

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 380**

51 Int. Cl.:

A61K 31/454 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2013 PCT/EP2013/061936**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182711**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2013 E 13727899 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018 EP 2858647**

54 Título: **Inhibidores del receptor H4 para tratar el tinnitus**

30 Prioridad:

08.06.2012 US 201261657460 P

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

26.09.2018

73 Titular/es:

**SENSORION (100.0%)
375 rue du Professeur Joseph Blayac
34080 Montpellier, FR**

72 Inventor/es:

WERSINGER, ÉRIC

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 683 380 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

Inhibidores del receptor H4 para tratar el tinnitus

Campo de invención

5 La invención se refiere a antagonistas del receptor de la histamina tipo 4 (H4R) para uso en el tratamiento del tinnitus.

Antecedentes de la invención

El oído interno es la parte más interna del oído vertebrado donde dos órganos sensoriales están alojados en el hueso temporal:

10 • La cóclea, dedicada a la función auditiva, que convierte los patrones de presión sonora de la oreja externa en impulsos electroquímicos que se transmiten al cerebro a través del nervio auditivo. La cóclea constituye la región ventral del oído interno y contiene el órgano de Corti que comprende las células ciliadas mecanosensoriales y las células de soporte.

15 • El sistema vestibular, dedicado al equilibrio, la aceleración y la gravedad. Este órgano tiene una función totalmente diferente de la cóclea, dicha función consiste en la detección de aceleraciones lineales y angulares de la cabeza para transmitir al cerebro información sobre movimientos para lograr la función de equilibrio en colaboración con información visual y propioceptiva. También está constituido por células ciliadas mecanosensoriales que convierten acciones mecánicas en potenciales eléctricos y células de soporte.

20 Aunque estos dos órganos tienen células ciliadas sensoriales responsables del potencial receptor y los potenciales de acción subsiguientes, su distinta morfología, conexiones sinápticas y función global implican diferencias en los mecanismos moleculares y celulares subyacentes a su acción.

25 El sistema vestibular y la cóclea exhiben diferencias dependientes del órgano. De hecho, el número de canales iónicos y receptores activados por neurotransmisores se expresan de manera diferente en esos órganos sensoriales. Esto es particularmente cierto para los canales de iones involucrados en la excitabilidad de las células nerviosas. Como tal, la heterogeneidad endógena es, por ejemplo, responsable de diferencias muy fuertes en los patrones de descarga del potencial de acción entre la cóclea y el vestíbulo (Zun-Li MO and Robin Davis, 1997. J Neurophysiol. 77(3):1294-305; Eatock et al., 2008 J. Exp Biol. 211(Pt 11): 1764-74). Por lo tanto, la alteración/modulación de la expresión o función de los canales o receptores de iones, ya sea farmacológica o genéticamente, puede tener consecuencias significativamente diferentes en las funciones auditivas y de equilibrio. De forma similar, cuando los receptores o canales iónicos expresados en un órgano tienen mecanismos desconocidos, sus probables efectores o socios moleculares en el otro órgano del oído interno son difíciles de predecir, y por consiguiente el resultado de su modulación/mutación es impredecible en sí mismo.

35 En un ejemplo más específico, Kv7. La familia de canales de potasio asociada con la excitabilidad de las neuronas se expresa en ambos tejido neuronas, su modulación o mutación tiene consecuencias funcionales muy distintas en las dos modalidades sensoriales: una sordera progresiva y grave (Kharkovets T. et al., 2006 EMBO J. 25(3):642-652) pero la función de equilibrio normal (Spitzmaul G et al., 2013 J Biol Chem. 288(13):9334-44).

En resumen, tales diferencias estructurales, funcionales y patológicas entre la cóclea y el vestíbulo conducen a la búsqueda del tratamiento terapéutico coclear como altamente específico para este peculiar órgano sensorial.

40 En la técnica, varias divulgaciones han enseñado el uso de antagonistas del receptor de la histamina tipo 4 (H4R), para el tratamiento de trastornos vestibulares (Solicitud de Patente Internacional WO2010/072829; Kiss et al., Expert Opin Ther Pat. 2012 Mar;22(3):205-21; Desmadryl et al., Br J Pharmacol. 2012 Oct;167(4):905-16).

