

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 752**

51 Int. Cl.:

**C07D 263/34** (2006.01)

**A61K 31/421** (2006.01)

**A61P 27/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2013** **E 13192475 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016** **EP 2871181**

54 Título: **Compuestos nuevos para regeneración de células y tejidos terminalmente diferenciados**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.04.2017**

73 Titular/es:  
**ACOUSIA THERAPEUTICS GMBH (100.0%)**  
**Sindelfinger Strasse 3**  
**72070 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:  
**DR. BÖS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

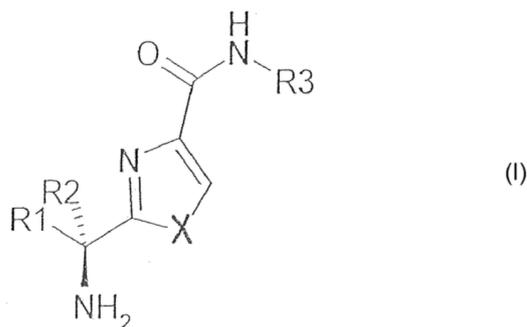
**ES 2 607 752 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Compuestos nuevos para regeneración de células y tejidos terminalmente diferenciados

- 5 [0001] La presente invención se refiere a compuestos nuevos como amidas de ácido carboxílico de oxazol y amidas de ácido carboxílico de tiazol que son útiles en la regeneración de células y tejidos postmitóticos. La presente invención también se refiere a medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos.
- 10 [0002] En mamíferos hay solo un número limitado de órganos y tejidos que tienen la capacidad de regenerarse después de un daño. Los órganos y tejidos con tal capacidad (normalmente limitada) son el hígado, los huesos o la piel.
- 15 [0003] Muchos otros órganos y tejidos mamíferos, por ejemplo, corazón, cerebro, músculo de esqueleto no son capaces de regenerarse después de un daño. La razón es que las células correspondientes en tales órganos y tejidos dejan el ciclo celular irreversible y permanecen en un estado terminalmente diferenciado. Por lo tanto, por ejemplo, un infarto de miocardio (corazón) o un accidente cerebrovascular (cerebro) llevan a un daño irreversible de los tejidos afectados.
- 20 [0004] Además, los epitelios sensoriales del ojo y el oído interno de mamíferos no tienen la capacidad de regeneración después de un daño. En el caso del oído interno tal daño frecuentemente resulta por ejemplo en la dificultad de la audición en seres humanos que está claramente asociada a una reducción en la calidad de vida.
- 25 [0005] En este contexto, se estima que aproximadamente el 10% de la población de las naciones industrializadas se vea afectado por la dificultad de la audición. La gran mayoría de estos casos se pueden atribuir a una pérdida de audición denominada sensorineural que se caracteriza inicialmente por una pérdida de audición de alta frecuencia que afecta a la capacidad para oír y entender el habla. Esta pérdida de audición sensorineural o sordera sensorineural resulta principalmente del daño a células en el oído interno conocidas como células "capilares". Estas células sensoriales muy complejas detectan las vibraciones de sonido que pasan desde fuera, por medio del tímpano y los huesos del oído medio, a la cóclea.
- 30 [0006] Estas células capilares sensoriales se sitúan en el órgano denominado de Corti.
- 35 [0007] Las cuestiones más frecuentes para una pérdida de células capilares sensoriales son la degeneración relacionada con la edad, exposición a ruido, efectos secundarios de medicamentos (ototóxicos), defectos genéticos y otros.
- 40 [0008] Como se descubrió, sorprendentemente, que después de un traumatismo acústico y daño ototóxico, la cóclea aviar es capaz de regenerar células capilares sensoriales de forma espontánea, hubo intentos de aplicar este descubrimiento también a mamíferos, en particular a seres humanos. Esto se hizo basándose en que el mecanismo biológico para la regeneración de células capilares sensoriales en la cóclea aviar que las células de apoyo directamente adyacentes a las células capilares sensoriales destruidas sufren división celular dando como resultado una población de células no diferenciadas que son capaces de rediferenciar células capilares sensoriales recién formadas y células de apoyo.
- 45 [0009] Sin embargo, todos estos intentos respecto a una regeneración de células capilares sensoriales en mamíferos no fueron exitosos, al menos no hasta ahora.
- 50 [0010] Como consecuencia, por el momento la pérdida de audición sensorineural puede (sólo) ser tratada con prótesis auditivas, que amplifican los sonidos a frecuencias programadas para superar una pérdida de audición sensorineural en este rango. También se puede tratar con implantes cocleares que estimulan los nervios de la cóclea directamente.
- 55 [0011] Sin embargo, todavía se realizan esfuerzos para identificar compuestos, en particular compuestos de bajo peso molecular que pueden estimular una regeneración endógena de células y tejidos terminalmente diferenciados en mamíferos. Un grupo de tales compuestos está por ejemplo descrito en WO-A1 2011/095338.
- 60 [0012] Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un grupo nuevo de compuestos que son capaces de estimular la regeneración endógena de células y tejidos postmitóticos, en particular en mamíferos.
- 65 [0013] La presente invención proporciona compuestos nuevos como amidas de ácido carboxílico de oxazol y amidas de ácido carboxílico de tiazol representadas por la fórmula general (I):



donde

- X es O (oxígeno) o S (azufre),
- R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos arilo, grupos alquilarilo, y grupos arilalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada, que opcionalmente contienen heteroátomos,
- R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo C1 - C6, grupos alcoxi C1 - C6, grupos alcoxilalquilo C1 - C6 y grupos alquenilo C2 - C6 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada,
- R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo, grupos cicloalquilo, grupos alquilocicloalquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo, grupos arilalquilo, grupos cicloalquilarilo y grupos arilcicloalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada, que opcionalmente contienen heteroátomos,
- o un estereoisómero, un tautómero o una sal derivada farmacéuticamente aceptable.

[0013] Compuestos de fórmula (I) donde X es O son preferidos.

[0014] En referencia al sustituyente R1 es además preferido según la invención, si R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos heteroarilo, grupos alquilheteroarilo, y grupos heteroarilalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada.,

En particular, en estos casos R1 es un sustituyente seleccionado de grupos indolilo, grupos alquilindolilo, y grupos indolilalquilo.

[0015] Según la presente invención también son preferidos compuestos, donde R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo C1 - C6 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada.

En particular, estos grupos alquilo son grupos alquilo C1 - C3, donde grupos metilo son más preferidos.

