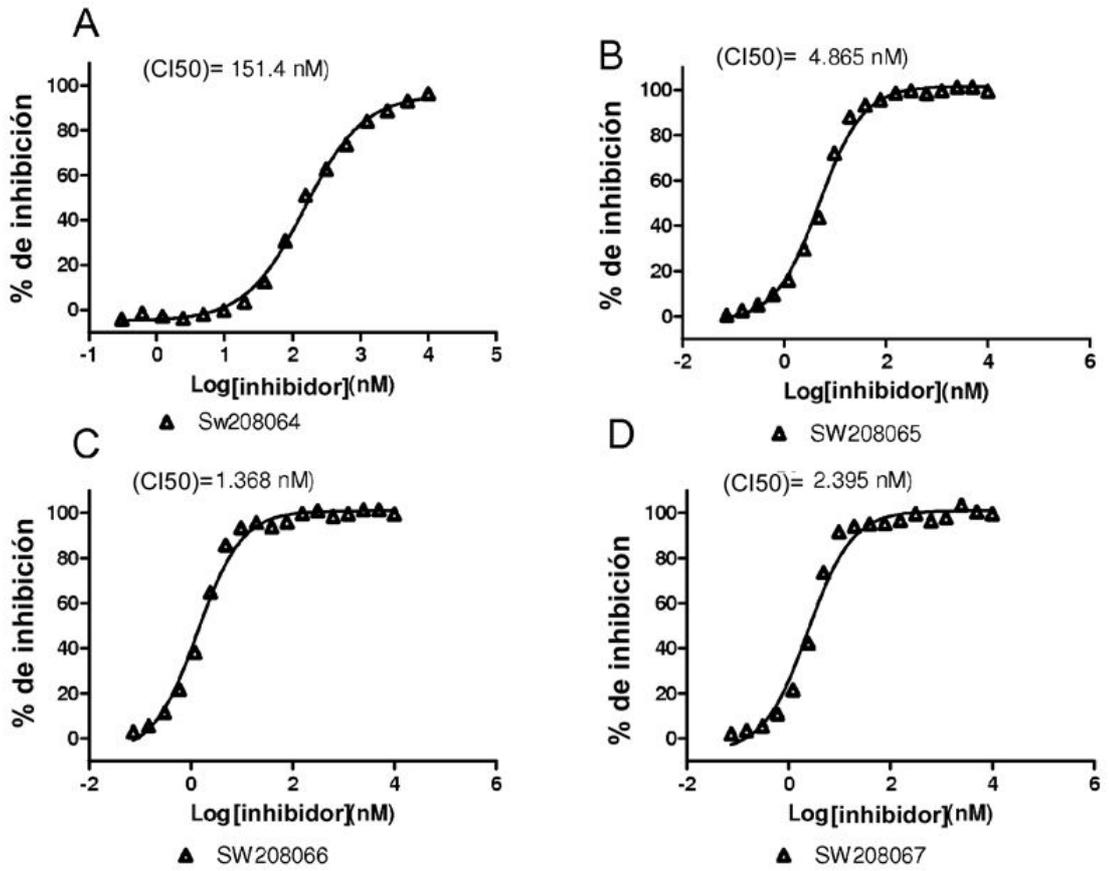


Fig. 41



Enzima activa: alrededor de 2,5 nM en el ensayo

Figuras 42A-D

Titulación de SW033291 y análogos

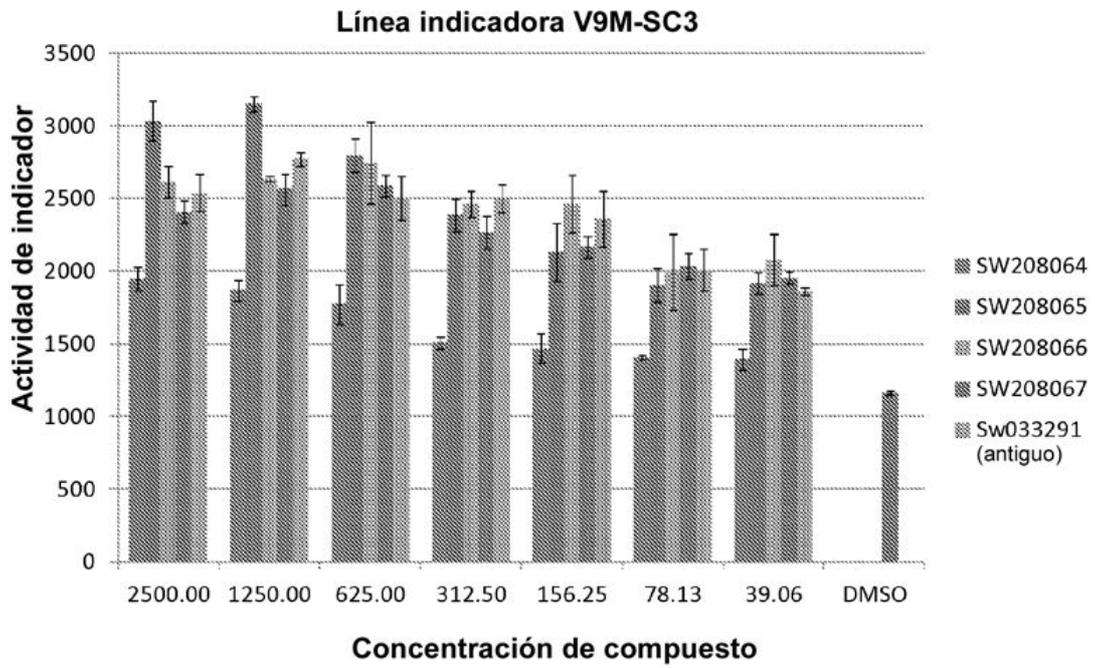


Fig. 43

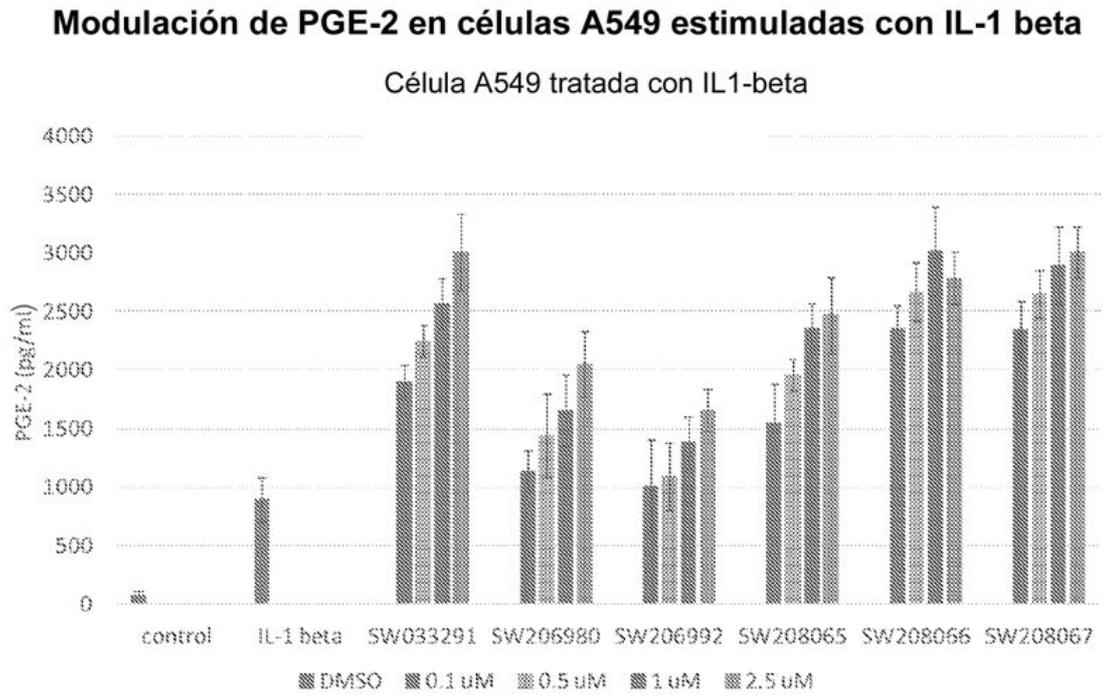


Fig. 44

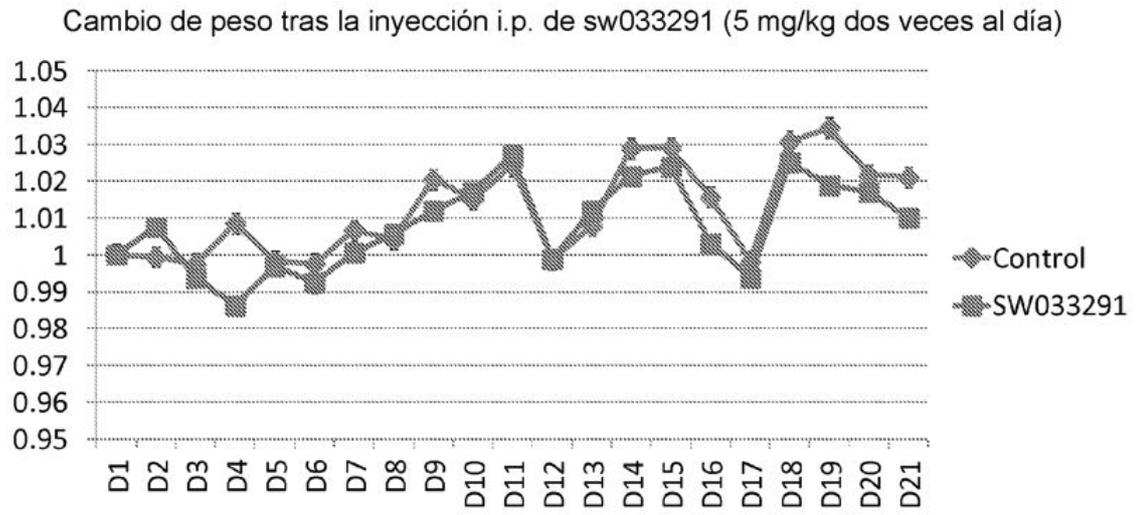
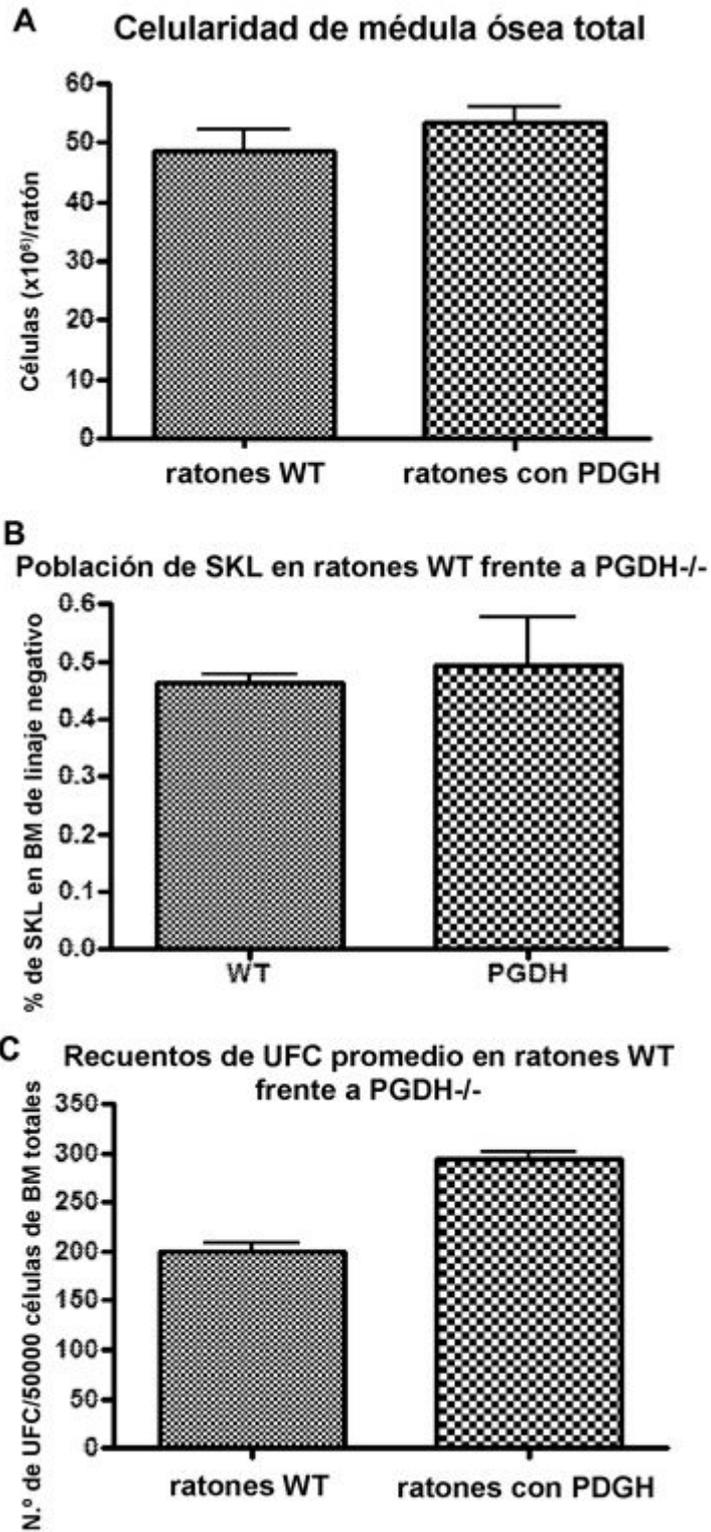