45 El tinnitus es una sensación fantasma de audición en ausencia de sonidos externos. Se refiere al tinnitus objetivo, que es causado por el sonido generado en algún lugar del cuerpo y el tinnitus subjetivo, que es la percepción de sonidos sin sentido sin que esté presente ningún sonido físico. El tinnitus afecta aproximadamente al 10% de la población. Aproximadamente 50 millones de adultos estadounidenses informaron tener cualquier tinnitus, y 16 millones de adultos estadounidenses informaron haber tenido tinnitus frecuente en el último año. La prevalencia de tinnitus frecuente aumenta con la edad, alcanzando un máximo de 14.3% entre los 60 y 69 años. El tinnitus puede afectar significativamente la calidad de vida ya que causa irritabilidad, agitación, estrés, insomnio, ansiedad y depresión. De hecho, para uno de cada 100 adultos, el tinnitus afecta su capacidad para llevar una vida cotidiana normal.

50 El tinnitus subjetivo es la percepción del sonido sin ningún estímulo auditivo. Muchas personas experimentan tinnitus transitorios que duran segundos o minutos después de la exposición a ruidos fuertes. Los sonidos asociados con el tinnitus subjetivo se han descrito como zumbidos, silbidos, agua corriendo, zumbidos, grillos, cigarras, silbidos,

vientos. La mayoría de los pacientes experimentan un ruido de tono alto por lo general superior a 3,000Hz. Aunque no existe consenso sobre un patomecanismo único y común para el tinnitus, actualmente hay evidencia acumulada de una teoría del sistema auditivo periférico principal del tinnitus subjetivo. Las emisiones otoacústicas espontáneas, el aumento de la actividad espontánea en el área coclear, tal como el disparo aberrante del nervio auditivo y la disfunción discordante de las células ciliadas externas dañadas y las células ciliadas internas intactas se han postulado como causa putativa del tinnitus.

Debido a la falta de bases fisiopatológicas, la razón detrás de los tratamientos farmacológicos para el tinnitus es tratar las comorbilidades que acompañan al tinnitus, como la depresión y la ansiedad. Otros tratamientos usan fármacos que son eficaces en los trastornos que se cree que comparten algunos puntos en común con el tinnitus, como los anticonvulsivos usados en la epilepsia y el antagonista del calcio gabapentina usado en el dolor neuropático. Aunque una gran variedad de compuestos se usa fuera de indicación para tratar pacientes con tinnitus, todavía no hay en el mercado medicamentos aprobados por the US Food and Drug Administration (FDA) o the European Medicines Agency (EMA). La lista de compuestos usados incluye anticonvulsivos, ansiolíticos, antidepresivos, antagonistas de NMDA, antagonistas colinérgicos, antihistamínicos, vasodilatadores, antipsicóticos y antagonistas del calcio. Por ejemplo, los documentos WO2010113109 y WO2012/042314 describieron el uso de ciclobenzaprina para tratar el tinnitus.

Sin embargo, la mayoría de los fármacos no han demostrado una eficacia suficiente en ensayos clínicos controlados aleatorios para ser aprobados y comercializados específicamente para el tinnitus.

La presente invención tiene como objetivo proporcionar composiciones para uso en el tratamiento del tinnitus.

20 Resumen

La invención proporciona inhibidores del receptor de la histamina tipo 4 (H4R) como se define en las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento del tinnitus.

En otra realización, dicho inhibidor es 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina o 4-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-d]pirimidin-2-ilamina o cis-4-(piperazin-1-il)-5,6,7a,8,9,10,11,11a-octahidrobenzofuro[2,3-h]quinazolin-2-amina o 7-(furan-2-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-amina o 1-(7-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-ciclopentiletanona o 1-[(5-cloro-1H-bencimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina maleato o PF-3893787 o PF-3893787-18 o JNJ39758979.

Otro objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de H4R como se define en las reivindicaciones 1-5 para uso en el tratamiento de tinnitus.

30 Definiciones

El término "receptor de la histamina H4" tiene su significado general en la técnica. El término puede incluir receptores de la histamina H4 de origen natural y variantes y formas modificadas de los mismos. El receptor de la histamina H4 puede ser de cualquier fuente, pero por lo general es un receptor de la histamina H4 de mamífero (por ejemplo, humano y no humano), particularmente un receptor de la histamina H4 humano. Las secuencias para el receptor de la histamina H4 se han publicado con las referencias NM_021624 (*Homo sapiens*), NM_153087 (*Mus musculus*) y NM_131909 (*Rattus norvegicus*).