[0016] Según la invención también se prefieren compuestos, donde R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo, grupos cicloalquilo, y grupos alquilocicloalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada.,

En particular R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos cicloalquilo insustituídos o sustituidos.

[0017] Conforme a la divulgación anterior los compuestos siguientes son preferidos con la presente invención, es decir compuestos donde

- X es O (oxígeno),
- R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos indolilo, grupos alquilindolilo y grupos indolilalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada,
- R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo C1 - C3 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada, en particular metilo,
- R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos cicloalquilo insustituídos o sustituidos, en particular grupos ciclohexilo.

[0018] El compuesto más preferido según la invención es el compuesto, donde

- X es O (oxígeno),
- R1 es (1 H-indol-3-il)-metilo,
- R2 es metilo,
- R3 es ciclohexilo.

[0019] Todos los compuestos según la invención como se ha mencionado anteriormente se pueden usar como o en un medicamento o composición farmacéutica.

[0020] El uso de los compuestos inventivos para la terapia de un trastorno asociado a tejidos postmitóticos dañados en mamíferos es preferido.

En particular, dichos tejidos son los tejidos del oído interno de mamíferos, donde el trastorno que debe ser tratado es una pérdida de audición del oído interno después de un daño o pérdida de células capilares sensoriales en un órgano de Corti.

5 [0021] Como consecuencia, la invención además proporciona una composición farmacéutica o medicamento que comprende:

- al menos un compuesto inventivo como se reivindica y se define más arriba, y
- un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 [0022] Finalmente, un método para tratar un trastorno en un mamífero en necesidad de tal tratamiento está descrito, donde

- el trastorno comprende un trastorno asociado a tejidos postmitóticos dañados, en particular una pérdida de audición de oído interno después de daño o pérdida de células capilares sensoriales en un órgano de Corti, y
- el método comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto como se reivindica y tal como se ha definido anteriormente.

15

[0023] En particular, el mamífero anteriormente mencionado es un humano.

[0024] Los términos usados en las reivindicaciones y en la descripción anterior se definen de la siguiente manera.

20

[0025] El término "cadena lineal" como se utiliza en este caso, significa una estructura química en forma de una cadena no ramificada de átomos en una molécula sin cadenas laterales unidas.

Preferiblemente dicha cadena (no ramificada) es una cadena abierta.

A diferencia de ello una estructura "ramificada" incluye una o más cadenas laterales fijadas a una cadena de átomos en una molécula.

25

[0026] El término "sustituido", como se utiliza en este caso, significa que uno o más hidrógenos en los grupos correspondientes se sustituye por otro átomo o grupo.

Por ejemplo "alquilo sustituido" se refiere a un grupo alquilo donde uno o más hidrógenos son sustituidos, por ejemplo, por halógeno, hidroxilo, u otros átomos o grupos. "Halógeno" se refiere a flúor, cloro, bromo y yodo.

30

[0027] El término "alquilo" se refiere a grupos hidrocarburo de 1 a 20 átomos de carbono (cadena lineal o ramificada), preferiblemente 1 a 6 átomos de carbono.

En general, aquí los términos C1, C2, C6, C20 y similares se refieren al número de átomos C (átomos de carbono) presentes en los grupos correspondientes.

Grupos alquilo ejemplares incluyen, pero de forma no limitativa, metilo, etilo, propilo (por ejemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por ejemplo, n-butilo, isobutilo, t-butilo), y pentilo (por ejemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo).

35

[0028] El término "cicloalquilo" se refiere a un sistema anular de hidrocarburo cíclico saturado.

Grupos ejemplares incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo, adamantilo y otros.

40

[0029] El término "alquilcicloalquilo" se refiere a un alquilo conectado a un cicloalquilo.

[0030] El término "arilo" se refiere a cualquier grupo funcional o sustituyente derivado de un anillo aromático.

Arilo incluye, pero no está limitado a, fenilo, 1-naftilo, 2-naftilo, tienilo, indolilo y otros.

Como consecuencia, el término "heteroarilo" se refiere a cualquier grupo o sustituyente derivado de un anillo heteroaromático.

Por ejemplo, indolilo es derivado de indol, que es un heteroátomo bicíclico, consistente en un anillo de benceno de seis elementos fusionado a un anillo de pirrol que contiene nitrógeno de cinco elementos.

50

[0031] Los términos "alquilarilo", "arilalquilo", "cicloalquilarilo", y "arilcicloalquilo" se refieren a un alquilo conectado a un arilo, un arilo conectado a un alquilo, un cicloalquilo conectado a un arilo y un arilo conectado a un cicloalquilo, resp..

55

[0032] El término "heteroátomo" debe incluir oxígeno, azufre y nitrógeno.

[0033] El término "alcoxi" se refiere a un grupo alquilo conectado a oxígeno.

Alcoxi incluye, pero no está limitado a, metoxi, etoxi y otros.

El término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alcoxi teniendo (otro) grupo alquilo conectado al oxígeno del grupo alcoxi.

Alcoxialquilo incluye, pero no está limitado a, metoximetilo, etoxietilo y otros.

60

[0034] El término "alquenilo" se refiere a grupos hidrocarburo, teniendo al menos un enlace doble.

65

[0035] La definición de compuestos según la invención incluye todos los "estereoisómeros" posibles y sus mezclas.

En particular, las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados teniendo la actividad específica están incluidos. Las formas racémicas pueden ser resueltas por métodos físicos, tal como, por ejemplo, cristalización, separación o cristalización fraccional de derivados diastereoméricos o separación por cromatografía en columna quirál.

5 Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener a partir de los racematos de los métodos convencionales, tal como, por ejemplo, formación de sal con un ácido ópticamente activo seguido de cristalización.

[0036] El término "tautómeros" se refiere a isómeros constitucionales de los compuestos inventivos que fácilmente se interconvierten por una reacción química llamada tautomerización.

10 Esta reacción comúnmente produce la migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañado por un cambio de un enlace simple y enlace doble adyacente.

[0037] Los compuestos inventivos de fórmula (I) también pueden tener formas de "profármaco".

15 Dado que los profármacos se conocen por mejorar la calidad de los fármacos (por ejemplo, solubilidad, fabricación etc.) los compuestos de la presente invención se pueden entregar en la forma de profármaco. Los "profármacos" se destinan a incluir cualquier portador conectado de manera covalente que libera un fármaco primario activo de la presente invención in vivo cuando tal profármaco se administra a un sujeto mamífero.