Fig. 45



Figuras 46A-C

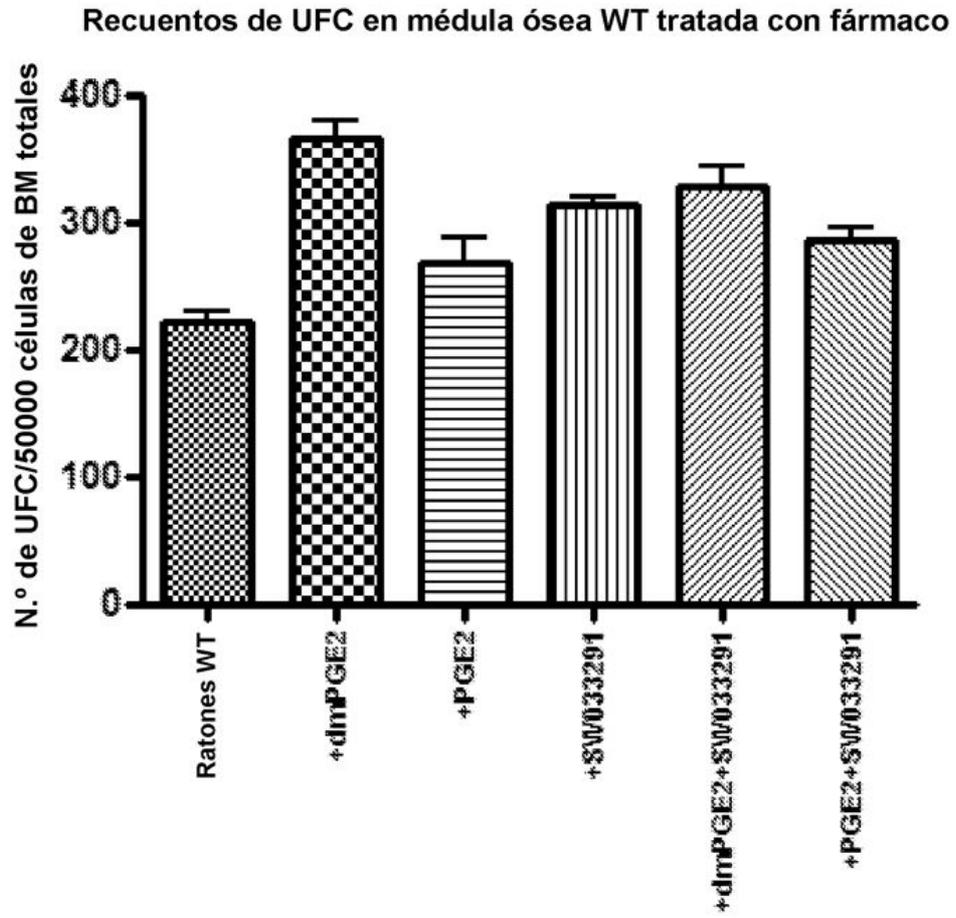
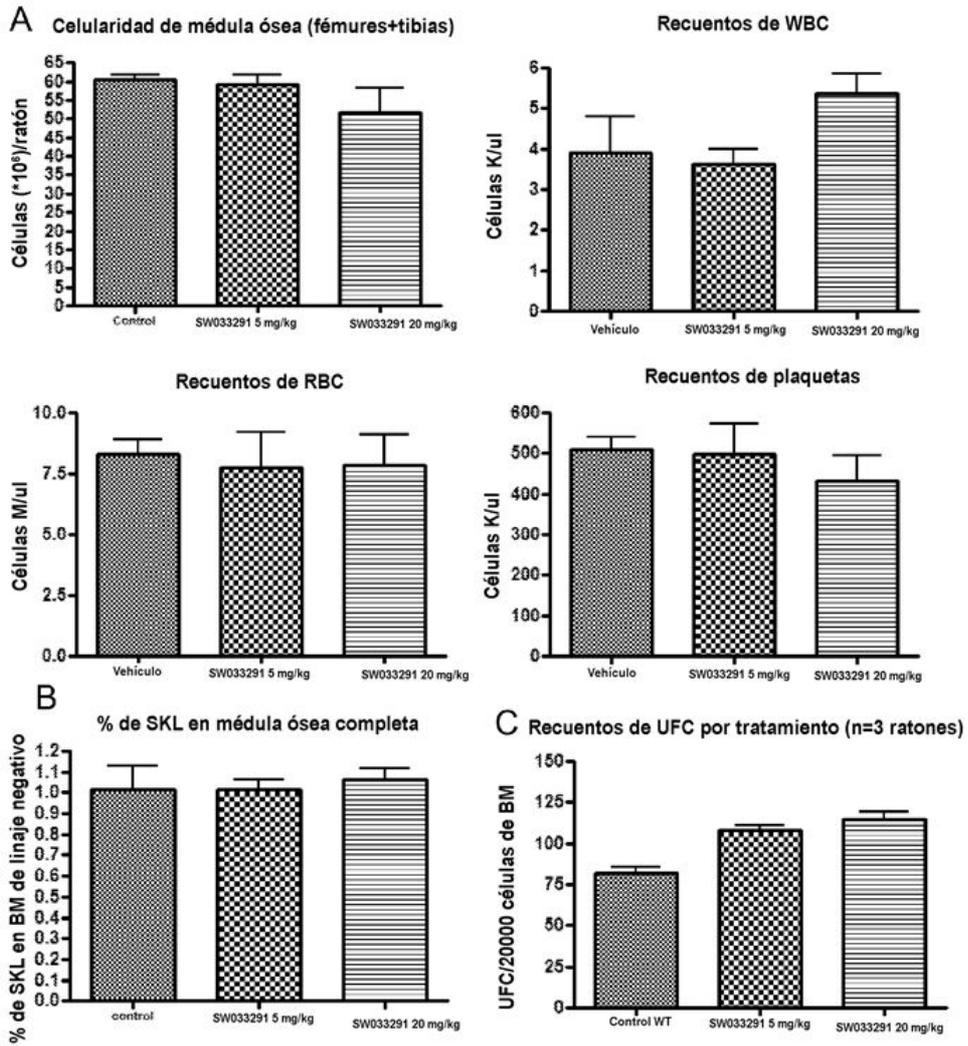
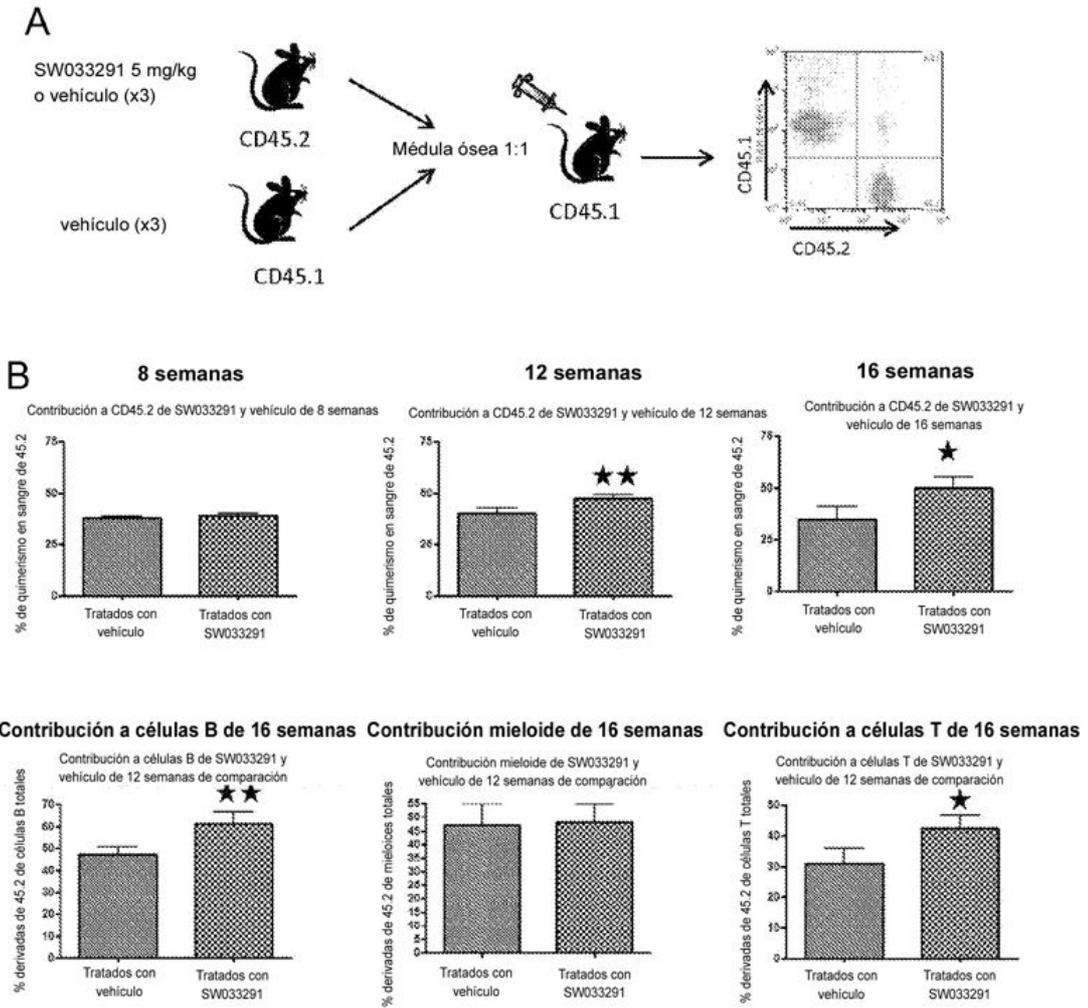


Fig. 47



Figuras 48A-C



Figuras 49



Fig. 50

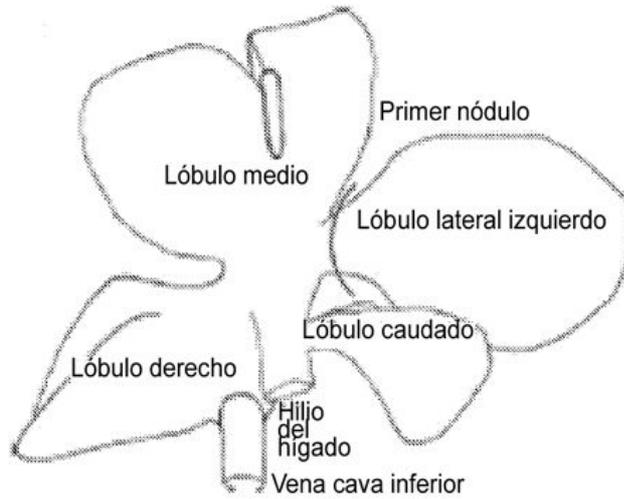
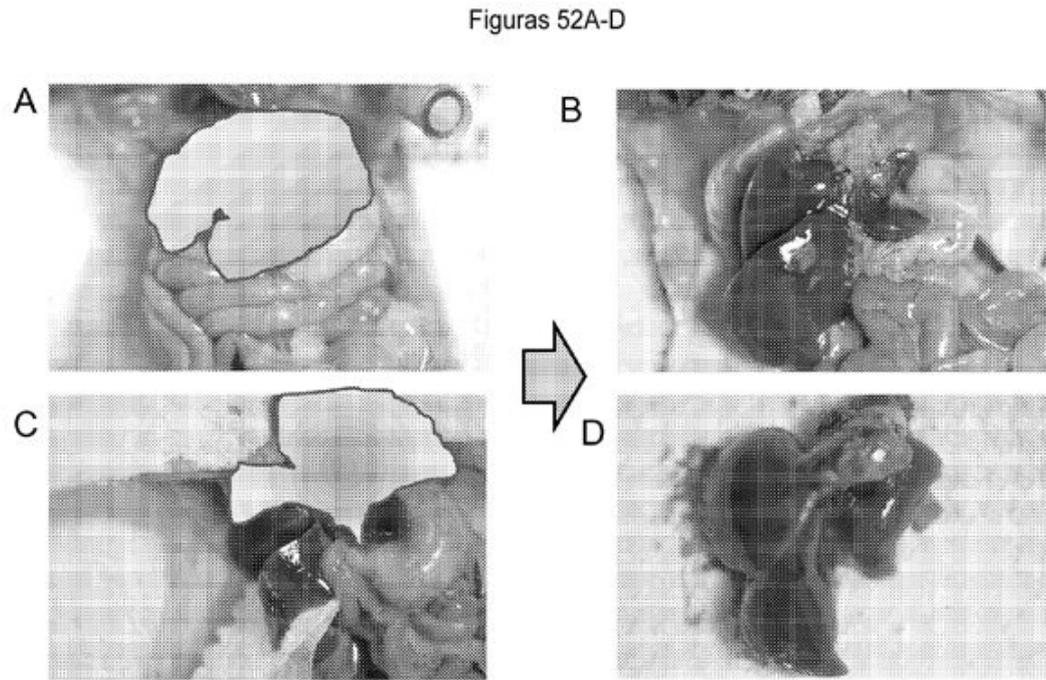
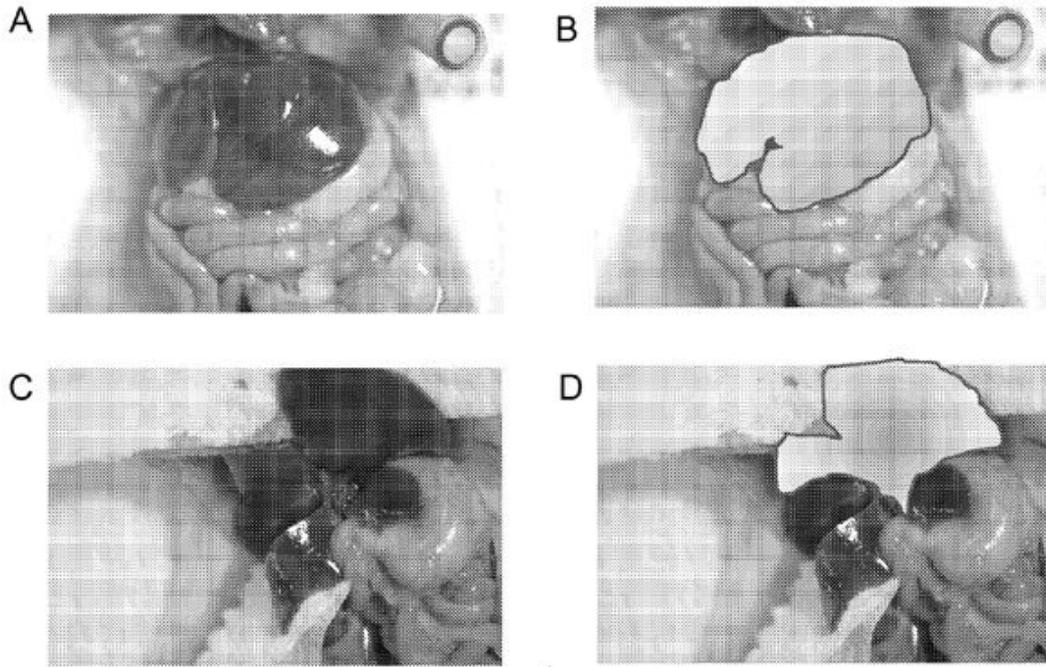


Fig. 51



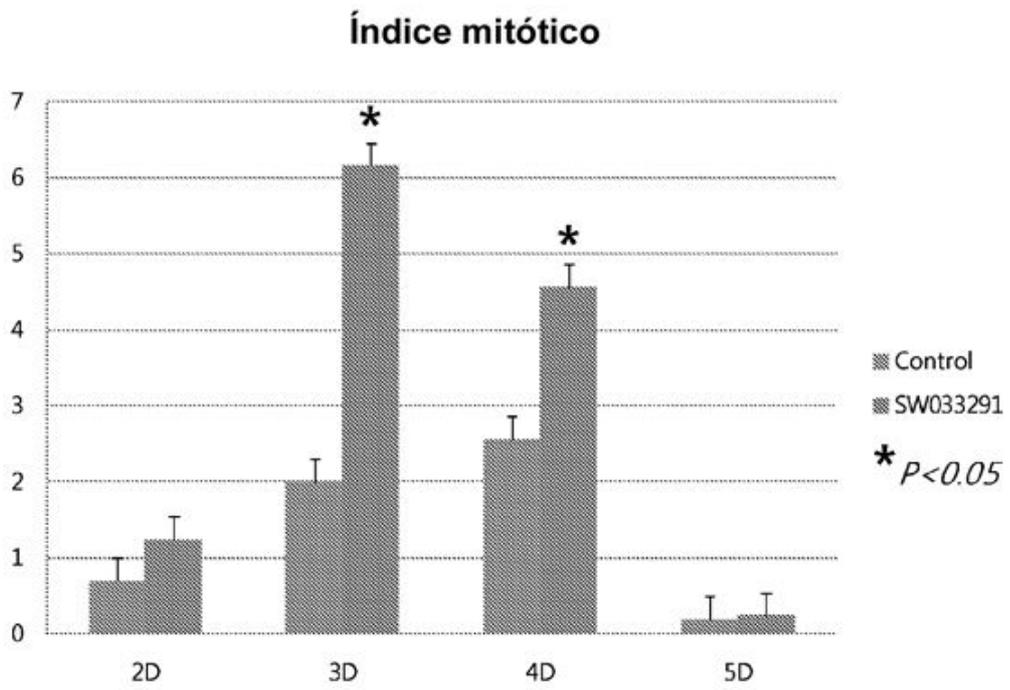
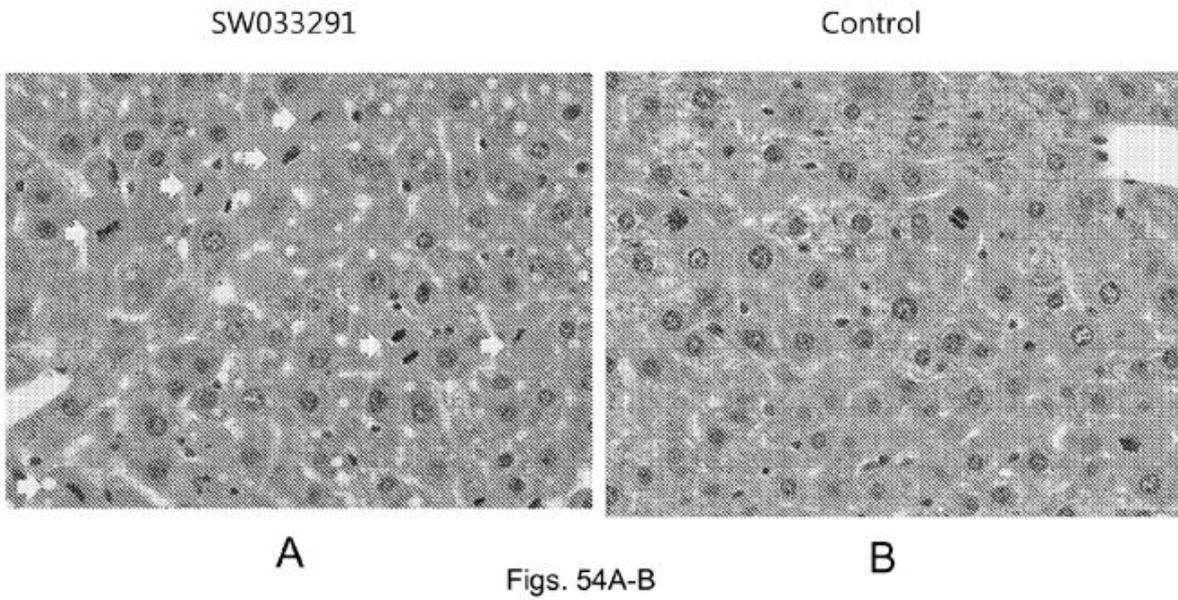