El término "antagonista del receptor" se usa indistintamente para indicar un antagonista "verdadero" y un agonista inverso de un receptor. Un antagonista del receptor "verdadero" es un compuesto que se une al receptor y bloquea la activación biológica del receptor, y por lo tanto la acción del agonista del receptor, por ejemplo, compitiendo con el agonista por dicho receptor. Un agonista inverso es un compuesto que se une al mismo receptor que el agonista, pero ejerce el efecto opuesto. Los agonistas inversos tienen la capacidad de disminuir el nivel constitutivo de activación del receptor en ausencia de un agonista.

El término "antagonista del receptor de la histamina H4" incluye cualquier entidad química que, tras la administración a un paciente, da como resultado la inhibición o regulación negativa de una actividad biológica asociada con la activación del receptor de la histamina H4 en el paciente, incluyendo cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo que de otro modo resultarían de la unión al receptor de la histamina H4 de su ligando natural. Tales antagonistas del receptor de la histamina H4 incluyen cualquier agente que pueda bloquear la activación del receptor de la histamina H4 o cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo de la activación del receptor de la histamina H4. Por ejemplo, tales antagonistas del receptor de la histamina H4 pueden actuar ocupando el sitio de unión del ligando o una porción del mismo del receptor de la histamina H4, lo que hace que el receptor sea inaccesible a su ligando natural, de modo que se evita o reduce su actividad biológica normal. En el contexto de la presente invención, los antagonistas del receptor de la histamina H4 son selectivos para el receptor de la histamina H4 en comparación con los otros receptores de la histamina, tales como el receptor de la histamina H1, el receptor de la histamina H2 y el receptor de la histamina H3. Por "selectivo" se entiende que la afinidad del antagonista por el receptor de la histamina H4 humano es al menos 10 veces, preferiblemente 25 veces, más preferiblemente 100

veces, todavía preferiblemente 500 veces mayor que la afinidad para el otro receptor de la histamina humana (H1, H2 y H3).

5 La afinidad de un antagonista para el receptor de la histamina H4 se puede cuantificar midiendo la actividad del receptor de la histamina H4 o el efecto biológico resultante del antagonismo del receptor en presencia de un intervalo de concentraciones de dicho antagonista con el fin de establecer una curva dosis-respuesta. A partir de esa curva de respuesta a la dosis, se puede deducir un valor de IC_{50} que represente la concentración de antagonista necesaria para inhibir el 50% de una actividad biológica inducida por un agonista en una concentración definida. El valor de IC_{50} se puede determinar fácilmente por un experto en la técnica ajustando los diagramas de dosis-respuesta con una ecuación dosis-respuesta como describen De Lean et al., (1979). Los valores de IC_{50} se pueden convertir en constante de afinidad (Ki) usando los supuestos de Cheng and Prusoff (1973).

10 De acuerdo con lo anterior, un antagonista del receptor de la histamina H4 selectivo es un compuesto para el cual al menos una de las proporciones (i) Ki H3: Ki H4, y (ii) IC_{50} H3: IC_{50} H4, está por encima de 10: 1, preferiblemente 25: 1, más preferiblemente 100: 1, aun preferiblemente 1000: 1.

15 La actividad antagonista de los compuestos hacia los receptores de la histamina H4 se puede determinar usando diversos métodos, tales como los descritos en Thurmond RL et al., (2004) o Venable JD. et al., (2005).

El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, y más preferiblemente hasta 1000 Da.

20 Como se usa en este documento, el término "sujeto" indica un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferiblemente, un sujeto según la invención es un ser humano.

25 El término "tratar" se refiere a prevenir (esto es, evitar que suceda), reducir o aliviar al menos un efecto o síntoma negativo de una enfermedad, trastorno o afección asociada con una deficiencia o ausencia de un órgano, tejido o función celular. De acuerdo con lo anterior, el objetivo de la invención es proporcionar un final del tinnitus, una disminución del volumen del tinnitus o una mejora del estado del sujeto protegiendo o restaurando la funcionalidad o parte de la funcionalidad de la cóclea.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a antagonistas del receptor H4 para tratar o usar en el tratamiento del tinnitus.

30 El tinnitus que se va a tratar puede ser provocado por un trauma acústico, presbiacusia, fluctuación en el suministro de sangre a la cóclea que conduce a isquemia, tratamientos de anoxia con medicamentos ototóxicos, sordera súbita u otra aparición inductora de excitotóxicos cocleares.