20 Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención donde por ejemplo un hidroxilo, amino u otro grupo se conecta con cualquier grupo que, cuando el profármaco es administrado, se divide para formar un hidroxilo libre, amino libre u otro, resp.. Ejemplos de profármacos incluyen, pero de forma no limitativa, acetato, formiato, y benzoato derivados de alcohol y grupos funcionales de amina en los compuestos de la presente invención.

Varias formas de profármacos son bien conocidas en la técnica. En este contexto, según la invención, ésteres de profármaco o péptidos de profármaco se pueden usar como compuestos de profármaco.

25 En casos determinados, acoplado las moléculas de aumento de penetración de las células tal como, por ejemplo, biotina o ácido maleimidopropiónico, opcionalmente por medio de moléculas separadoras adecuadas, al grupo amino primario, o por acilación de este grupo amino, es posible mejorar la biodisponibilidad y por tanto la eficacia de los compuestos según la invención.

[0038] La frase "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto primario se modifica haciendo sales ácidas o básicas del mismo.

30 Ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, sales minerales o de ácido orgánico de grupos básicos tales como aminas; y sales alcalinas y orgánicas de grupos ácidos tales como ácidos carboxílicos.

Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales amónicas cuaternarias formadas, por ejemplo, de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos.

35 Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico, y nítrico; y las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos tales como, acético, propiónico y otros.

[0039] La frase "portador aceptable farmacéuticamente" y la frase "diluyente aceptable farmacéuticamente" se refieren a medios generalmente aceptados en la técnica para la entrega de agentes biológicamente activos a animales, en particular mamíferos.

40 Tales medios son bien conocidos en la técnica.

[0040] La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se destina a incluir una cantidad de un compuesto según la presente invención que es eficaz cuando se administra solo o en combinación.

45 Esta frase está también destinada a incluir una cantidad de una combinación de los compuestos reivindicados que es eficaz para estimular la regeneración endógena de células diferenciadas terminalmente en mamíferos.

Preferiblemente, dicha una combinación de compuestos es una combinación sinérgica.

Tal sinergia ocurre cuando el efecto de los compuestos cuando se administran en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos cuando solo se administra como un agente único.

50 [0041] Los términos "tratando" o "tratamiento", como se utilizan en este caso, cubren el tratamiento de un estado de trastorno en un mamífero, particularmente en un humano, e incluyen

- prevenir que ocurra el estado de trastorno en un mamífero, por ejemplo, dicho mamífero está predispuesto al trastorno, pero no se diagnostica que tenga este trastorno,
- inhibir el estado de trastorno, es decir parando desarrollo adicional, y/o
- aliviar el estado de trastorno, es decir mejorar los síntomas del trastorno.

[0042] Los compuestos reivindicados y la composición farmacéutica/medicamento reivindicado se pueden administrar a un mamífero en formas de dosificación diferentes.

60 Se prefiere una forma de dosificación que permite la administración directa del compuesto a las células dañadas o tejidos, por ejemplo, en la cóclea del mamífero.

Por lo tanto, según una forma de realización de la invención formas de dosificación no orales son preferidas, en particular como inyecciones.

65 En estos casos, la administración sobre o en el oído interno tiene lugar, por ejemplo, transtimpalmente por inyección en el oído medio, por aplicación sobre la ventana redonda u oval del oído interno o por inyección (directa) en el oído interno.

En este contexto, por ejemplo, bombas o dispositivos similares pueden ser empleados.

[0043] También es posible aplicar los compuestos (composición farmacéutica, medicamento) sistémicamente, por ejemplo, en una forma de dosificación oral.

5 Estas formas de dosificación incluyen gránulos, polvos, comprimidos o cápsulas, jarabes, emulsiones, suspensiones etc...

[0044] Todas las formas de dosificación se pueden fabricar por técnicas conocidas de por sí usadas de forma convencional en procedimientos farmacéuticos, por ejemplo, mediante métodos de mezcla, granulación o de

10 estratificación.

Las composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden adicionalmente ser esterilizados.

[0045] La dosificación exacta (cantidad terapéuticamente eficaz) de los compuestos o la composición farmacéutica/medicamento según la invención se pueden seleccionar apropiadamente según el receptor, su edad y peso corporal, estado clínico corriente, tiempo de administración, forma de dosificación, método de administración, el compuesto en realidad empleado y, si fuera apropiado, otros fármacos usados.

15

[0046] Un rango de dosis, preferiblemente un rango de dosis oral, para un receptor adulto se puede seleccionar entre 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal.

20

En el tratamiento de una pérdida de audición del oído interno después de un daño o pérdida de células capilares sensoriales en un órgano de Corti la dosificación puede estar relacionada con la "cantidad de oídos internos tratados" y/o con la "cantidad de administración".

La razón es, que una administración repetida de la composición farmacéutica/compuesto durante un período de tiempo, por ejemplo, entre una cantidad de días y una cantidad de semanas/meses, preferiblemente en intervalos de algunos días (1 a 7 días), es apropiado.

25

En estos casos, la cantidad de compuesto activo empleada, preferiblemente directamente a la cóclea como se describe anteriormente, por ejemplo, vía infusión, debería estar en el rango de 0,5 µg a 1,0 mg por oído interno y administración.

30

Parte Experimental y ejemplos

#### PARTE 1

35 [0047] A continuación, se muestra una vía sintética para suministrar los compuestos nuevos según la invención.

[0048] Según esta vía en el esquema 1 el sustituyente R1 del compuesto de fórmula I es proporcionado vía compuesto 3.

40 [0049] Según el esquema 2 el compuesto 3 (correspondiente al sustituyente R1) se incorpora en el compuesto 5.

Además, según el esquema 2 se introduce alquilo como sustituyente R2 en el compuesto 6.

Después de la división del compuesto 6 (esquema 2), en un número de pasos sintéticos según el esquema 3, la estructura del ácido carboxílico de oxazol (incluyendo sustituyentes R1 y R2) es proporcionada (ver compuesto 11 de esquema 3).

45

[0050] Según el esquema 4 la amida de ácido carboxílico correspondiente es formada vía una reacción con la amina correspondiente (dando el sustituyente R3).

Después de la eliminación del grupo protector de amina BOC del compuesto 12, el compuesto meta 13 es proporcionado.