Fig. 55

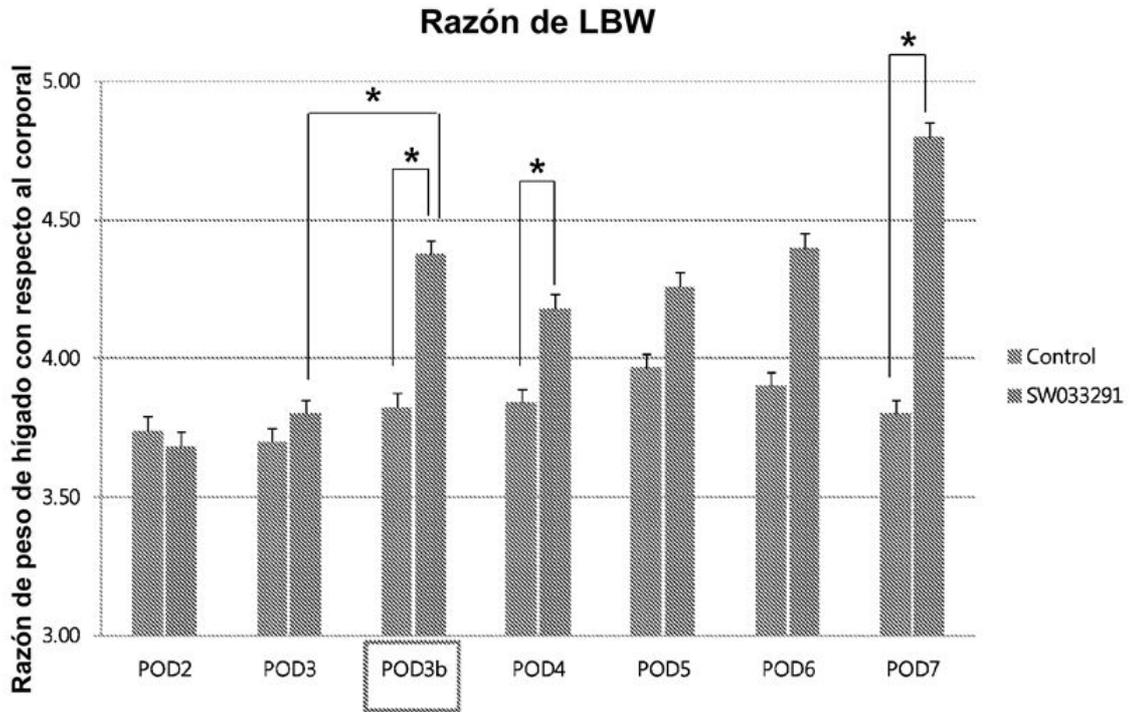


Fig. 56

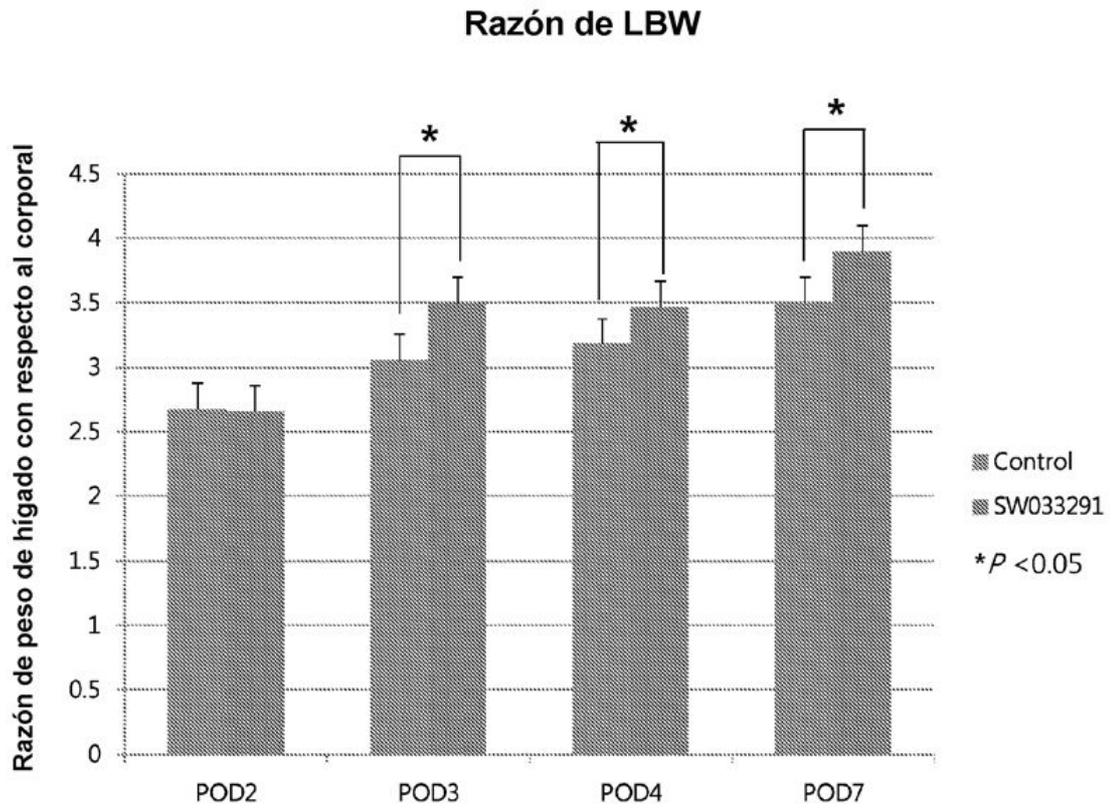


Fig. 57

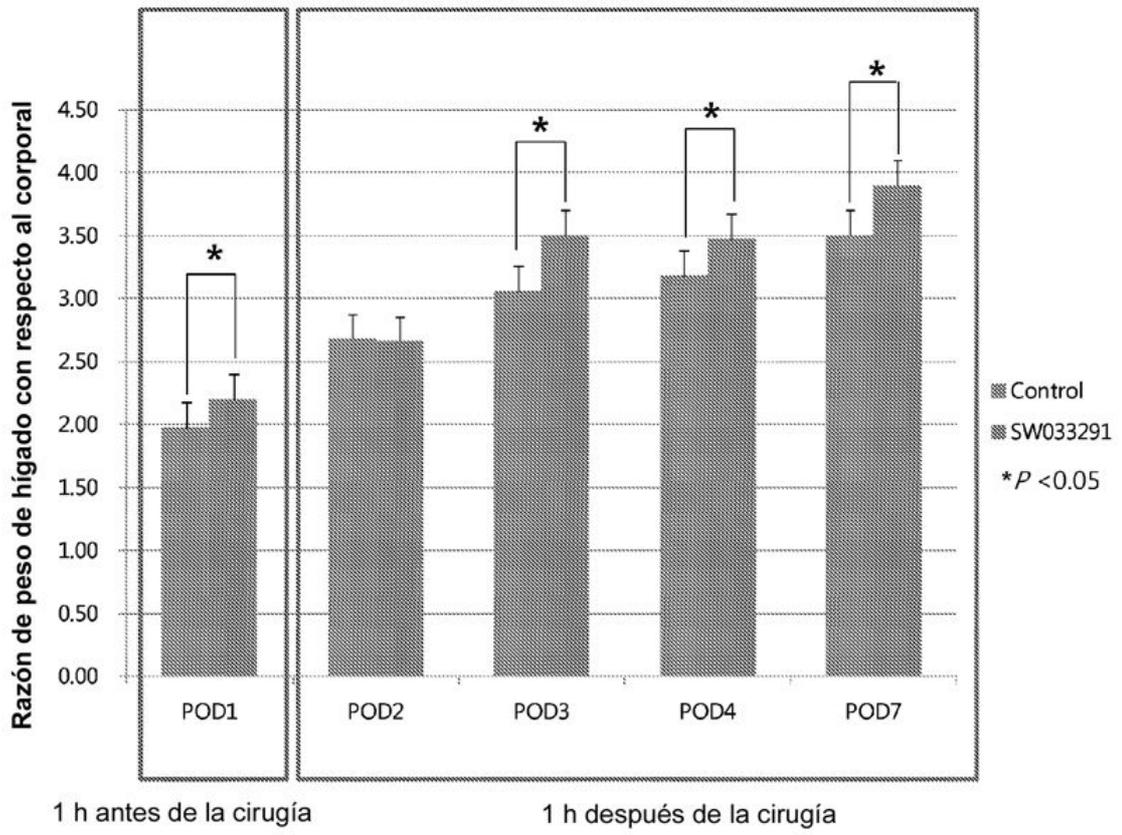
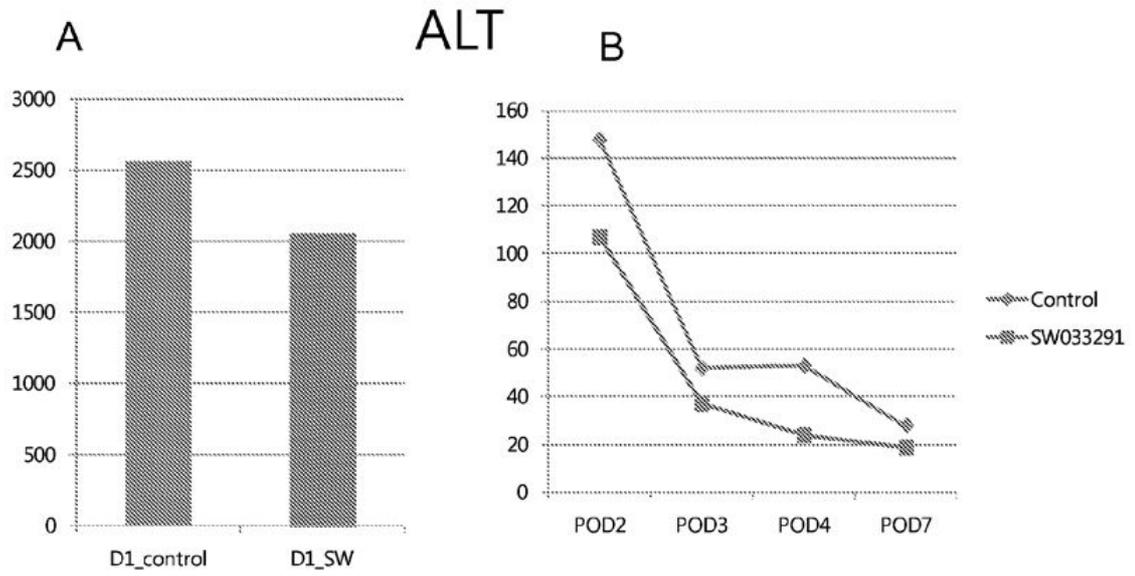