35 Se cree que el tinnitus surge de la hiperactividad neuronal. Sin querer estar sujetos a una teoría, los inventores sugieren que el control farmacológico eficiente y selectivo de la excitabilidad de las neuronas auditivas primarias es una solución para atenuar el tinnitus. De hecho, como se encuentra que el receptor de la histamina tipo 4 (H4R) se expresa en la neurona ganglionar espiral, los antagonistas selectivos de H4R pueden modular eficazmente la actividad eléctrica de las neuronas primarias cocleares de mamíferos. El antagonista del receptor H4 como se define en las reivindicaciones 1-5 es un antagonista selectivo del receptor H4.

40 Según una realización de la invención, un antagonista selectivo del receptor H4 como se define en las reivindicaciones 1-5 se refiere a una molécula que tiene una afinidad por el receptor H4 al menos 10 veces, preferiblemente 25 veces, preferiblemente 50 veces, más preferiblemente 100 veces, y aún más preferiblemente 500 veces mayor que su afinidad por cualquiera de los receptores H1, H2 o H3.

45 Según otra realización de la invención, un antagonista selectivo del receptor H4 como se define en las reivindicaciones 1-5 es una molécula para la cual una de las proporciones Ki H3: Ki H4 y (ii) IC_{50} H3: IC_{50} H4 está por encima de 10: 1, preferiblemente 25: 1, preferiblemente 50: 1, más preferiblemente 100: 1 e incluso más preferiblemente entre 500: 1 a 1000: 1.

50 La afinidad por el receptor H4 y otros receptores (H1, H2 y H3) se puede caracterizar por cualquier técnica convencional conocida en la técnica. Por ejemplo, se puede determinar mediante ensayos de unión. Dichos ensayos usan pellas celulares de células tales como SK-N-MC o HEK293 T, células transfectadas con receptor H4, H3, H2 o H1 humano, de rata o de ratón (Lovenberg et al., 1999, Liu et al., 2001a,b, Thurmond et al., 2004). Las células se pueden homogeneizar en Tris 50 mM, pH 7.5 que contiene EDTA 5 mM, y los sobrenadantes de un centrifugado de 800 g se recogen y se vuelven a centrifugar a 30 000 g durante 30 minutos. Las pellas se homogeneizaron luego en Tris 50 mM, pH 7.5 que contenía EDTA 5 mM. Para estudios de unión competitiva H4, las células humanas, de ratón o de rata se incuban usando diferentes concentraciones de [³H] histamina (específicas para cada especie, por

ejemplo 10, 40 y 50 nM respectivamente), en presencia o ausencia de la molécula que se probará, durante 45 minutos a 25 °C. La unión no específica se define usando histamina no marcada 100 μM o usando 10⁻⁶ M de antagonista de receptor H4 específico o selectivo tal como JNJ-7777120 o JNJ-10191584. Se determinó con este método que los valores de Kd para el receptor H4 humano, de ratón y de rata eran 5, 42 y 178 nM, respectivamente, y se determinó que los valores de Bmax eran 1.12, 1.7 y 0.68 pmol/mg de proteína, respectivamente. De forma similar, el ligando usado para los ensayos de unión al receptor H3 es, por ejemplo, [³H] N-a-metil histamina, y la unión no específica se define usando histamina no marcada 100 μM. Se determinó con este método que el valor de Kd para el receptor H3 humano era de 1 nM y el valor de Bmax de 2.13 pmol/mg de proteína. El ligando usado para la unión del receptor H1 fue [³H] pirlamina y la actividad no específica se define usando difenhidramina 10 μM no marcada. Se determinó con este método que el valor de Kd para el receptor H1 humano era de 1 nM y el valor de Bmax de 2.68 pmol/mg de proteína. En estos ensayos, las células se incuban por lo general con diferentes concentraciones, tales como 10⁻¹¹ a 10⁻⁴ M de molécula que se va a analizar.