50

[0051] A pesar del hecho de que la vía sintética se describe en un cierto sentido general para proporcionar una cantidad de compuestos nuevos según la presente invención, el compuesto 13 se muestra como un compuesto específico, es decir como hidrocloreto de (S)-2-(2-amino-1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-N-ciclohexiloxazol-4-carboxamida.

55

[0052] El compuesto 12 se puede modificar en el compuesto 12a según el esquema 5 sustituyendo el hidrógeno H en el heteroátomo N del grupo indolilo, preferiblemente por alquilo (sustituyente R4).

[0053] En referencia a la fórmula I el compuesto 12 y compuesto 13 pueden también ser definidos como compuestos, donde

60

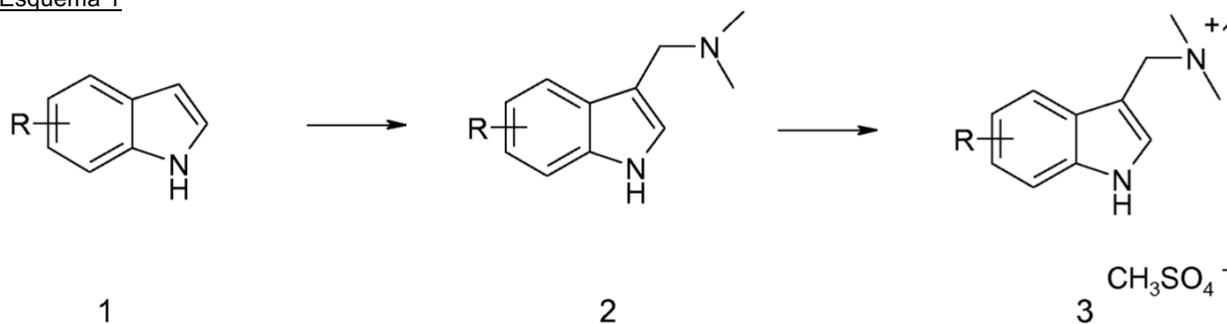
• X es O (oxígeno),

• R1 es (1 H-indol-3-il)-metilo, si fuera aplicable sustituido, en particular en el heteroátomo N del grupo indolilo, preferiblemente por alquilo, preferiblemente por metilo.

• R2 es alquilo, preferiblemente metilo, y

65 • R3 es cicloalquilo, preferiblemente ciclohexilo.

## Esquema 1



• 3-Dimetilaminometilindoles **2**: a una mezcla de formalina (37% en agua, 0,61mL, 8,14mmol), se añadió 1,4-dioxano, y AcOH (7mL) Me<sub>2</sub>NH (40% en agua, 1,03mL, 8,14mmol) a 0 °C.

5 Una solución de indol **1** (7,40 mmol) en 1,4-dioxano (7mL) fue añadida a 0 °C gradualmente.

Después de agitación a 0 °C durante 2 h y a temperatura ambiente durante 18 h, agua (9mL), carbón (0,43g), y celita (0,43g) fueron añadidas y la mezcla reactiva fue filtrada a través de una almohadilla de celita.

El pH del filtrado fue ajustado a 12 por 2N NaOH en agua.

Filtración, lavado (agua), y secado del precipitado dio **2**.

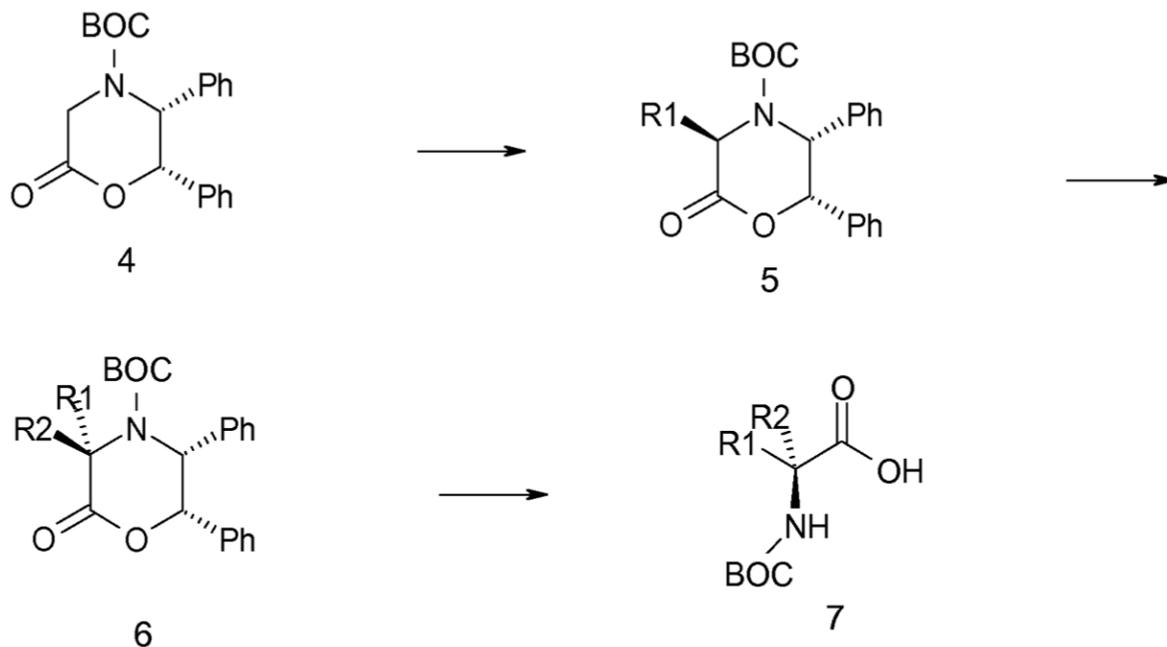
10 Rendimiento aprox 90%

[0054] Indol-3-il-metil-trimetilamonio metilsulfato **3**: a una solución de dimetilsulfato (3,94g; 31,2mmol) y AcOH (89 µL, 1,56 mmol) en THF (tetrahidrofurano) (4mL) una solución de **2** (1,20g; 6,24mmol) y AcOH (89 µL, 1,56 mmol) en THF (10mL) fueron añadidos gota a gota a 10-15 °C.

15 Después de agitación a 0 °C durante 1 h, los precipitados fueron filtrados, lavados con Et<sub>2</sub>O (éter dietílico), y posteriormente con DCM (diclorometano) para dar **3**.

Rendimiento: 95-98%.