Fig. 58

Control frente a SW033291



Figuras 59A-B

Control frente a SW033291

**Bilirrubina**

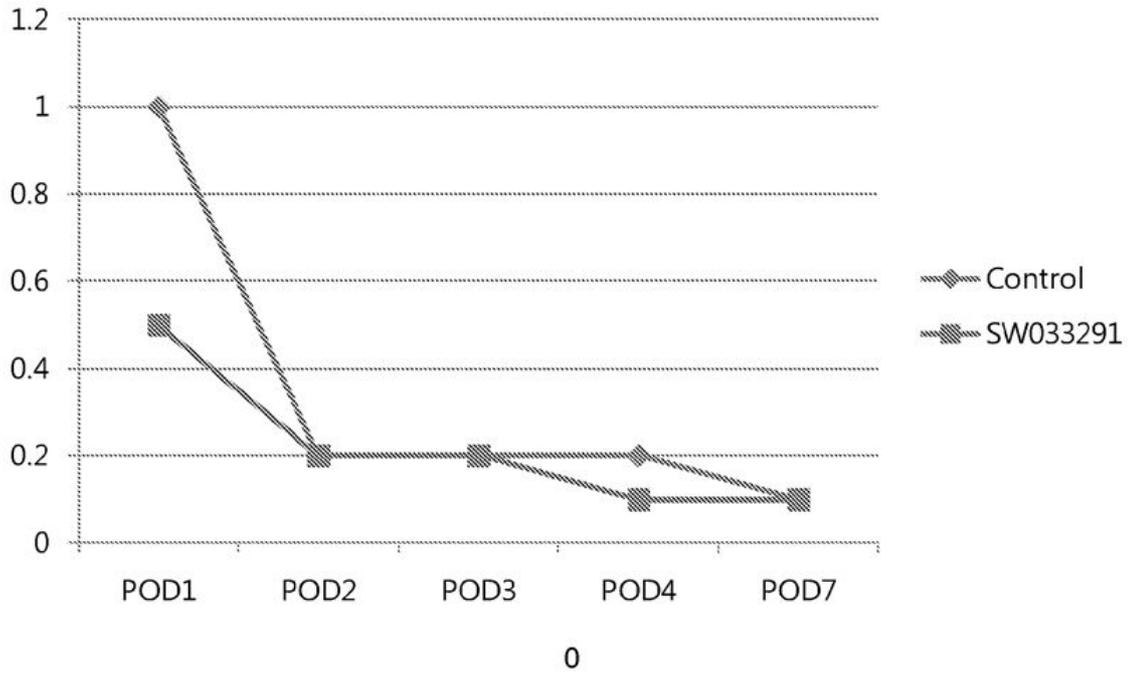


Fig. 60

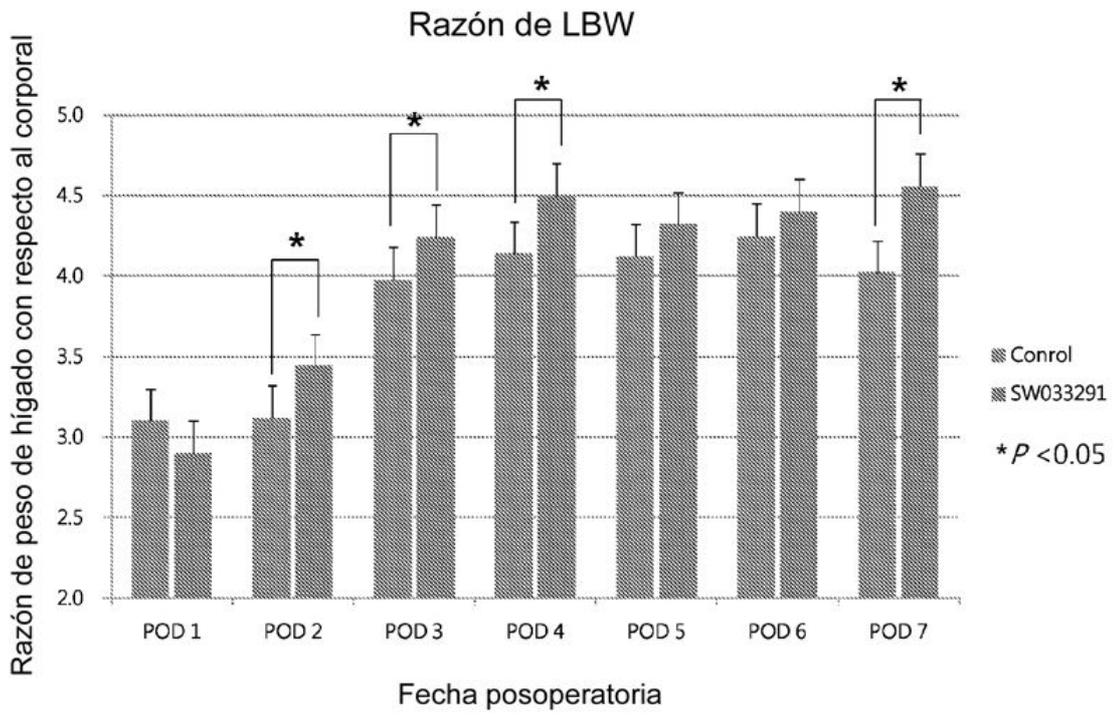


Fig. 61

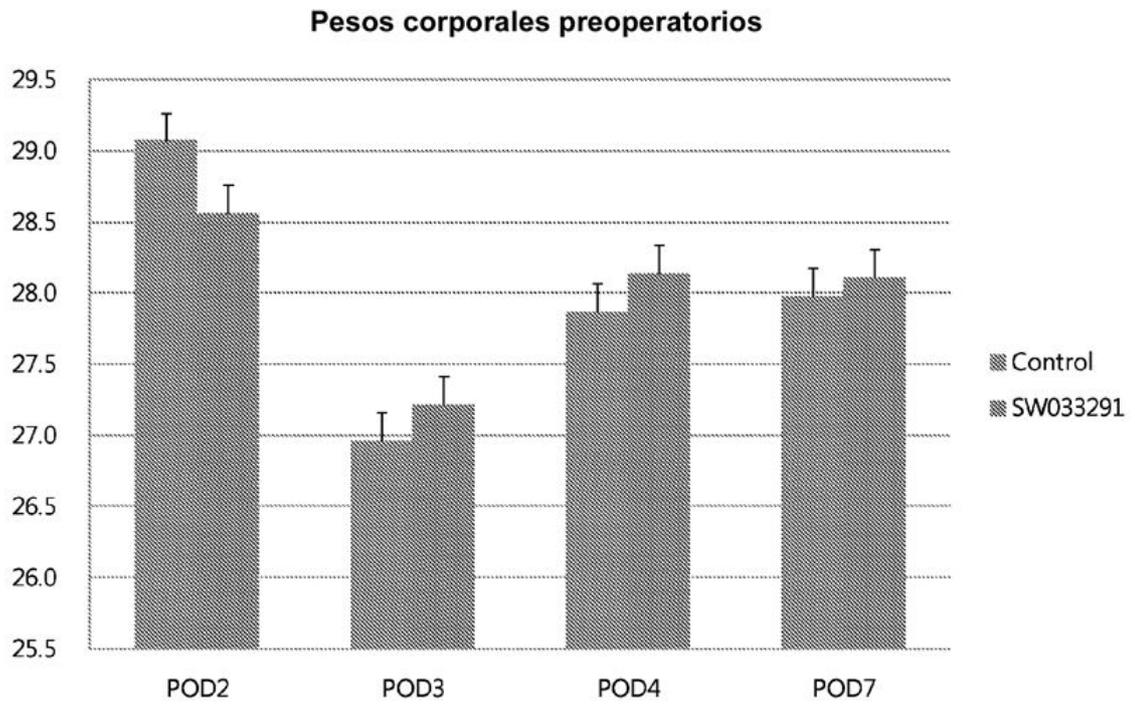


Fig. 62

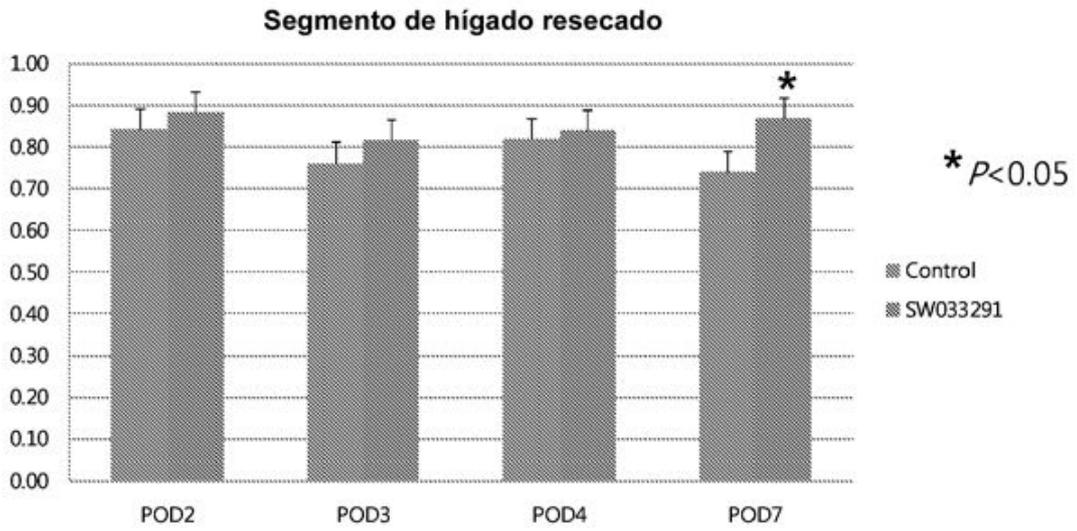


Fig. 63

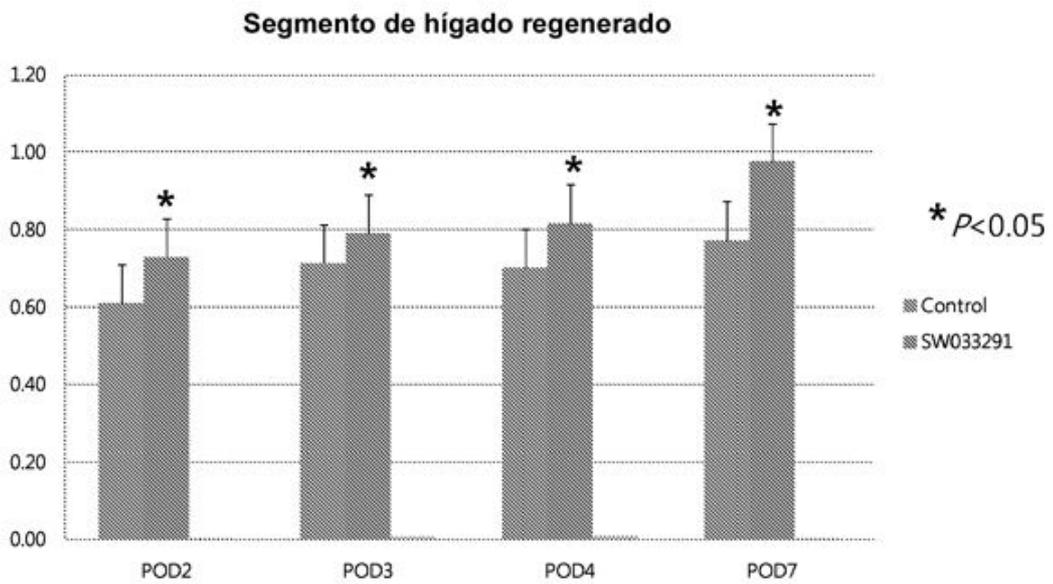


Fig. 64

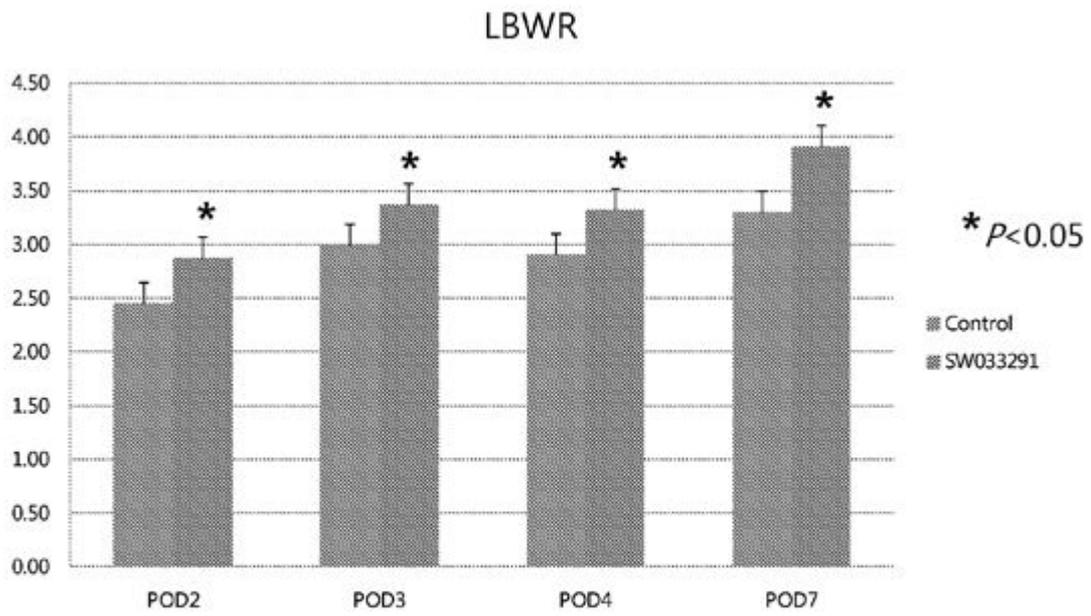


Fig. 65

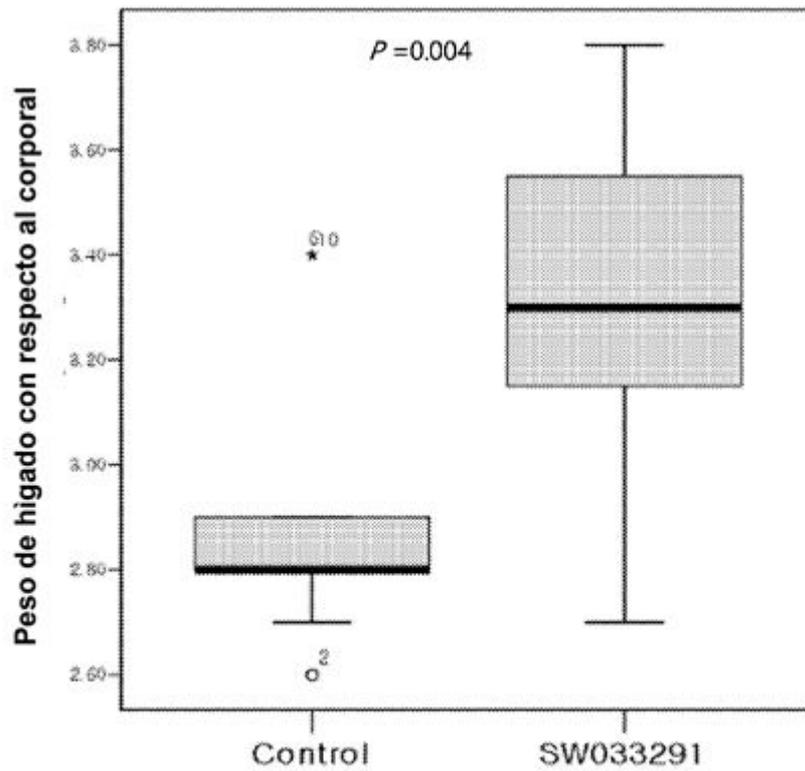


Fig. 66

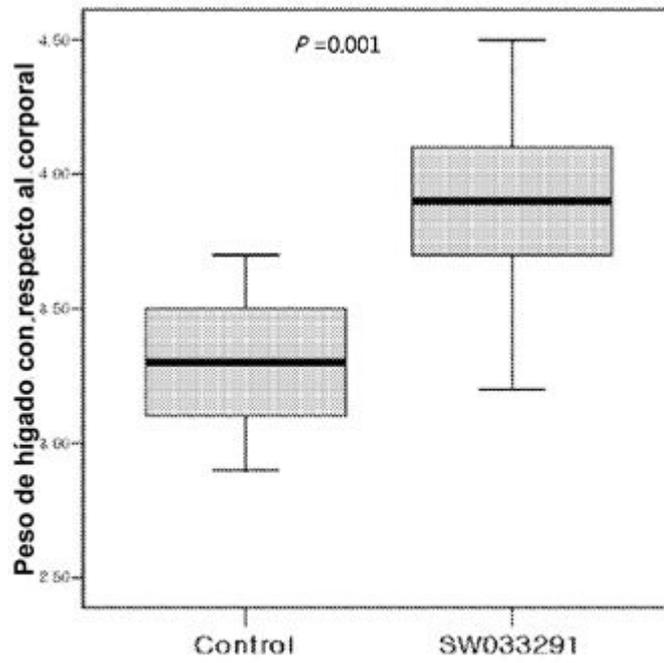


Fig. 67

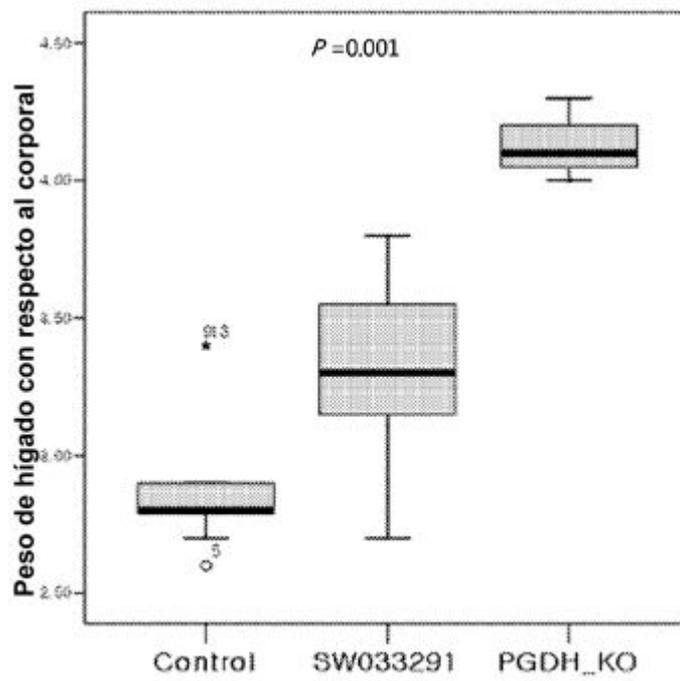


Fig. 68

### Tinción con BrdU en el POD 2

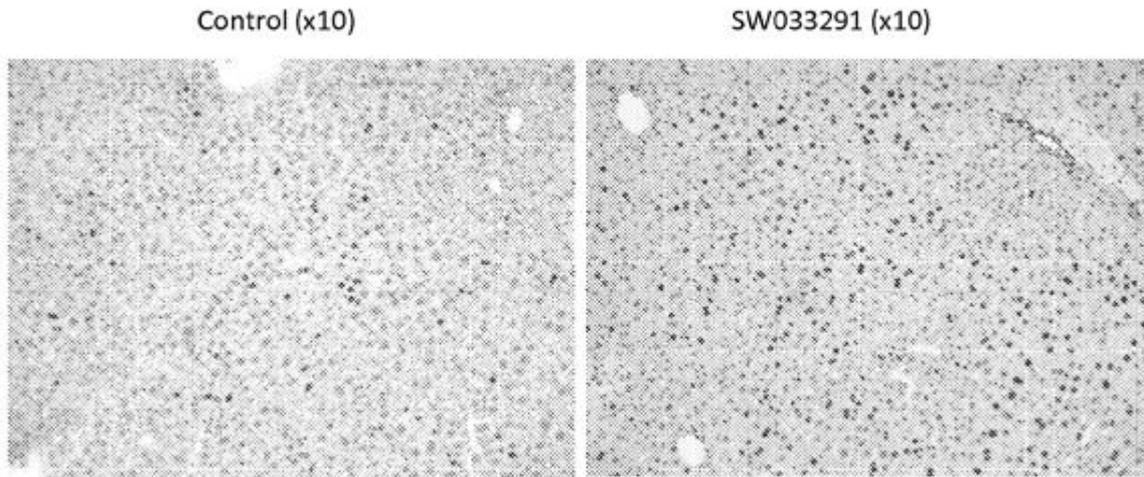