La persona experta en el arte que desee verificar o determinar la actividad antagonista de la molécula que se va a analizar puede usar cualquier método conocido en la técnica y, por ejemplo, un ensayo de cAMP basado en células. Dicho ensayo usa líneas celulares SK-n-MC transfectadas con el receptor H4, H3, H2 o H1 y una construcción de gen indicador tal como b-galactosidasa bajo el control de elementos cíclicos que responden a AMP. Las células se ponen en placas durante la noche antes del ensayo. La histamina se usa como la molécula agonista. Para la determinación de la actividad antagonista, las moléculas que se van a ensayar se añaden 10 minutos antes de la adición del agonista. La forskolina (concentración final 5 μM) se añade 10 minutos después de la adición de histamina. Luego las células se mantienen a 37 °C, durante 6 horas y luego después del lavado, se lisan con 25 μl de 0.1x solución reguladora de ensayo (fosfato de sodio 10 mM, pH 8, MgSO₄ 0.2 mM y MnCl₂ 0.01 mM) y se incuban a temperatura ambiente durante 10 min. Luego las células se incuban durante 10 minutos con 100 μl de 1x solución reguladora de ensayo que contiene Triton X-100 al 0.5% (v/v) y mercaptoetanol 40 mM. El color puede desarrollarse usando 25 μl de solución de sustrato de 1 mg/ml tal como clorofenol rojo b-D-galactopiranosido, y cuantificarse midiendo la absorbancia a 570 nm. Los datos obtenidos para cada curva de concentración-respuesta se pueden ajustar a una curva sigmoidea para obtener la respuesta máxima, el coeficiente de Hill y EC₅₀.

Los antagonistas de la histamina H4 y los antagonistas selectivos de la histamina H4 que se contemplan en la invención se definen en las reivindicaciones 1-5. En una realización de la invención, el antagonista de la histamina H4 o antagonista de H4 selectivo se selecciona entre los compuestos de 2-aminopirimidina tales como los descritos en el documento WO2008/100565; los derivados de 4-amino-pirimidina tales como los descritos en el documento WO2009/080721; los compuestos de pirimidina tales como los descritos en el documento WO2007/072163.

En otra realización, el antagonista de la histamina H4 o los antagonistas de la histamina H4 selectivos se seleccionan entre los descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO2008/100565: (R)-4-(3-Amino-pirrolidin-1-il)-6-isopropilpirimidin-2-ilamina; y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

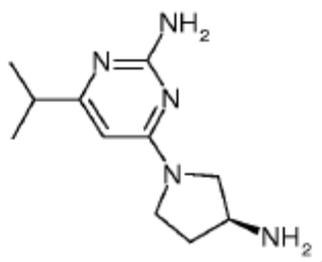
En otra realización, el antagonista de la histamina H4 o los antagonistas de la histamina H4 selectivos se seleccionan entre los descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO2009/080721: 2-isobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclohexilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-(4-fluorobencil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-isobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-tert-butil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-isopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-(ciclopropilmetil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina; 2-ciclopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-tert-butil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-isopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina; 6-(3-aminoazetidín-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina; 2-isobutil-6-(3-metil-3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 6-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina; 2-ciclobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclopentil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclopentil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-(2,2-dimetilpropil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-(2,2-dimetilpropil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-(2-ciclopentiletil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclohexilmetil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclopropilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclohexil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina; 2-ciclohexil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina; y 2-(4-fluorobencil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina, o una sal de los mismos.

En otra realización, el antagonista de la histamina H4 o los antagonistas de la histamina H4 selectivos se seleccionan entre los descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO2007/072163: N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina y N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina tartrato. En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es 1-[(5-cloro-1H-benzimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina (también denominado JNJ 10191584 o VUF 6002) descrito por Herman D. et al. (2005). Este antagonista selectivo se une con alta afinidad al receptor de la histamina H4

humano ($K_i = 26 \text{ nM}$). Esta afinidad es 540 veces más selectiva con respecto al receptor H3 ($K_i = 14.1 \text{ }\mu\text{M}$) (Zhang M. et al. 2007).

En una realización particular, el antagonista selectivo del receptor de la histamina H4 es 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina (también denominado JNJ 7777120) descrito por Robin L. et al. (2004).

- 5 En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es JNJ 39758979 y comprende la fórmula:

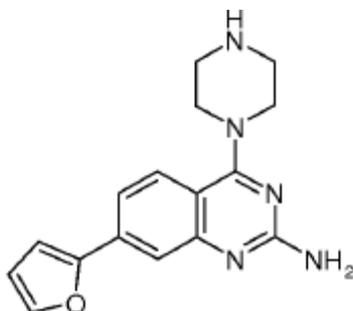


En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 selectivo es 1-[(5-cloro-1H-bencimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina maleato (también denominado JNJ 10191584).