## Esquema 2



[0055] Alquilación de **4**: a una solución de (2S,3R)-(+)-N-Boc-6-oxo-2,3-difenilmorfolina **4** (500 mg, 1,42 mmol) en THF (30mL) una solución de LDA (diisopropilamida de litio) (1,0 M en THF, 2,9 mL, 2,97mmol) fue añadida a -78 °C gota a gota.

25 Boc o BOC se refiere al grupo protector de amina terc-butiloxicarbonilo.

Después de agitación a -78 °C durante 30 min, una solución de Li<sub>2</sub>CuCl<sub>4</sub> (0,1 M en THF, 1,41mL, 0,141 mmol) fue añadida gota a gota seguido de una adición lenta de una suspensión de **3** (1,56mmol) en THF (20mL).

Después de agitación a -78 °C durante 1 h, la mezcla reactiva fue dejada alcanzar la temperatura ambiente (30 min) y luego se añadió solución saturada (sat.) de NH<sub>4</sub>Cl en agua.

30 Examen extractivo (EtOAc (acetato de etilo), agua, salmuera) y concentración de los extractos de EtOAc seguido de cromatografía en columna dio el compuesto **5**, ejemplificado por

(3R,5R,6S)-terc-butil-3-((1H-indol-3-il)-metil)-2-oxo-5,6-difenilmorfolina-4-carboxilato, rendimiento: 75%

(3R,5R,6S)-terc-butil-3-((7-fluoro-1 H-indol-3-il)-metil)-2-oxo-5,6-difenilmorfolina-4-carboxilato, rendimiento: 71%

5 (3R,5R,6S)-terc-butil-3-((7-metil-1 H-indol-3-il)-metil)-2-oxo-5,6-difenilmorfolina-4-carboxilato, rendimiento: 41%

Alquilación de **5**: a una solución de **5** (1,24mmol) en THF (6mL) una solución de LDA (1,0 M en THF, 2,5 mL, 250mmol) fue añadida a -78 °C gota a gota.

Después de agitación a -78 °C durante 30 min, una solución de alquilyoduro (1,36mmol) fue añadida en THF (2 mL). Después de agitación a -78 °C durante 2 h, la mezcla reactiva fue dejada alcanzar la temperatura ambiente (30 min) y luego solución sat. de NH<sub>4</sub>Cl en agua fue añadida.

Examen extractivo, (EtOAc, agua, salmuera) y concentración de los extractos de EtOAc seguido de cromatografía en columna dio **6**, ejemplificado por

15 (3S,5R,6S)-terc-butil-3-((1H-indol-3-il)metil)-3-metil-2-oxo-5,6-difenilmorfolina-4-carboxilato, rendimiento: 62%

División de auxiliar quiral: litio (164mg; 23,7mmol) se añadió a amoníaco líquido (aprox. 25 mL) a -78 °C en una porción.

Después de agitación a -78 °C durante 30 min, t-BuOH (450µL; 4,74mmol) y una solución de **6** (0,795 mmol) en THF (5mL) fueron añadidos gota a gota.

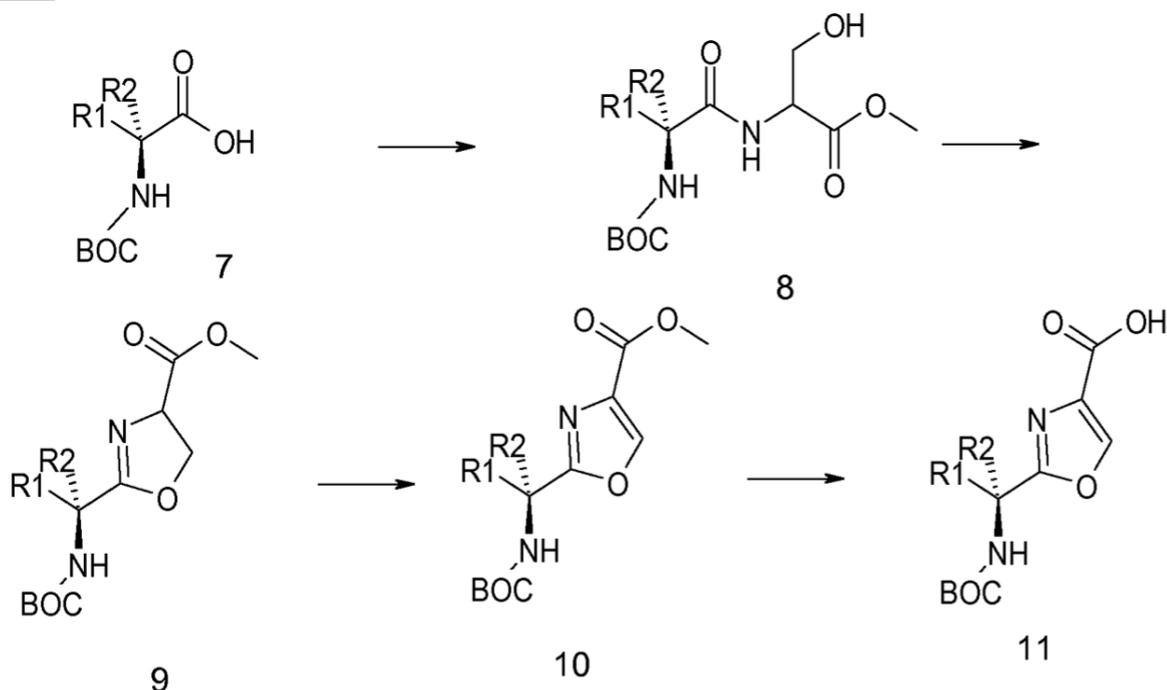
La mezcla reactiva se agitó a -78 °C durante 25 min, luego extinguida con NH<sub>4</sub>Cl (2,26g, 42,3mmol).

Un baño de enfriamiento fue quitado y amoníaco fue dejado vaporizar.

Examen extractivo (EtOAc, 10 % de ácido cítrico en agua, salmuera) y concentración de los extractos de EtOAc seguido de cromatografía en columna dio **7**, ejemplificado por

25 ácido (S)-2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(1H-indol-3-il)-2-metilpropanoico, rendimiento: 86%

### Esquema 3



30 [0056] A una solución de **7** (0,29mmol) e hidrocloreto de (S)-metil-2-amino-3-hidroxiopropanoato (68mg; 0.44mmol) en DMF (dimetilformamida) (5mL) y DCM (4mL), hidrocloreto de EDC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) (61 mg, 0.32mmol), HOBt (hidroxibenzotriazol) (43mg 0.32mmol), y NMM (N-metilmorfolina) (112µL; 1.01mmol) fueron añadidos sucesivamente a 0 °C.