Fig. 69

### Tinción con BrdU en el POD 2

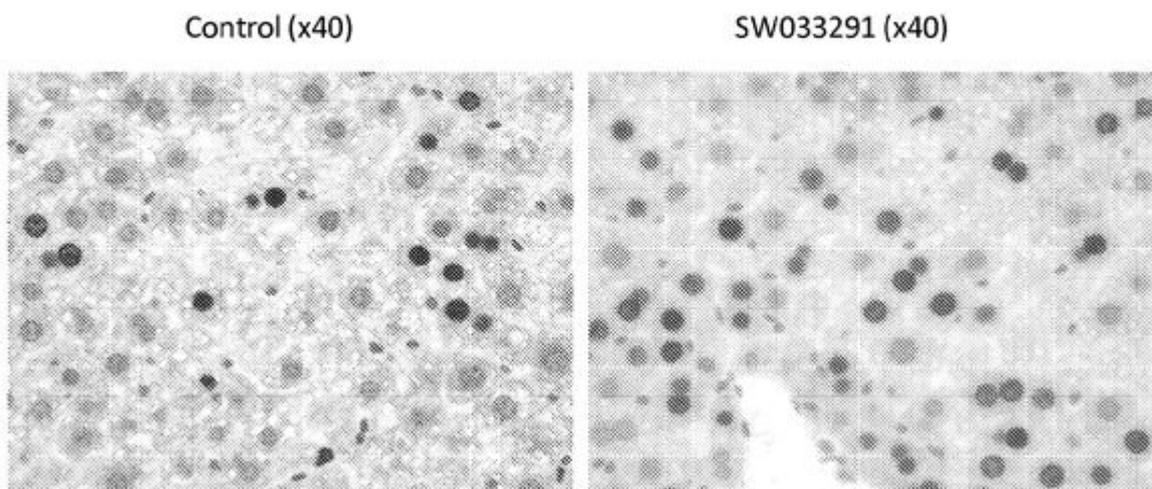


Fig. 70

### Hepatocitos BrdU(+) en el POD 2

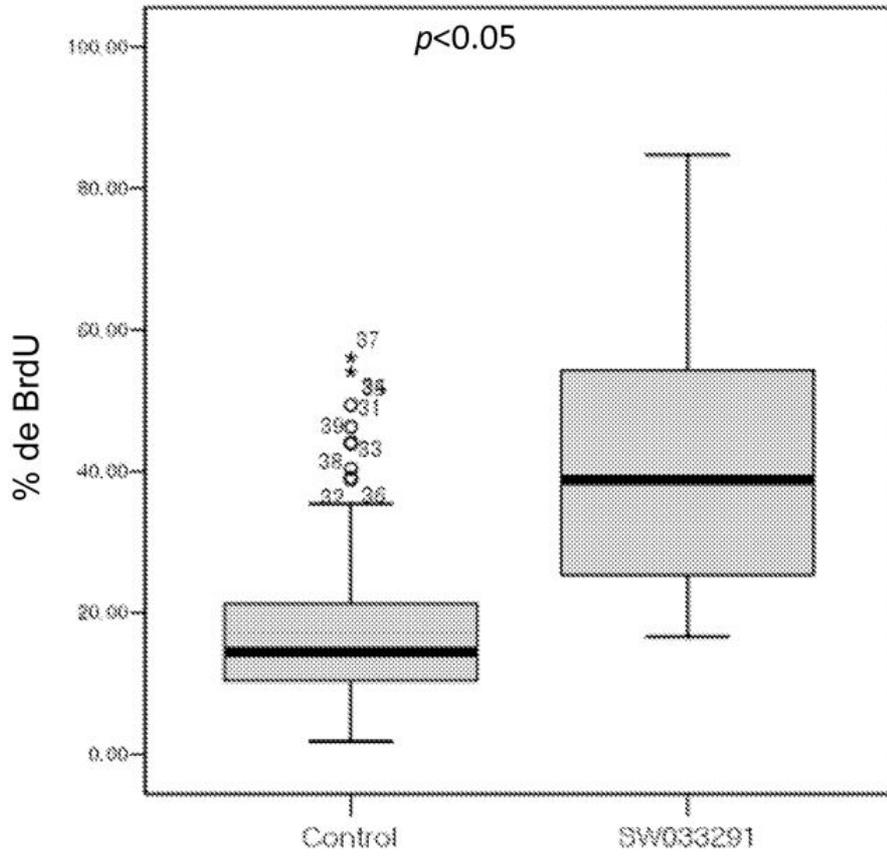


Fig. 71

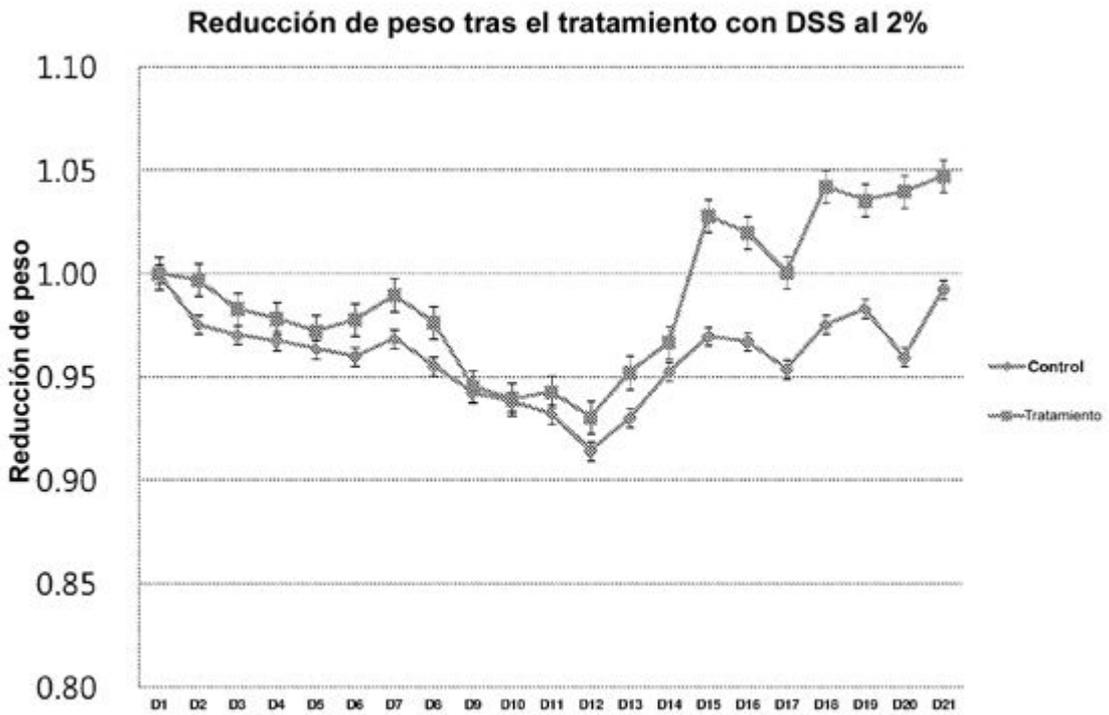


Fig. 72

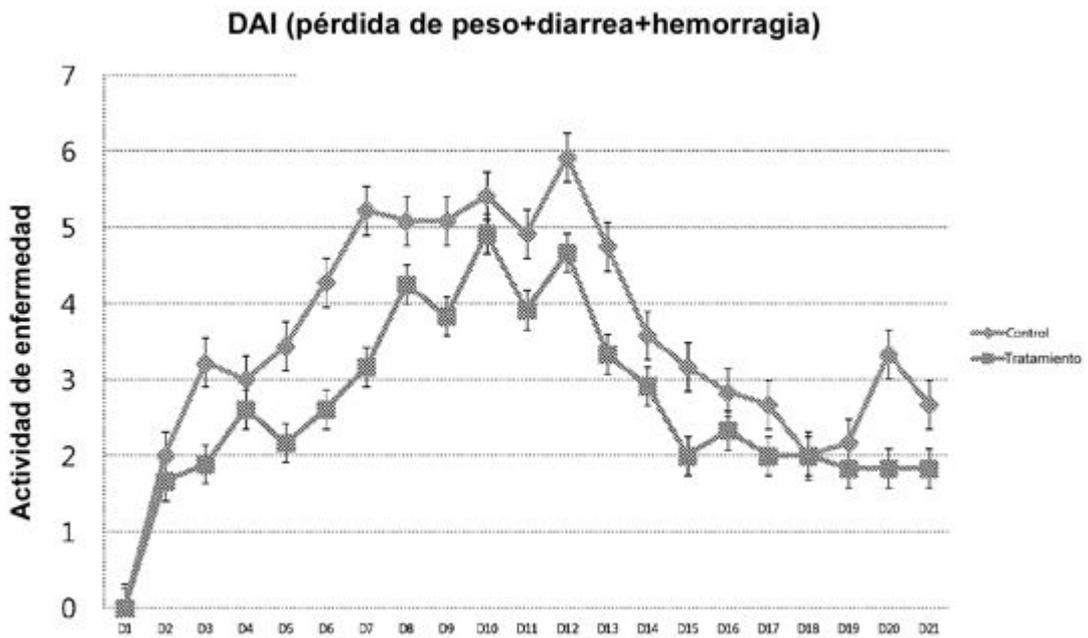


Fig. 73

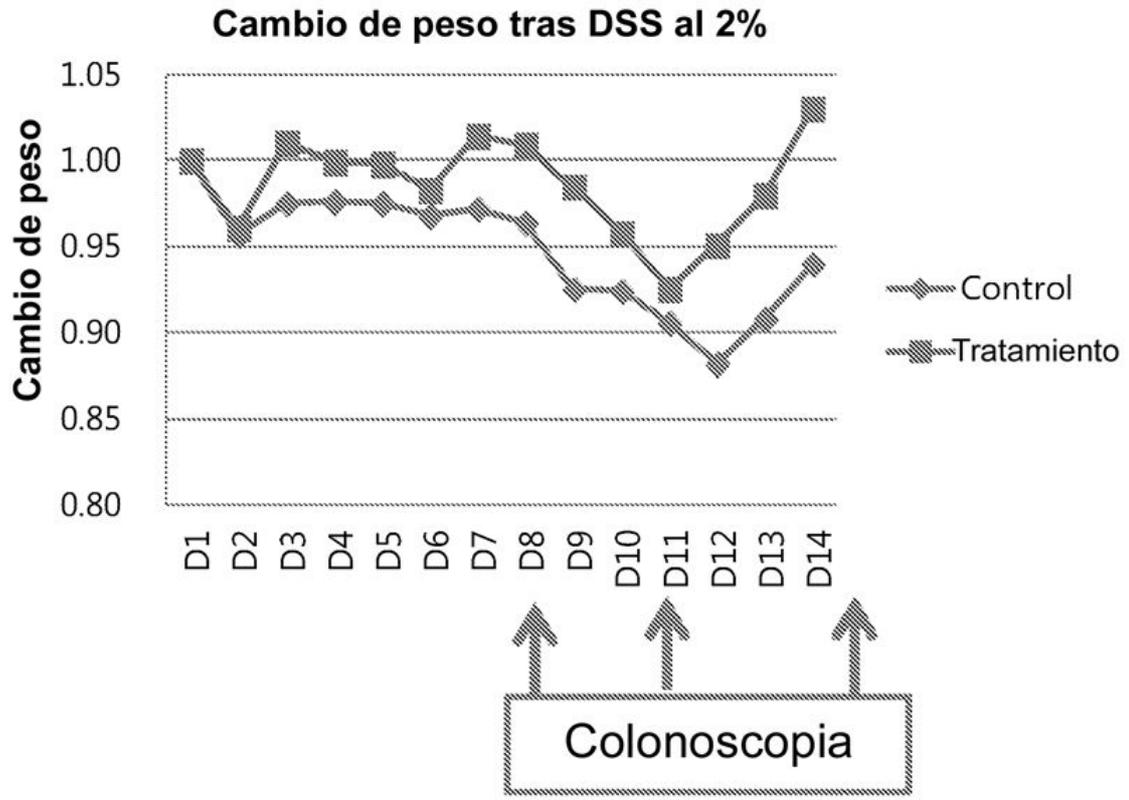
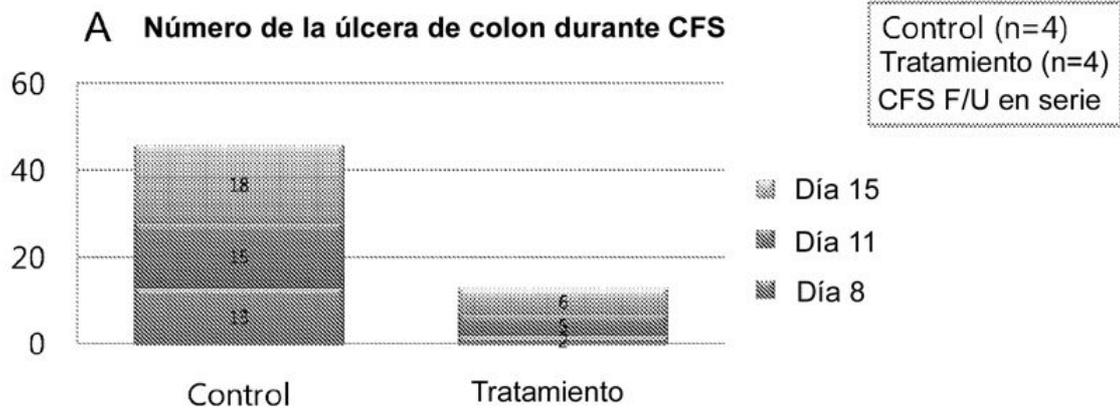
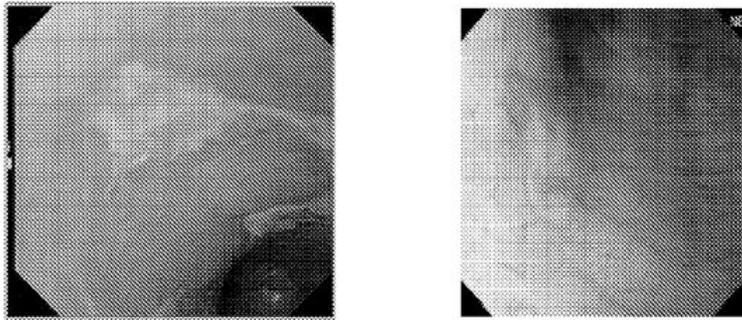


Fig. 74



**B**



Figs. 75A-B

Medición directa de la longitud de úlcera de colon el día 15

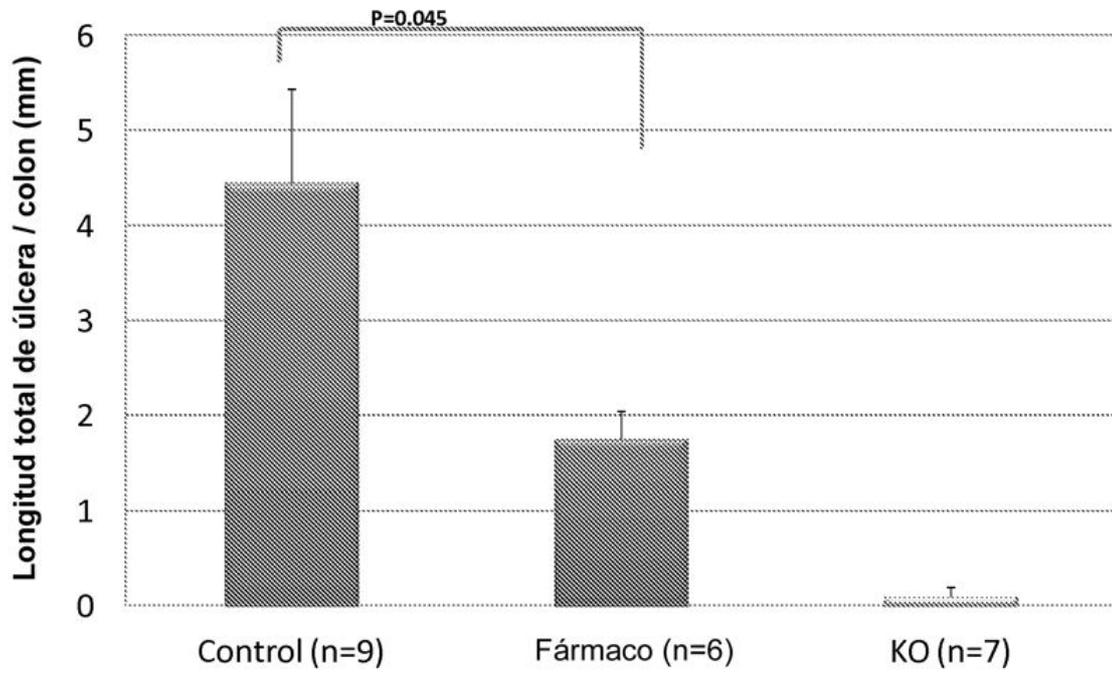
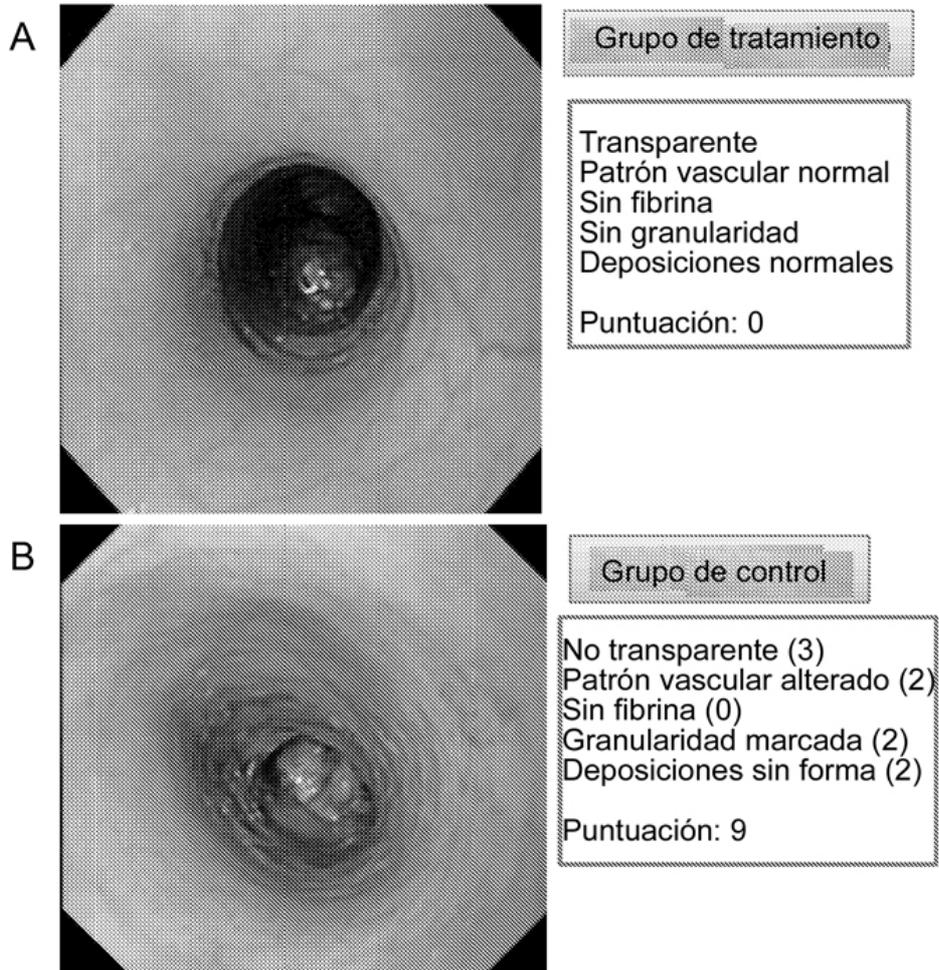