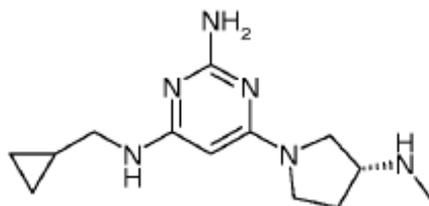
- 10 En una realización particular, el antagonista selectivo del receptor de la histamina H4 es 4-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-d]pirimidin-2-ilamina (también denominado A-943931) descrita por Cowart MD. Et al., (2008).

- 15 En una realización particular, el antagonista selectivo del receptor de la histamina H4 es cis-4-(piperazin-1-il)-5,6,7a,8,9,10,11,11a-octahidrobencofuro[2,3-h]quinazolin-2-amina (también denominado A-987306) descrita por Liu H et al., (2008).

En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es 7-(furan-2-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-amina (también denominado VUF11489):

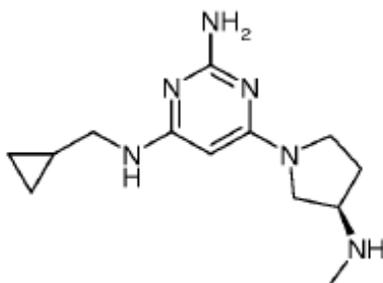


En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es PF-3893787:



20

En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es PF-3893787-18



En una realización particular, el antagonista del receptor de la histamina H4 es 1-(7-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-ciclopentiletanona (también denominada INCB38579).

- 5 Otro objeto de la invención se refiere a un antagonista selectivo del receptor de la histamina H4 para uso en el tratamiento del tinnitus, en el que dicho antagonista del receptor de la histamina H4 se debe administrar a un sujeto que lo necesite.

El compuesto de la invención se puede administrar antes, durante o después de que se haya inducido el tinnitus.

Los antagonistas del receptor de la histamina H4 selectivos se pueden administrar en forma de una composición farmacéutica, como se define a continuación.

- 10 Preferiblemente, dichos antagonistas se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del antagonista selectivo del receptor de la histamina H4 para tratar el tinnitus a una proporción beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

- 15 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y las composiciones de la presente invención lo decidirá el médico tratante dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específico para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y como factores bien conocidos en las artes médicas. Por ejemplo, está dentro de la experiencia de la técnica comenzar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variar en un amplio intervalo desde 0.01 a 1,000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento por lo general contiene desde 0.01 mg a 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente desde 1 mg a 100 mg del ingrediente activo. Normalmente se suministra una cantidad eficaz del fármaco a un nivel de dosificación de 0.0002 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de 0.001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

- 20 25 30 Los antagonistas del receptor de la histamina H4 selectivos se pueden combinar con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

- 35 En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, se puede administrar en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitarias apropiadas comprenden formas de vía oral tales como comprimidos, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, aerosoles, implantes, subcutáneos, transdérmicos, tópicos, intraperitoneales, intramusculares, intravenosos, subdérmicos, transdérmicos, formas de administración intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

- 40 Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estos pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio o mezclas de tales sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas que, dependiendo de cada caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables.

5 Las formas farmacéuticas apropiadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos.

10 Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como base libre o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

15 Los antagonistas del receptor de la histamina H4 selectivos de la invención se pueden formular en una composición en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

20 El portador también puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas apropiadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede ser provocada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y timerosal. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

30 Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los polipéptidos activos en la cantidad requerida en el solvente apropiado con uno o varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son técnicas de liofilización y secado al vacío que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

35 Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación, tales como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también se pueden emplear cápsulas de liberación de fármaco.

40 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución se debe estandarizar adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido primero se vuelve isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente apropiadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En relación con esto, los expertos en el arte conocerán medios acuosos estériles que se pueden emplear a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis se podría disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectarse en el sitio de infusión propuesto. Alguna variación en la dosificación necesariamente ocurrirá dependiendo de la condición del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual.

45 50 Los antagonistas del receptor de la histamina H4 selectivos de la invención se pueden formular dentro de una mezcla terapéutica para que comprenda de 0.0001 a 1.0 miligramos, o de 0.001 a 0.1 miligramos, o de 0.1 a 1.0 o incluso de 10 miligramos por dosis más o menos. También se pueden administrar dosis múltiples.