35 La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2h.

Examen extractivo, (EtOAc, sat. NaHCO<sub>3</sub> en agua, NH<sub>4</sub>Cl sat. en agua, agua, salmuera) y concentración de los extractos de EtOAc seguido de cromatografía en columna dio **8**, ejemplificado por

(S)-Metil-2-((S)-2-metil-2-(terc-butoxicarbonilamino)-3-(1H-indol-3-il)propanamido)-3-hidroxiopropanoato, rendimiento: 72%

40 Síntesis de oxazolinas: a una solución de **8** (0,26mmol) en DCM (3mL) se añadió DAST (trifluoruro de dietilaminoazufre) (38µL; 0.286mmol) a -78 °C gota a gota.

Después de agitar a  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2h,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (54mg; 0,39mmol) fue añadido en una porción.

La mezcla reactiva fue dejada alcanzar la temperatura ambiente (2 h) y luego se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. Examen extractivo, (DCM,  $\text{NaHCO}_3$  sat. en agua, salmuera) y concentración de los extractos de DCM dieron los compuestos **9** que se usan en el siguiente paso sin purificación adicional.

5 [0057] Síntesis de oxazoles: a una solución de **9** (0,247mmol) en DCM (5mL) DBU (1,8-Diazabicycloundec-7-eno) se añadió a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Después de agitación a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, a la mezcla se añadió  $\text{CBrCl}_3$  (59 $\mu\text{L}$ ; 0,60mmol) y la mezcla se agitó durante 18 h permitiendo calentar gradualmente hasta temperatura ambiente.

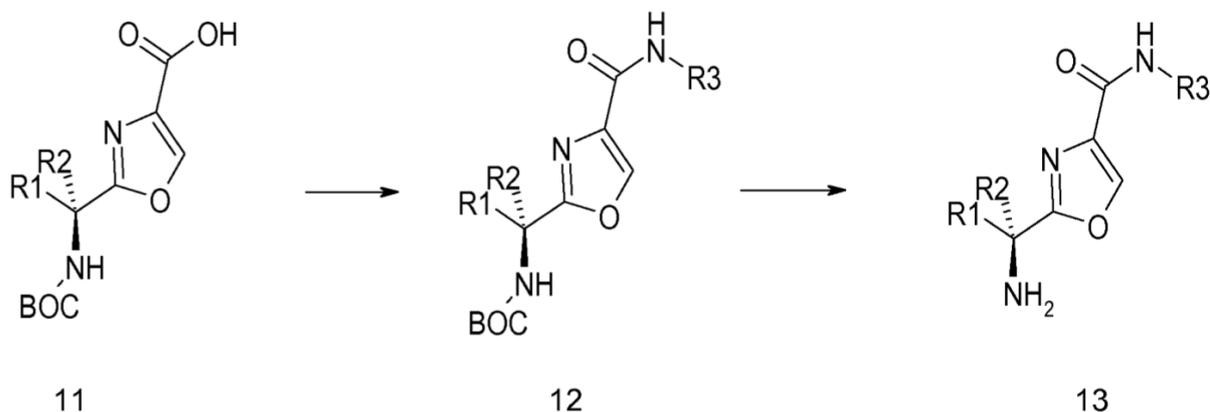
10 Examen extractivo (DCM, 10% ácido cítrico, salmuera) y concentración de los extractos de DCM seguido de cromatografía en columna dio **10**, ejemplificado por

(S)-Metil-2-(2-(terc-butoxicarbonilamino)-1-(1H-indol-3-il)-propan-2-il)oxazol-4-carboxilato, rendimiento: 80%

Hidrólisis de ésteres **10**: a una solución de **10** (0,14mmol) en THF/MeOH (7/1,2mL) (MeOH = metanol) una solución de LiOH (2M en agua, 210 $\mu\text{L}$ , 0,42 mmol) fue añadida y la mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El pH del medio fue ajustado a 3 por 0,1 HCl en agua.

15 Examen extractivo (EtOAc; salmuera) y concentración de los extractos de EtOAc dio **11**, ejemplificado por ácido (S)-2-(2-(terc-butoxicarbonilamino)-1-(1H-indol-3-il)-propan-2-il)oxazol-4-carboxílico, rendimiento: 95%

#### Esquema 4



20 [0058] Síntesis de amidas **12**: a una solución de **11** (0,13mmol), hidrocloreuro de EDC (30mg, 0,16mmol), y HOBT (21mg; 0,16mmol) en DCM (5mL), NMM (21 $\mu\text{L}$ ; 0,19mmol) y amina (0,16mmol) fueron añadidos sucesivamente.

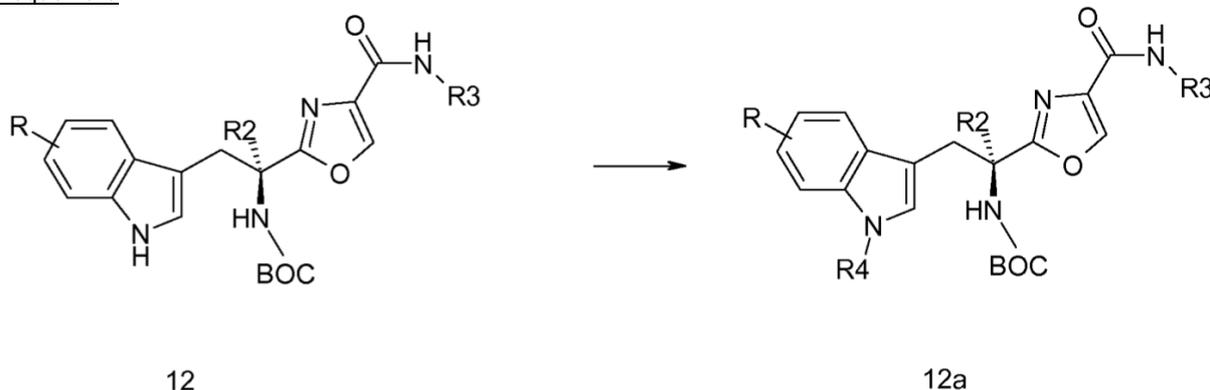
La mezcla reactiva se agitó a temperatura ambiente durante 4h.