Fig. 76



Figuras 77A-B

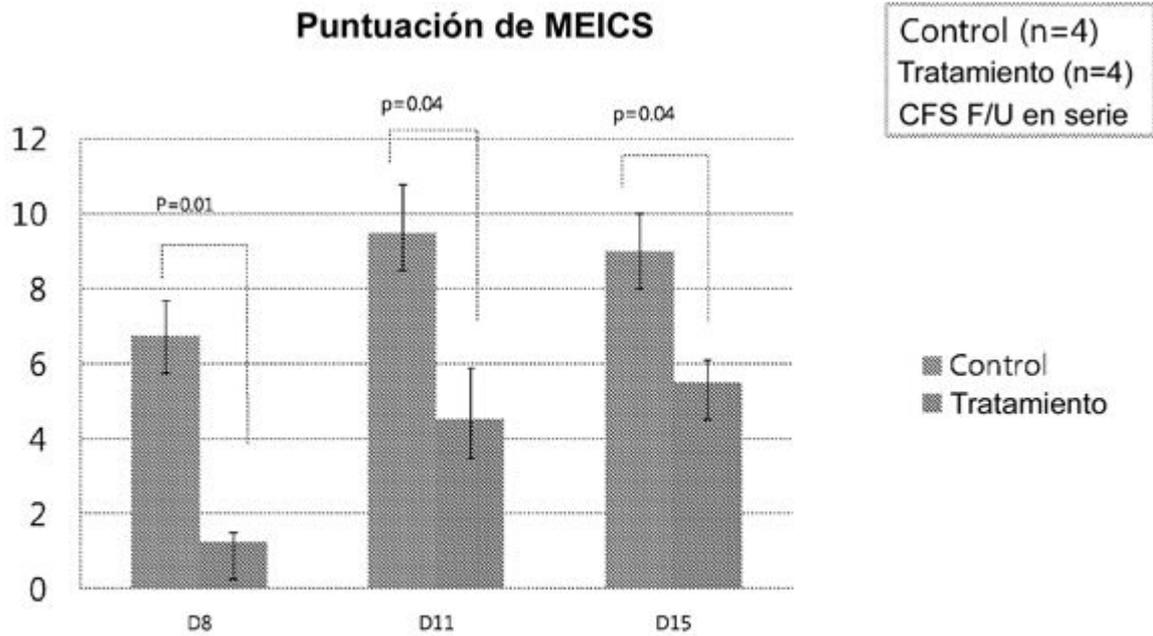


Fig. 78

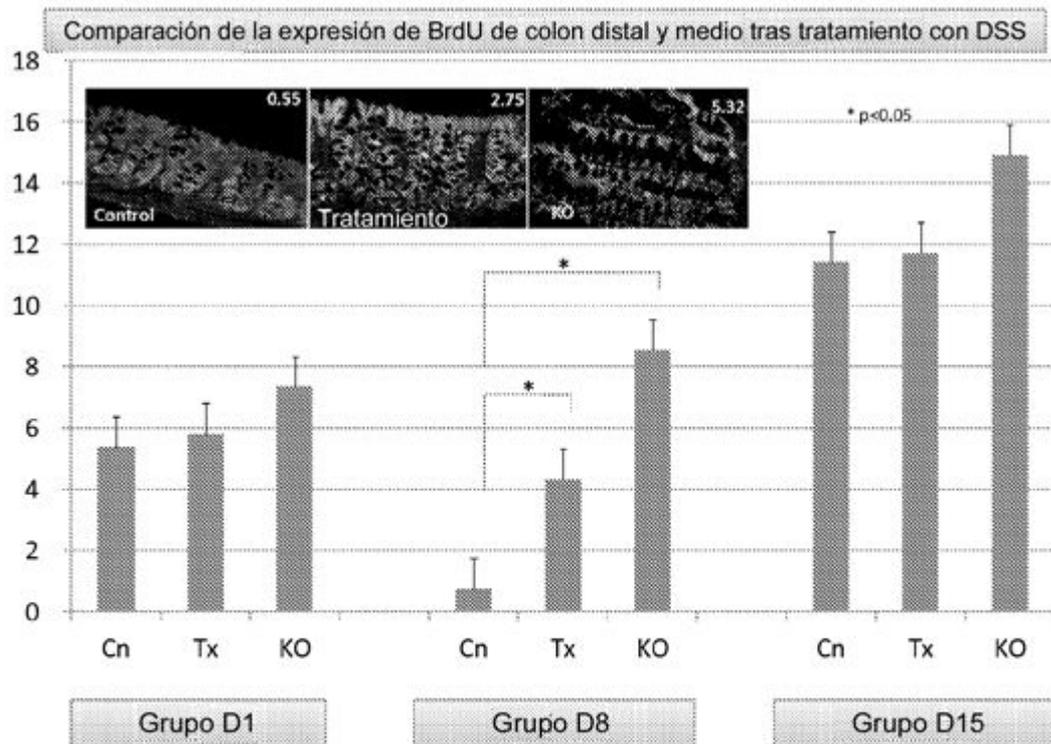


Fig. 79

### Longitud del colon el día 22

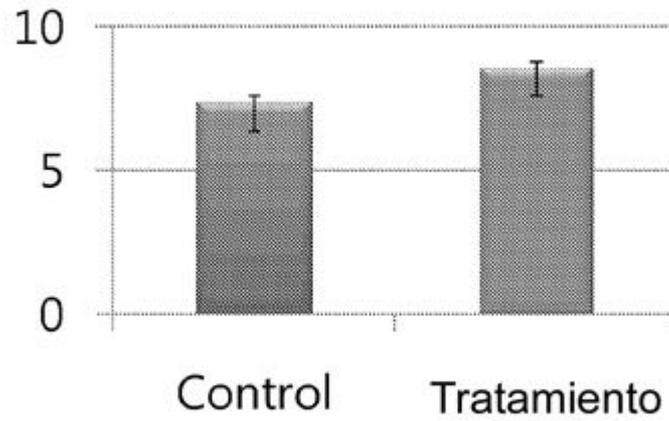


Fig. 80

### Compuestos de UTSW-conjunto 6

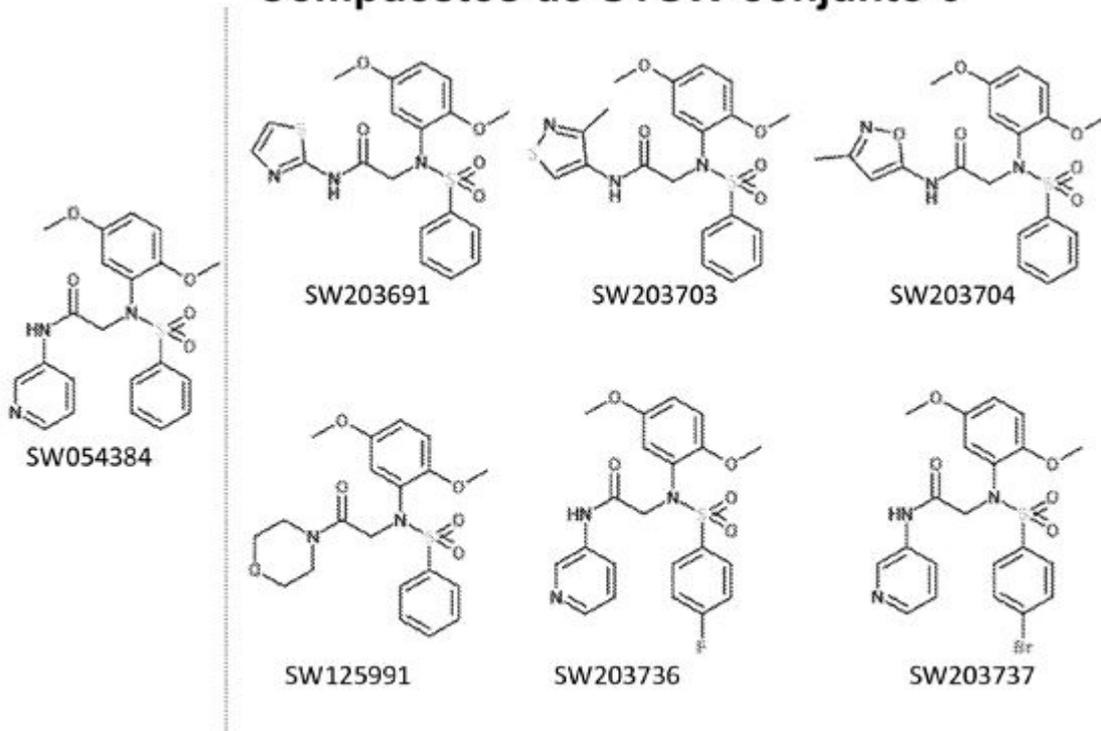
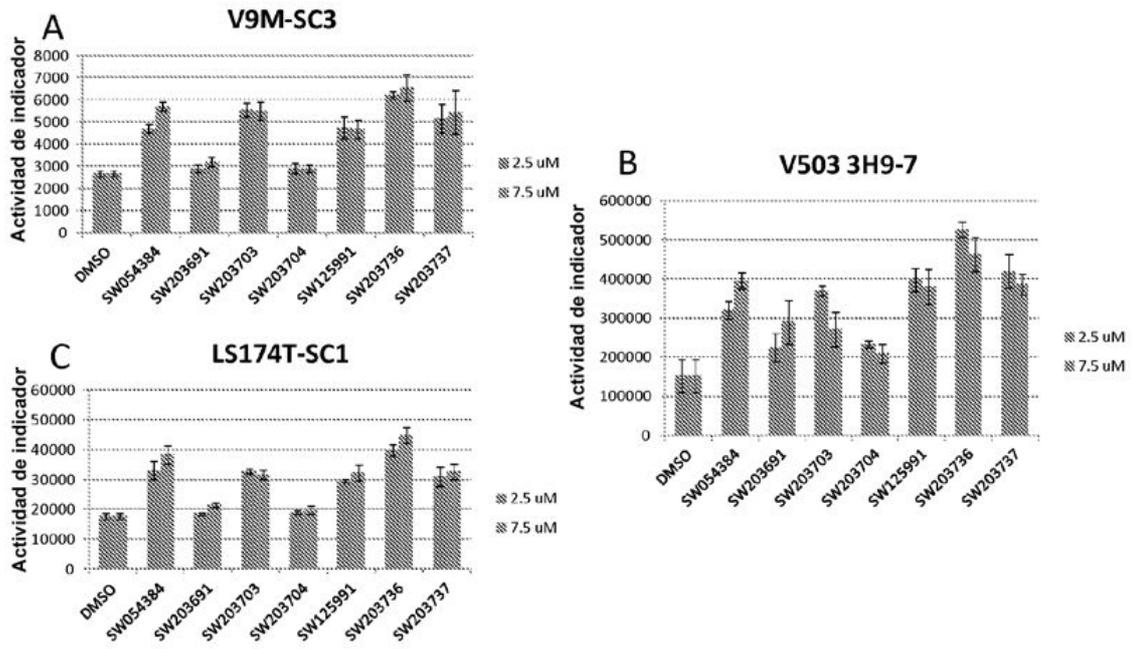


Fig. 81



Figs. 82A-C

**Compuestos de UTSW-conjunto 8: inhibición enzimática**

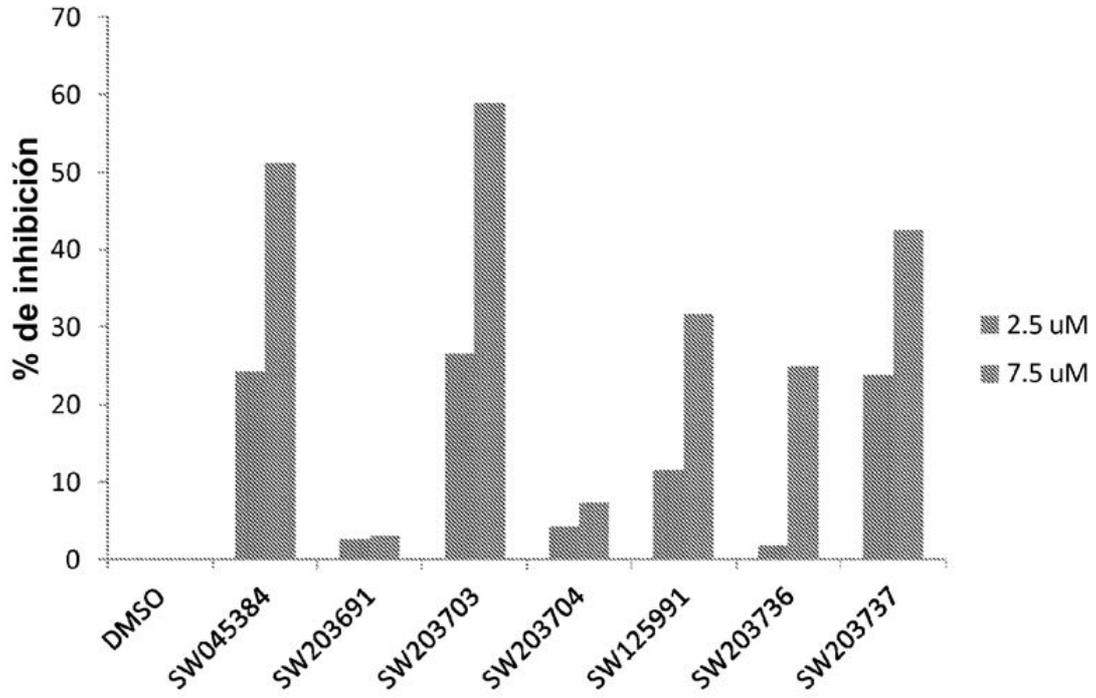
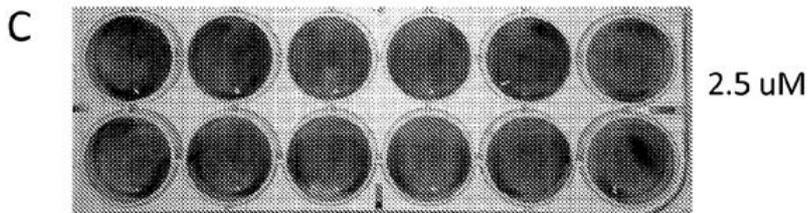
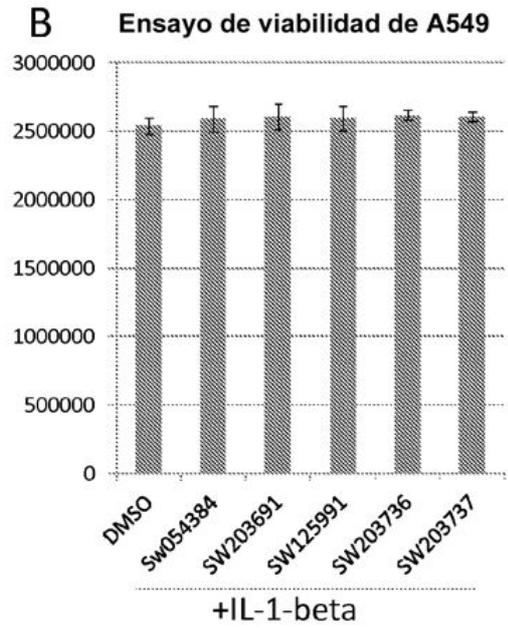
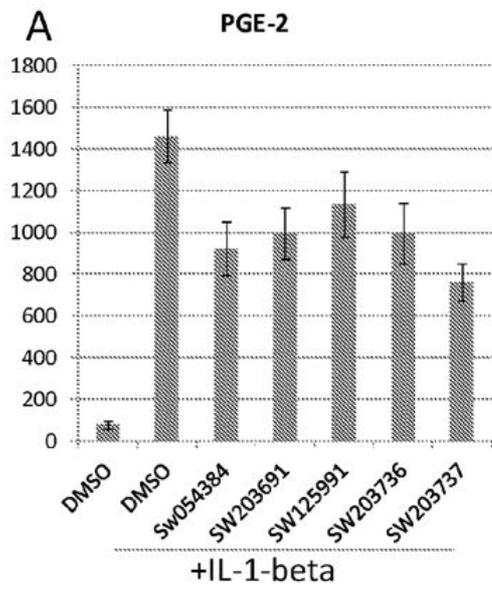