25 Examen extractivo (DCM, 10 % ácido cítrico en agua,  $\text{NaHCO}_3$  sat. en agua, salmuera) y concentración de los extractos de DCM seguido de cromatografía en columna dio **12**, ejemplificado por (S)-terc-butil-2-(4-(ciclohexilcarbamoil)oxazol-2-il)-3-(1H-indol-3-il)propilcarbamato, rendimiento: (68%).

30 [0059] Eliminación de grupo Boc: a una solución de **12** (0,08mol) en DCM (2mL) se añadió una solución de HCl (5M en iPrOH, 0,32mL, 1,6mmol) (iPrOH = alcohol isopropílico) y la mezcla reactiva fue agitada a  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 2 h. La evaporación de los solventes y el secado de residuo al vacío (0,1 mmHg) dio el compuesto meta **13**, ejemplificado por

hidrocloreuro de (S)-2-(2-amino-1-(1H-indol-3-il)propan-2-il)-N-ciclohexiloxazol-4-carboxamida, rendimiento: 100%

#### Esquema 5



35

[0060] A una solución de **12** (90mg; 0,20mmol) en THF (3mL) a 10 °C se añadió t-BuOK (25mg, 0.22mmol) (t-BuOK = terc-butóxido de potasio).

Después de agitación a 15 °C durante 45 min, se añadió a la mezcla alquilyoduro (0.40mmol) y la agitación fue continuada durante 1,5 h a 15 °C.

5 Concentración, examen extractivo, (EtOAc, agua, salmuera) y concentración del extracto de EtOAc seguido de cromatografía en columna dio el compuesto **12a**.

## PARTE 2

10 [0061] Un ensayo de selección fue empleado según un protocolo experimental que permite el aislamiento de células progenitoras del oído interno desde el órgano sensorial posnatal de las preparaciones de ratón in vitro.

Estos progenitores aislados generan esferas típicas que expresan un conjunto comprensivo de genes marcadores que definen el epitelio sensorial de desarrollo temprano en el estado celular del progenitor.

15 Bajo condiciones apropiadas estas esferas se pueden diferenciar en parches epiteliales que expresan genes marcadores que son característicos de células capilares diferenciadoras y células de apoyo como se encuentran en el órgano nativo de Corti.

Estos parches epiteliales sensoriales diferenciados, etiquetados "mini oídos", se pueden generar en números suficientes para fines de selección en un formato de bajo rendimiento.

20 Para una lectura apropiada, la desdiferenciación fue detectada con tres parámetros: (i) marcado de expresión Sox2 (Sox2 = factor de transcripción SRY (región de determinación de sexo Y-box 2), (ii) un aumento en la incorporación de proliferación de indicación de EdU (EdU = análogo de timidina 5-etinil-2'-desoxyuridina), y (iii) marcado utilizando el marcador de células capilares Miosina VIIA.

[0062] Los compuestos fueron seleccionados a una concentración estándar de 5 µM.

25 Solución inicial de 5 mM fue preparada en DMSO (dimetilsulfóxido), y partes alícuotas de la solución madre fueron almacenadas a -20°C.

Para referencia de ensayo 0,1 % de DMSO fue usado.

[0063] Elementos de prueba fueron evaluados en tres experimentos independientes con un conjunto de tres a cuatro pocillos por compuesto en cada experimento para un total de 9-12 pocillos para cada compuesto.

30 Las células progenitoras del oído interno fueron aisladas del órgano sensorial de ratones posnatales en el día posnatal 0.

El órgano sensorial fue disociado por disociación enzimática y mecánica para obtener una suspensión de célula única.

35 Las células únicas fueron luego colocadas en placas para formar esferas durante 5 días en el ambiente de cultivo celular en suspensión, y en presencia de factores de crecimiento.

Después de 5 días de proliferación, las esferas en la suspensión de cultivo celular fueron colocadas en placas en los pocillos recubiertos de Matrigel durante 14 días de diferenciación, en el medio empobrecido de factores de crecimiento.

40 Las esferas en la suspensión de cultivo celular se fijaron al matraz de cultivo celular y formaron parches. 24 h después de la colocación en placas, los parches fueron tratados con un inhibidor Notch durante 24h.

El medio fue luego renovado cada 4 días (día 6, 10).

Después de 14 días en diferenciación, los cultivos celulares (parches) fueron tratados con el elemento de prueba durante 96 h a una concentración final de 5 µM.

45 [0064] Durante las últimas 5 horas del tratamiento los parches fueron expuestos a EdU (Click-it EdU Cell Proliferation Assay, Life Invitrogen) para evaluar el potencial proliferativo de cada elemento de prueba.

La coloración para EdU fue realizada según el fabricante.

50 Además un marcador de células capilares (es decir Miosina VIIa) y un marcador de células de apoyo (es decir Sox2) fueron coloreados, una contratinción nuclear (es decir DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) fue usada.

[0065] Para facilidad de comparación el número de células positivas en EdU fue normalizado a la única condición de DMSO.

Así, la actividad de proliferación se expresa como "cantidad de células positivas en EdU".

55 Utilizando el medio de proliferación como un control positivo, un aumento de la actividad de proliferación por 2,1 veces en comparación con DMSO fue descubierto.

La actividad de proliferación inalterada fue descubierta utilizando el medio de diferenciación.

El compuesto ejemplar 13 (ver ejemplos, parte 1), un aumento de actividad de proliferación doble en comparación con DMSO.

60 [0066] Los resultados correspondientes se muestran en la Figura 1 y Tablas 1 y 2.

[0067] La Figura 1 muestra la actividad de proliferación expresada como "cantidad de células positivas en EdU".

65 El medio de proliferación medido de control positivo mostró aproximadamente la actividad de proliferación doble, el medio de proliferación mostró la actividad similar al DMSO.

Estos resultados cumplen completamente el comportamiento anticipado del ensayo.

## ES 2 607 752 T3

El compuesto ejemplar 13 mostró proliferación similar induciendo la actividad como el control positivo. \*\*\* indica importancia (estadística)  $p < 0,0001$ .

- 5 [0068] Tabla 1 muestra un resumen de resultados: elemento de prueba, número de esferas diferenciadas analizado, porcentaje medio de células positivas en EdU, error estándar de la media (SEM), actividad de proliferación expresada como " células positivas en EdU en número de veces ".

Tabla 1

Condición (elemento de prueba)	Número de esferas diferenciadas	Porcentaje medio de células positivas en EdU	SEM	DMSO positivo en EdU en número de veces
Medio Dif.	639	1.57	0.18	0.89
DMSO	683	1.76	0.16	1.00
Compuesto 13	243	3.59	0.49	2.04
Medio Prolif.	224	3.71	0.56	2.11

- 10 [0069] Tabla 2 muestra una comparación estadística (prueba T) de los elementos de prueba para condiciones de referencia.

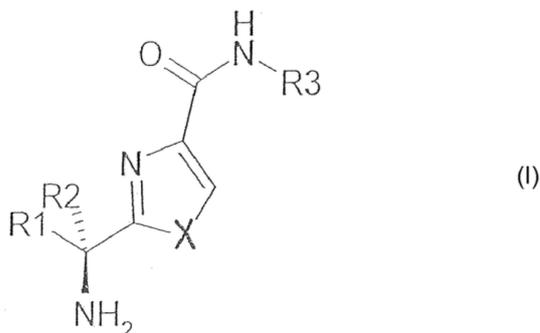
Tabla 2

Compuesto	Elemento de prueba	p-valor
13	Medio Dif.	<.0001
13	Medio Prolif.	0.8006
13	DMSO	<.0001

15

## REIVINDICACIONES

## 1. Compuesto de fórmula I



5 donde

- X es O (oxígeno) o S (azufre),

- R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos arilo, grupos alquilarilo, y grupos arilalquilo, insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada, que opcionalmente contienen heteroátomos,

10 - R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo C1 - C6, grupos alcoxi C1 - C6, grupos alquilo o alcoxi C1 - C6 y grupos alqueno C2 - C6 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada, ,

- R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo, grupos cicloalquilo, grupos alquilocicloalquilo, grupos arilo, grupos alquilarilo, grupos arilalquilo, grupos cicloalquilarilo y grupos arilocicloalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal (no ramificada) o ramificada, que opcionalmente contienen heteroátomos,

15 - o un estereoisómero, un tautómero o una sal derivada farmacéuticamente aceptable.

20 2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X es O (oxígeno).

3. Compuesto según la reivindicación 1 o reivindicación 2, donde R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos heteroarilo, grupos alquilheteroarilo, y grupos heteroarilalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada, en particular grupos indolilo, grupos alquilindolilo, y grupos indolilalquilo.

25 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo C1 - C6 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada, en particular grupos alquilo C1 - C3, especialmente grupos metilo.

30 5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos alquilo, grupos cicloalquilo, y grupos alquilocicloalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada.

35 6. Compuesto según la reivindicación 5, donde R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos cicloalquilo insustituídos o sustituidos.

7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde

- X es O (oxígeno),

- R1 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos indolilo, grupos alquilindolilo y grupos indolilalquilo insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada,

40 - R2 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en alquilo C1 - C3 insustituídos o sustituidos, de cadena lineal o ramificada, en particular metilo,

- R3 es un sustituyente seleccionado del grupo consistente en grupos cicloalquilo insustituídos o sustituidos, en particular grupos ciclohexilo.

45 8. Compuesto según la reivindicación 7, donde

- X es O (oxígeno),

- R1 es (1 H-indol-3-il)-metilo,

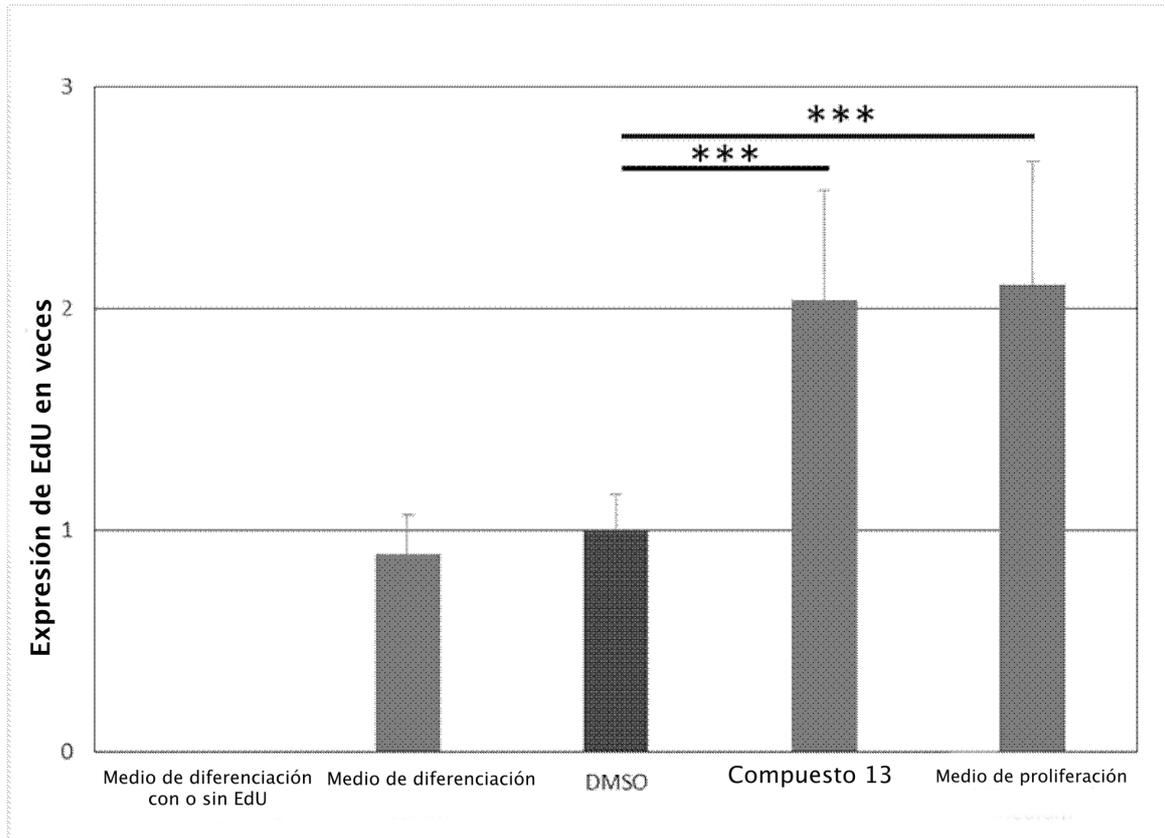
- R2 es metilo,

- R3 es ciclohexilo.

50 9. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso como una composición farmacéutica o un medicamento.

10. Composición farmacéutica o medicamento, que comprende:

- al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y
- un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.



**Figura 1**