Fig. 83



Figuras 84A-C

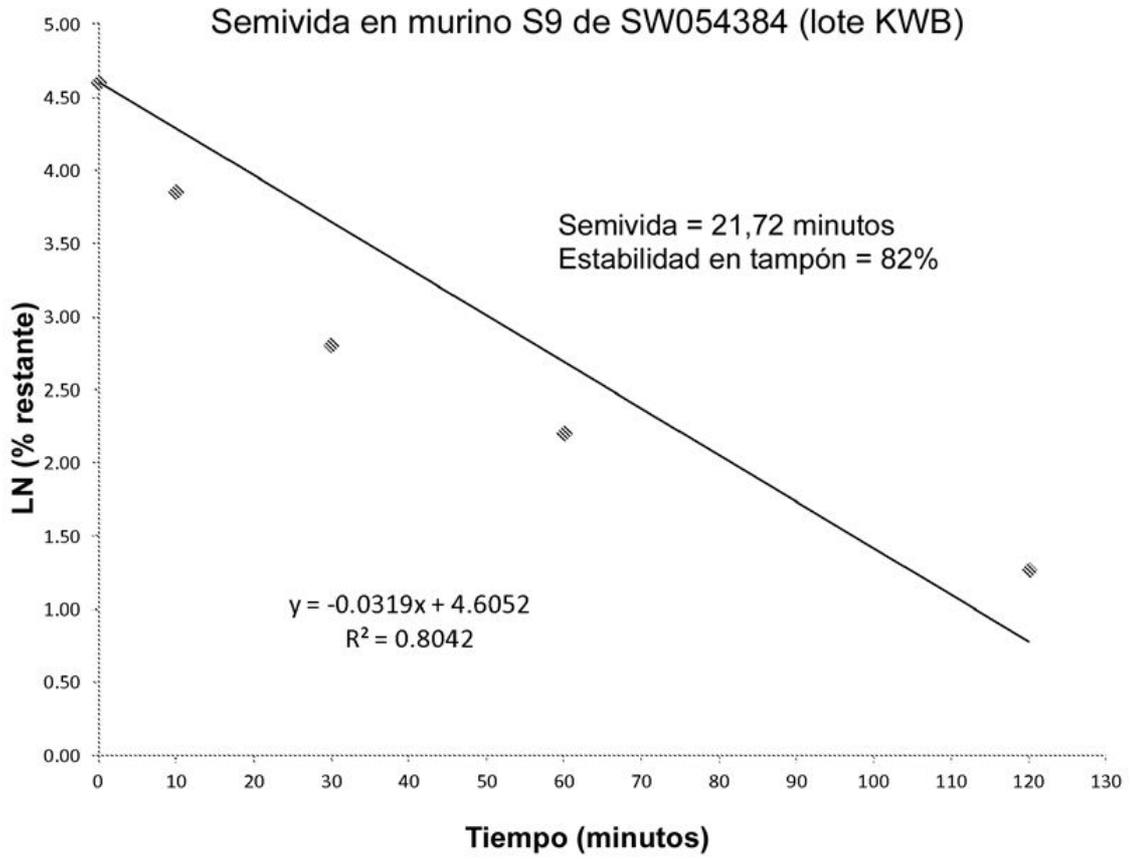


Fig. 85

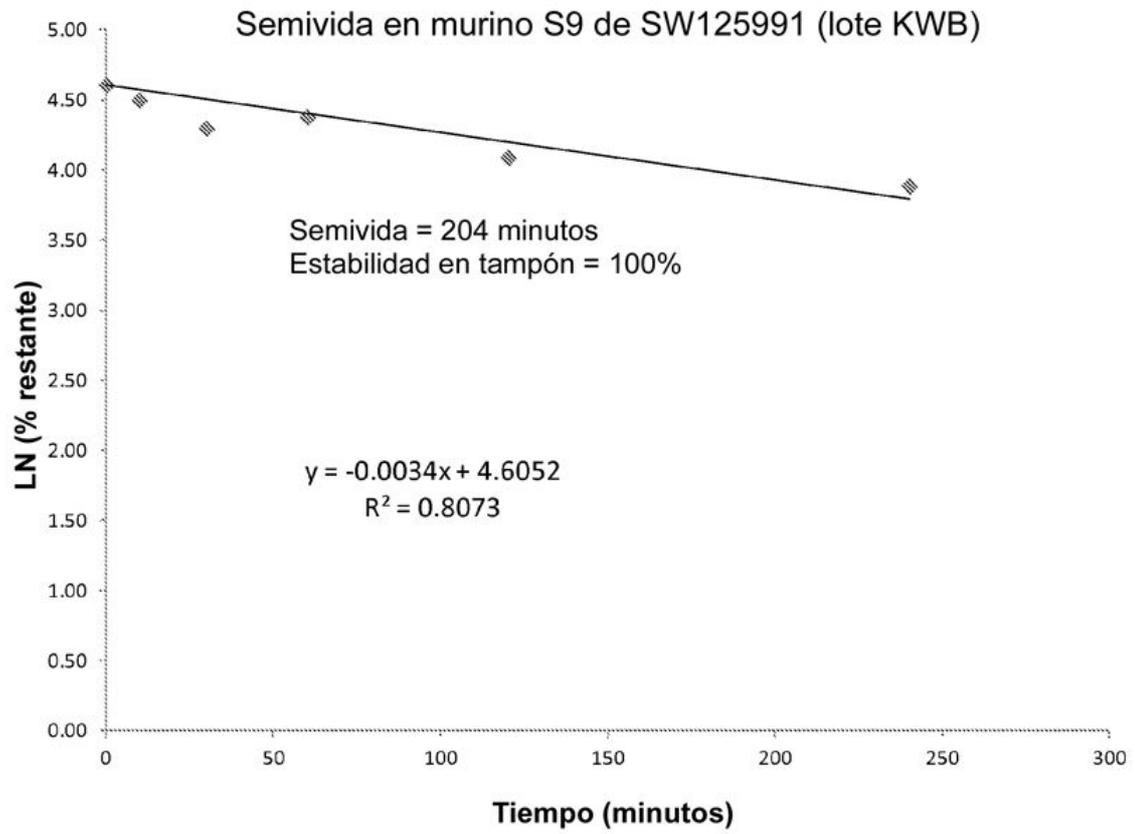


Fig. 86

**Compuestos de UTSW-conjunto 7**

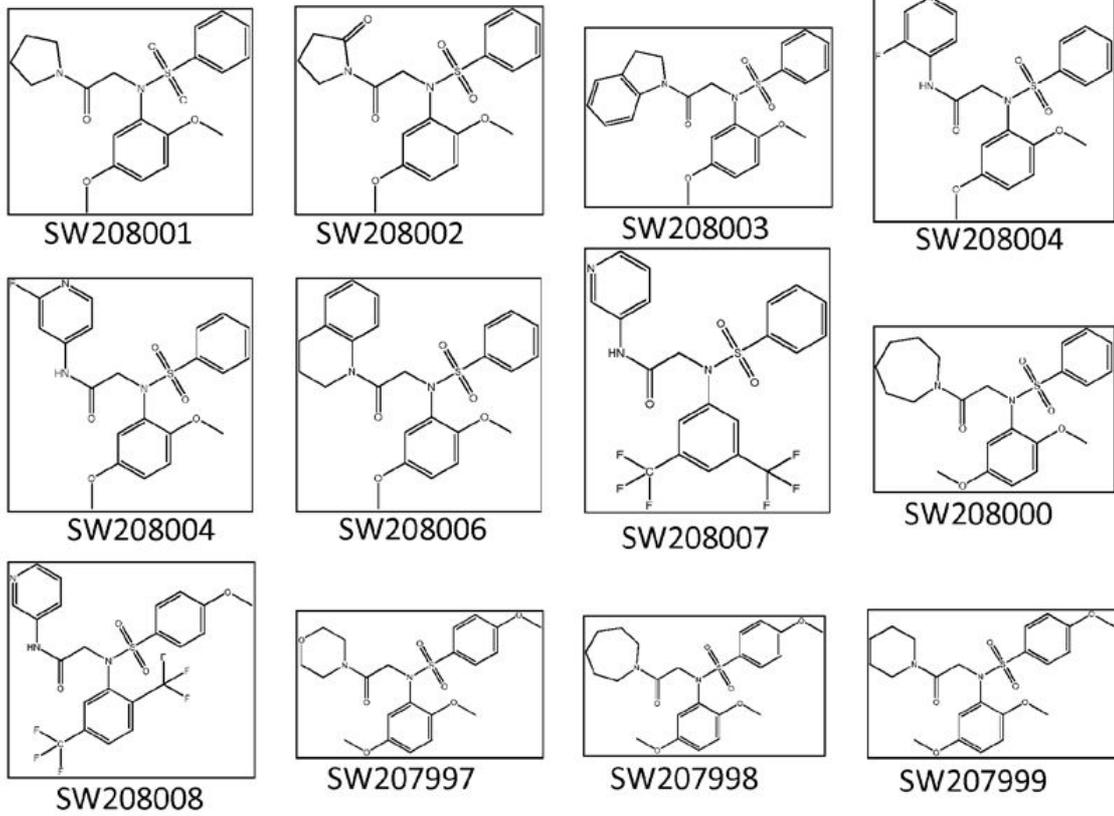


Fig. 87

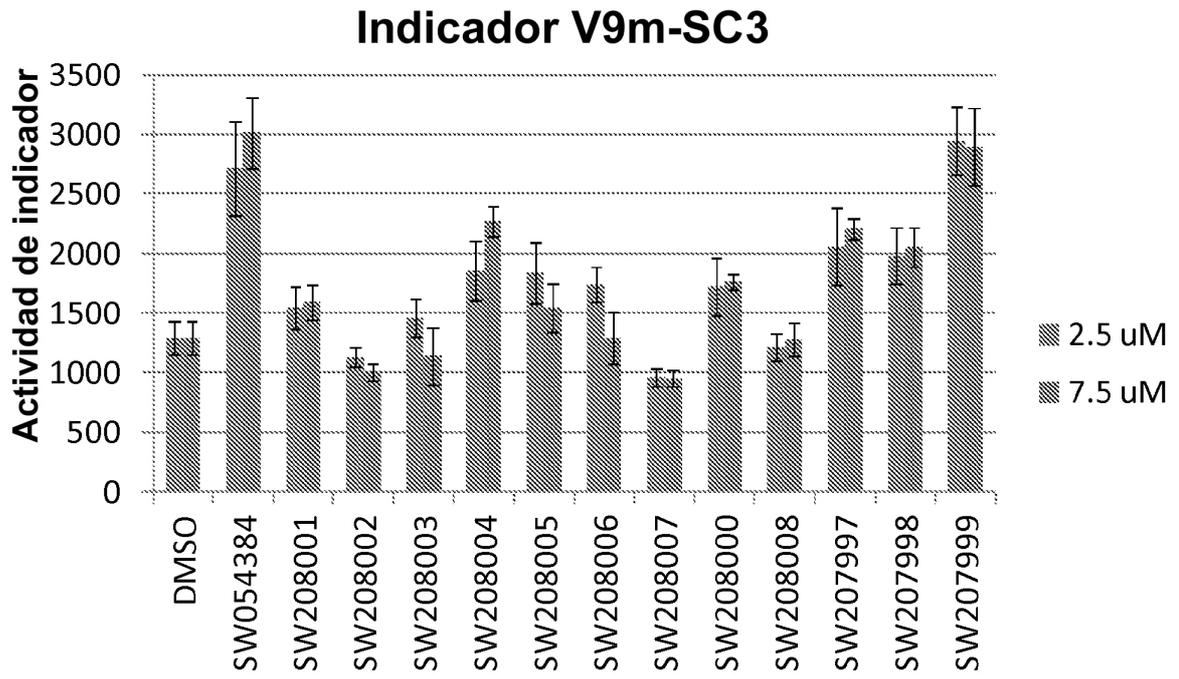


Fig. 88

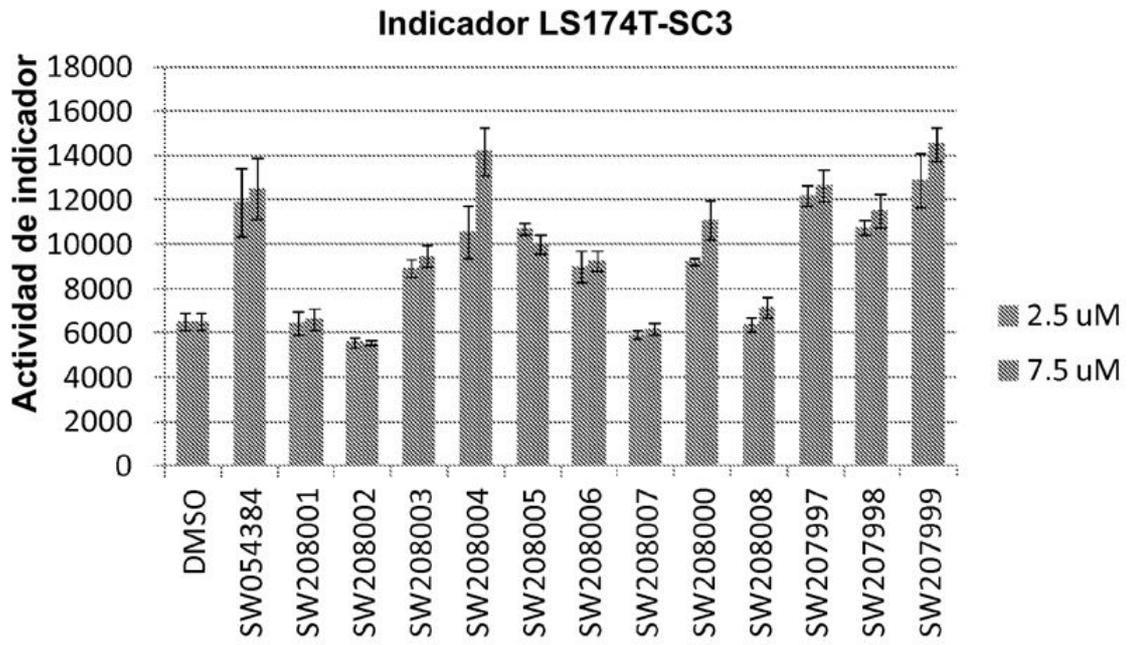


Fig. 89

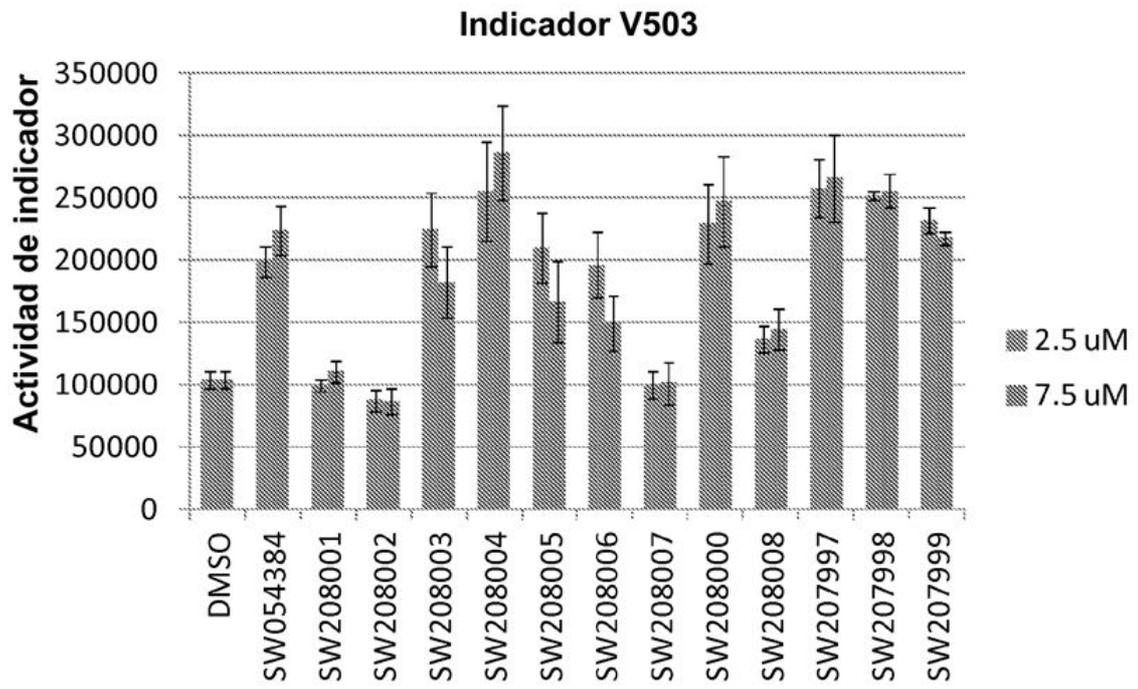


Fig. 90

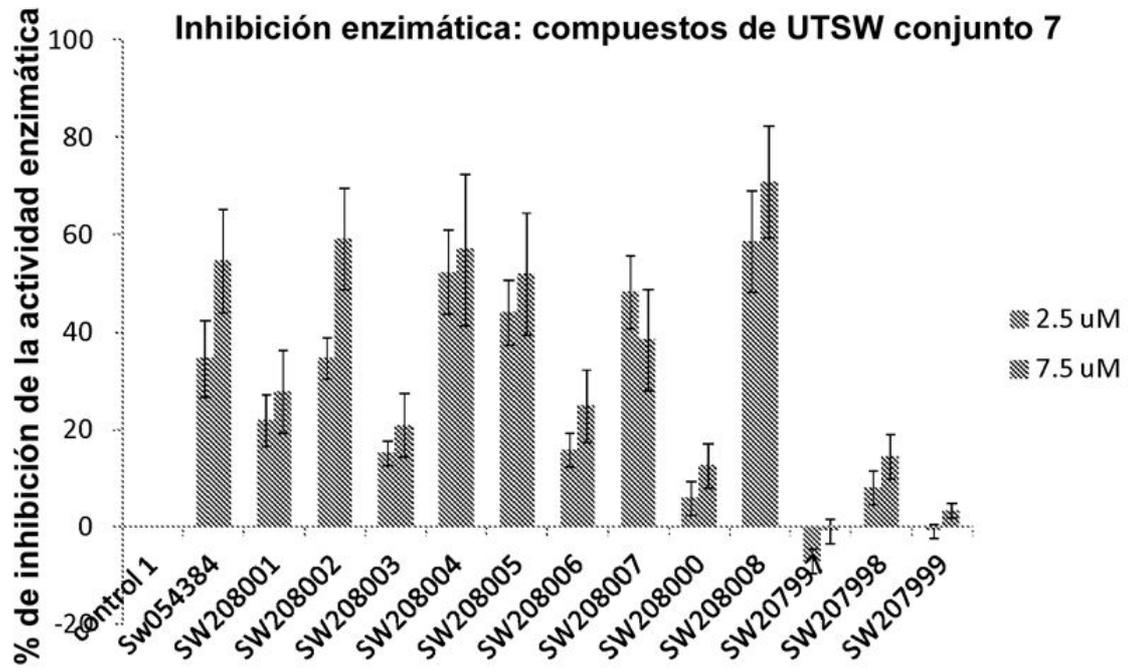


Fig. 91

### Análogos de SW054384

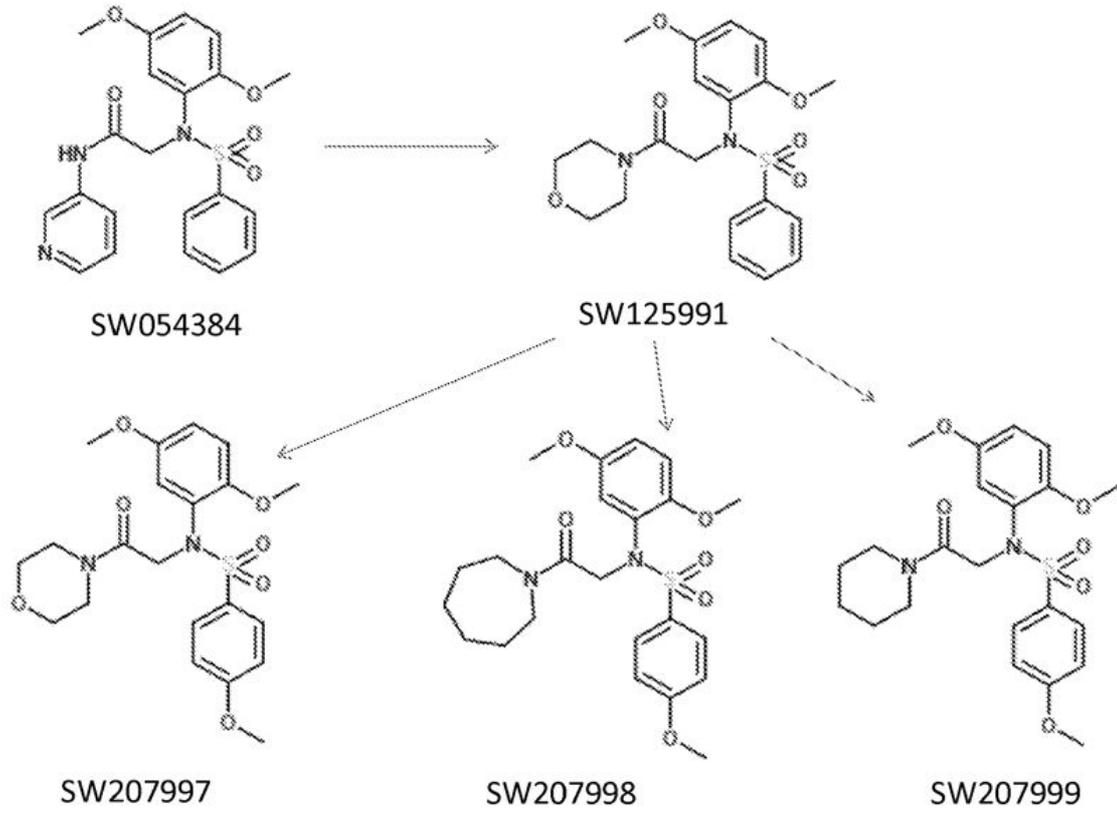


Fig. 92

**Regulación de PGE-2 en células A549 tratadas con IL1- $\beta$**

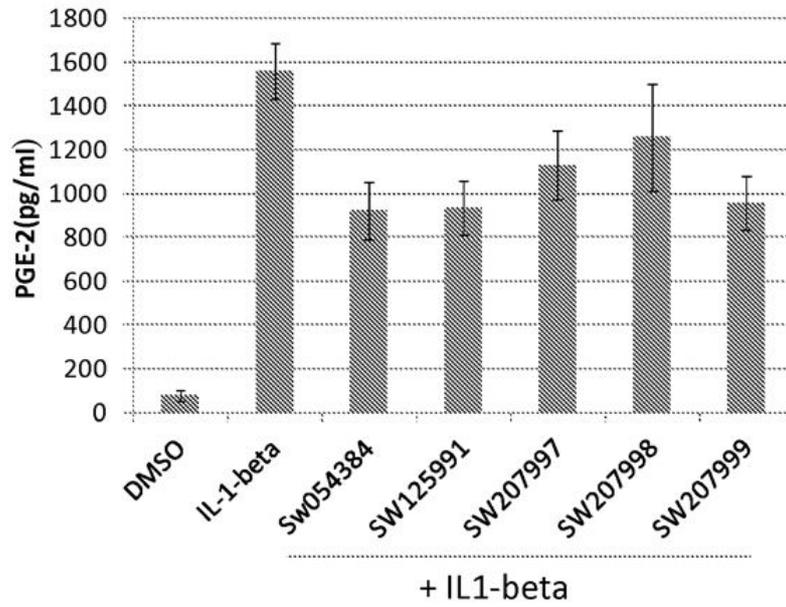


Fig. 93

**Modulación de PG-2 en células A549 estimuladas con IL-1 beta**

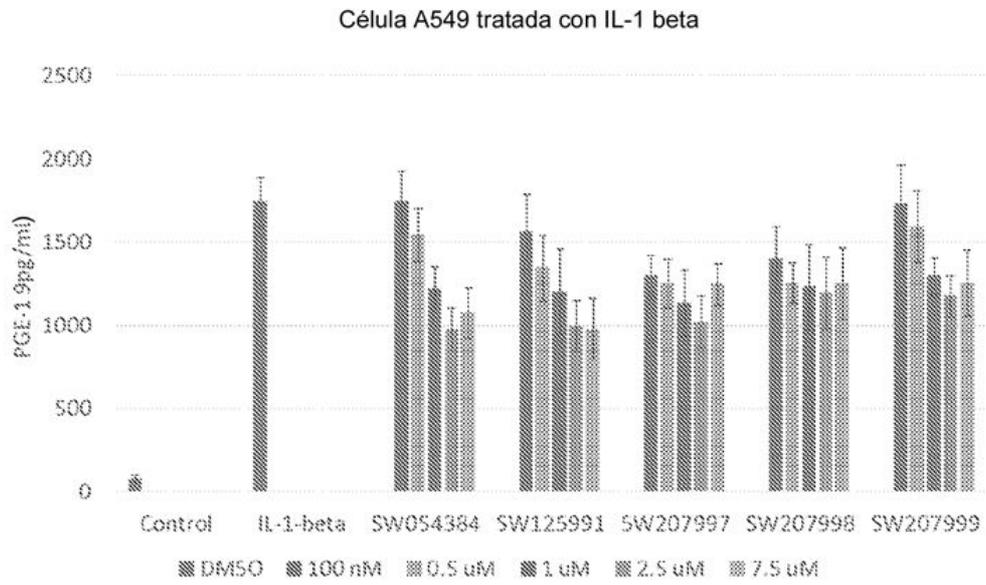


Fig. 94

## Pruebas de SW125991 en ensayos clonogénicos

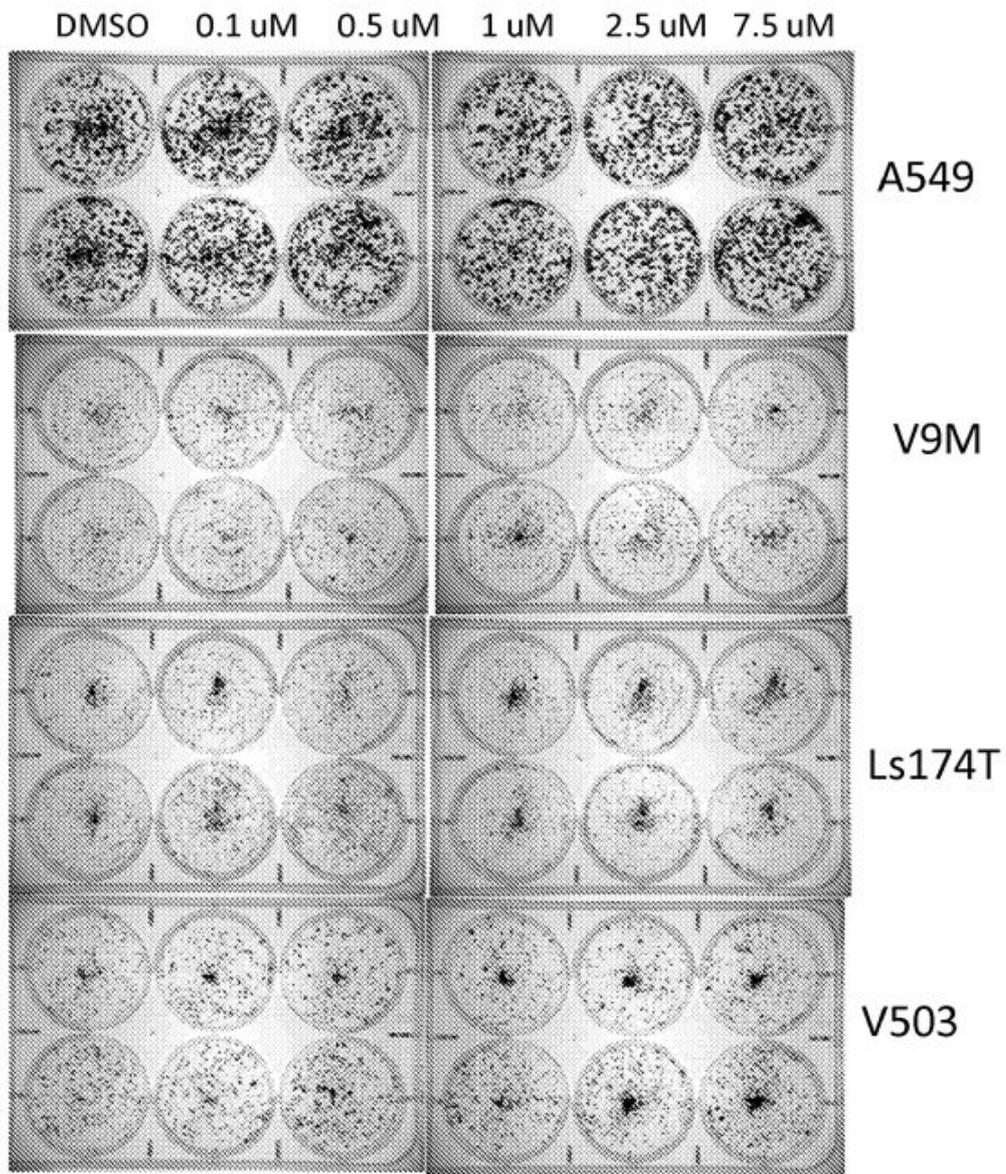


Fig. 95

## Pruebas de SW207997 en ensayos clonogénicos

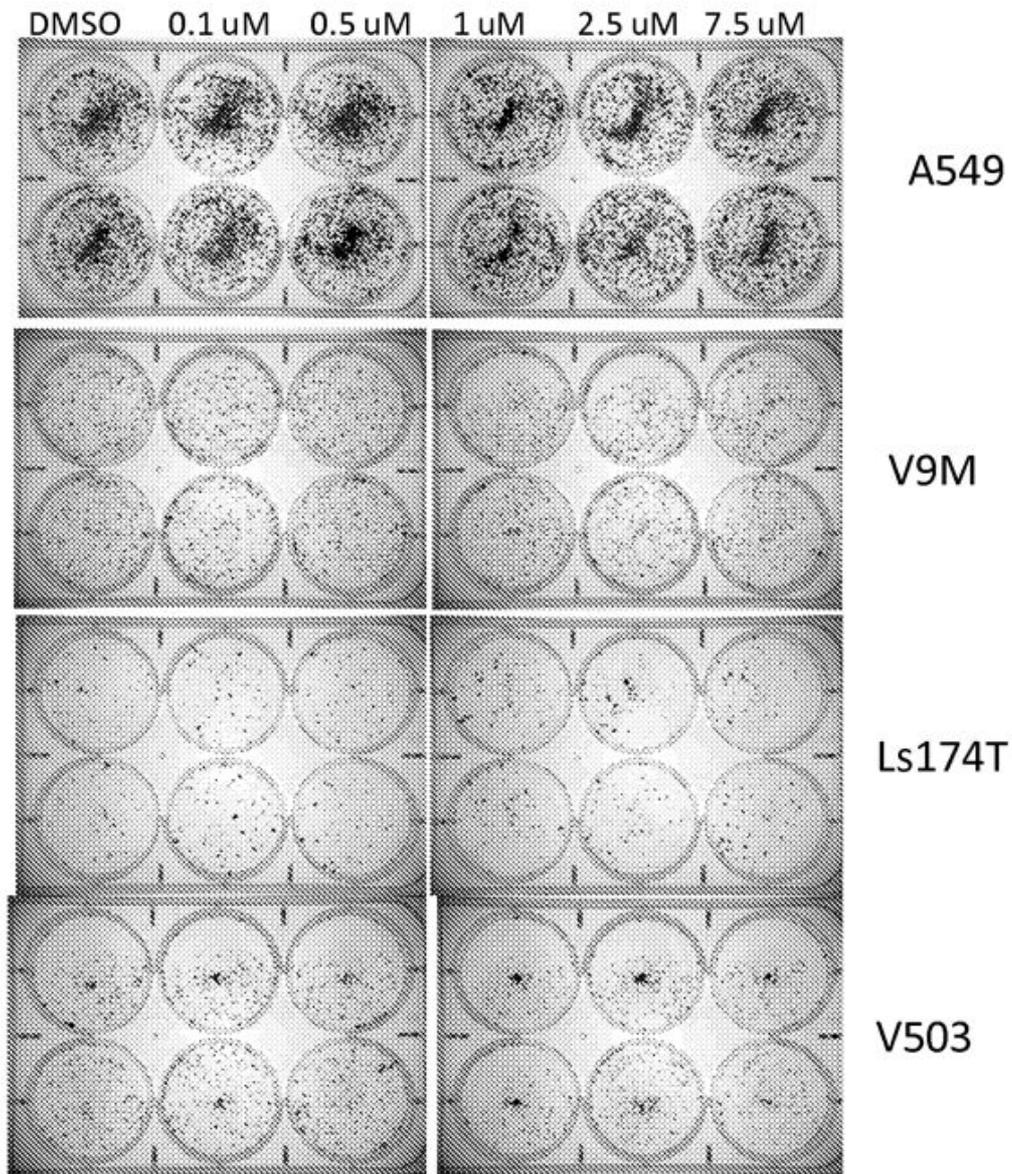


Fig. 96

## Pruebas de SW207998 en ensayos clonogénicos

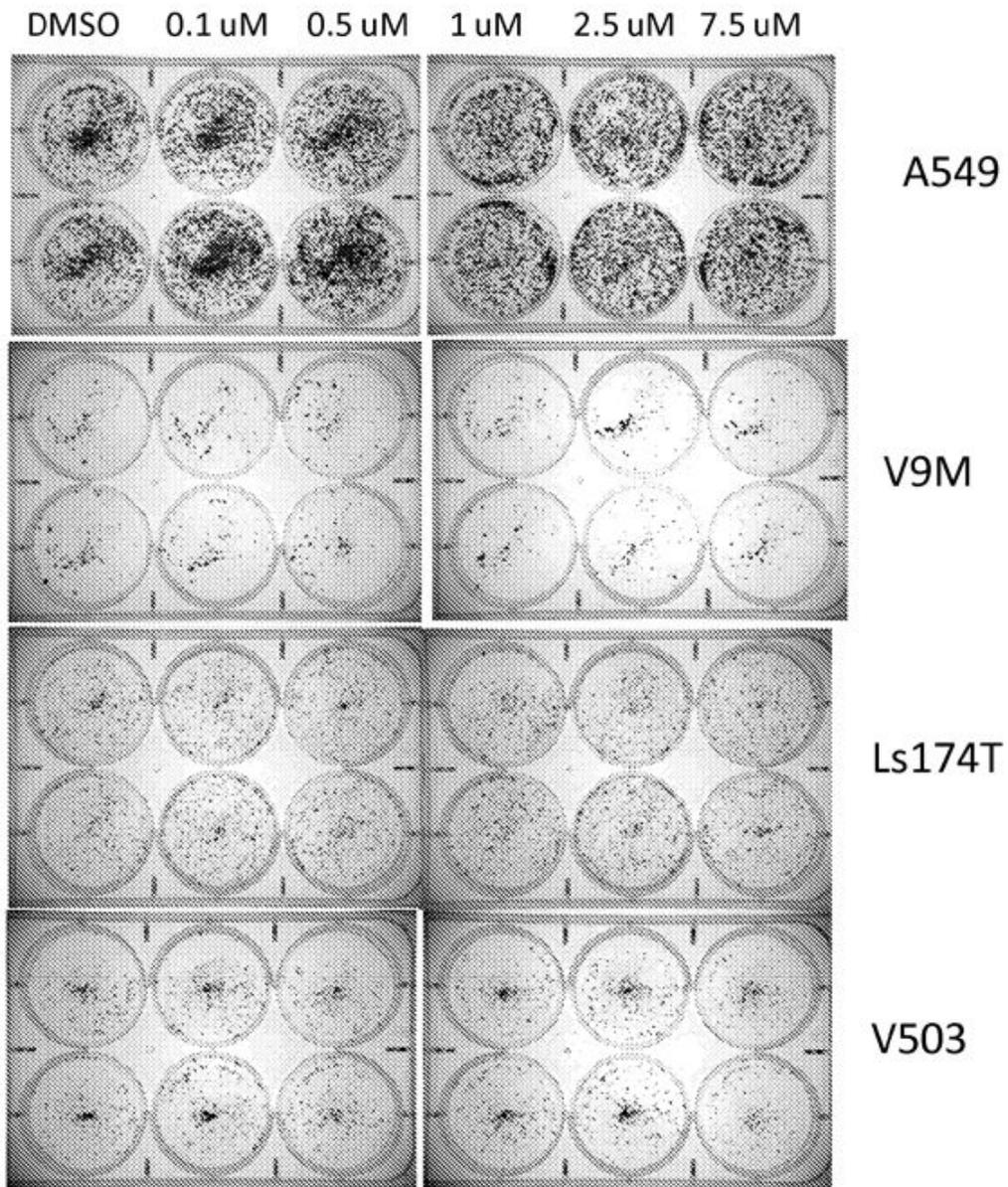


Fig. 97

### Pruebas de SW207999 en ensayos clonogénicos

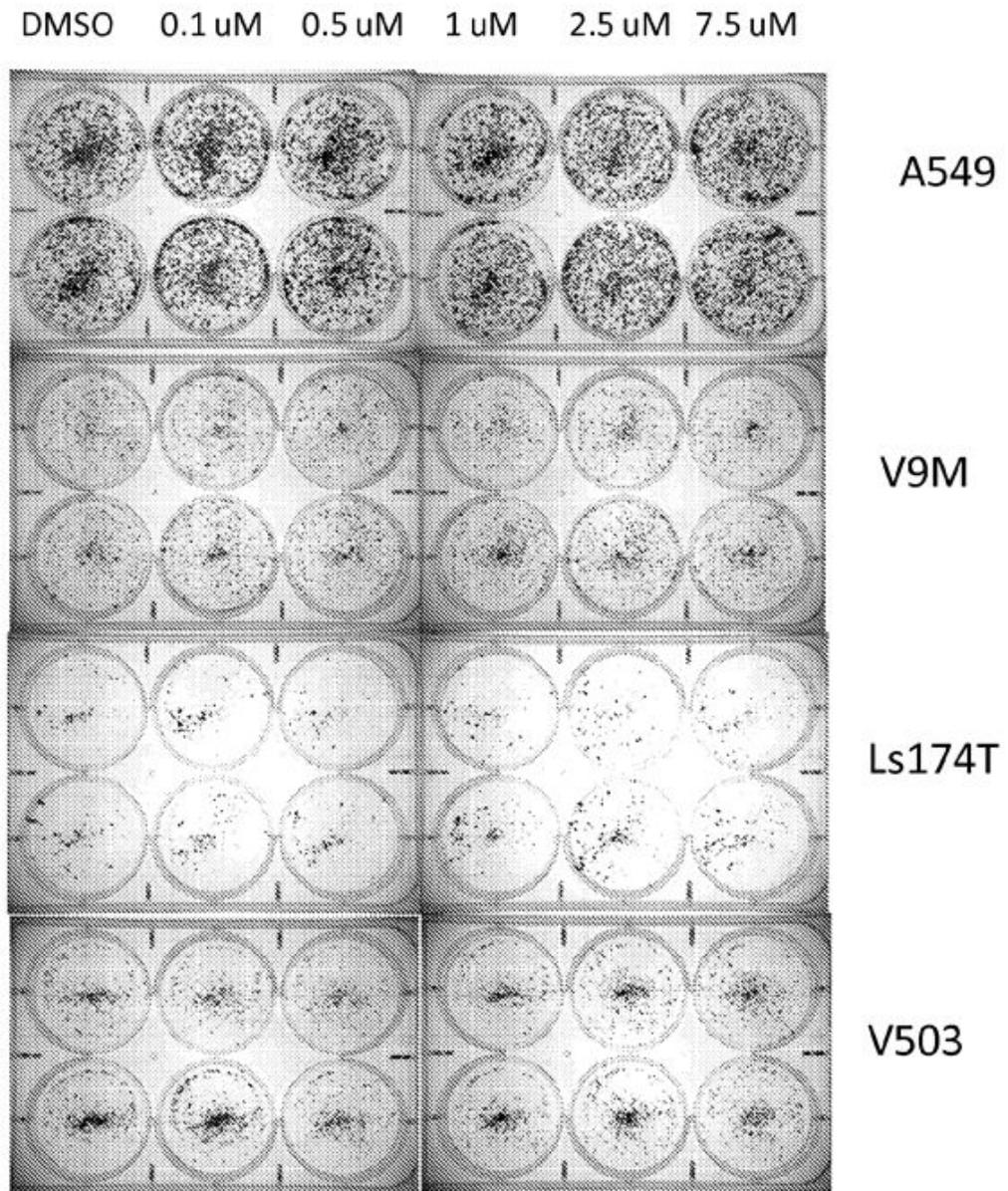


Fig. 98