55 Además de los compuestos de la invención formulados para administración parenteral, tales como inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, comprimidos u otros sólidos para administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma actualmente utilizada.

En un aspecto particular, los antagonistas del receptor de la histamina H4 selectivos se administran directamente en el oído interno. Esta ruta de administración puede ser preferida para introducir un efecto directo y a largo plazo en el

vestíbulo. Dicha administración se puede realizar mediante diversas técnicas de administración, que incluyen el uso de dispositivos o portadores de fármacos para transportar y/o administrar los antagonistas del receptor H4 a las membranas de la ventana redonda u ovalada, donde se difunde en el oído interno o se infunde activamente. Los ejemplos incluyen otowicks, catéteres para ventana redonda, diversos tipos de geles, espumas, fibrinas u otros portadores de fármacos, que se colocan en el nicho de ventana redonda o en la ventana oval, y se cargan con el compuesto de la invención para liberación sostenida. También incluye dispositivos que se insertan en el conducto coclear o en cualquier otra parte de la cóclea. El compuesto de la invención también se puede administrar al oído interno mediante inyección transtimpánica o intratimpánica.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 representa la localización de H4R en la cóclea. El panel (A) muestra la expresión del ARNm de H4R en la cóclea P9. El panel (B) muestra la localización de la proteína H4R en las neuronas ganglionares en espiral (SGN) de las ratas P10 y P27.

15 La figura 2 representa la modulación del antagonista H4R de la excitabilidad de las neuronas ganglionares en espiral in vitro. El panel (A) muestra un ejemplo de SGN cultivadas para 3 DIV. Por lo general, los cultivos contenían neuronas (10-20 μm de diámetro) que eran monopolares, bipolares o pseudomonopolares. En la mayoría de los cultivos, estas neuronas todavía estaban cubiertas de mielina. En el panel (A2), las trazas distintivas de las neuronas transitorias y sostenidas resaltan el patrón de disparo A.P (rápido y de adaptación lenta) en estas neuronas. El panel (B1) muestra un ejemplo de potenciales de acción inducidos por etapas en una condición de control (negro) y en presencia de JNJ10191584 100 μM en una neurona transitoria (gris). El panel (B2) muestra un rasgo distintivo del primer potencial de acción en una neurona transitoria en una condición de control (negro), en presencia de JNJ7777120 100 μM (gris). Ni la frecuencia ni la amplitud de los picos se vieron afectados por los antagonistas de H4R como se resume en las gráficas de barras (panel C2). El panel (C1) muestra un ejemplo de potenciales de acción inducidos por etapas en el control y en presencia de JNJ10191584 100 nM de en una neurona sostenida. El panel (C2) resume el porcentaje de inhibición obtenido en neuronas sostenidas tratadas con los antagonistas de H4R a 100 nM o 100 μM . El panel (C3) muestra un ejemplo de potenciales de acción inducidos por etapas en el control y en presencia de JNJ7777120 100 μM en una neurona sostenida.

25 La figura 3 representa la modulación del antagonista de H4R de la activación de A.P. espontánea inducida por acción sináptica en una preparación coclear semiintacta. El panel (A) muestra un ejemplo de una preparación de cóclea semiintacta cultivada a nivel de los SGN. Las estrellas destacan la presencia de mielina alrededor de los cuerpos celulares y las flechas negras muestran fibras SGN intactas que se dirigen hacia las células ciliadas sensoriales del órgano de Corti. El panel (B) muestra un registro distintivo de un SGN con potenciales de acción espontáneos (inducido por acción sináptica) en condiciones de control y en presencia de JNJ10191584 (100 μM).

Ejemplos

Ejemplo 1: expresión de ARNm de H4R en cóclea de rata postnatal (P) 9-11.

35 Expresión de ARNm H4R-RT-PCR

Se diseccionaron cócleas de ratas Wistar postnatales (P) 9-12 del hueso temporal y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido inmediatamente después de la disección de ratas adultas. En un único experimento, se usaron al menos 4-6 cócleas y 1 bazo (se usó un control tisular (positivo) para analizar la expresión de ARNm de H4R) para extraer el ARN total usando un protocolo estándar con TRIzol (RiboPure, Ambion) y cloroformo. La síntesis de ADNc de la primera cadena (transcripción inversa, RT) se realizó con 0.5-1 μg de ARN total tratado con ADNasa y cebadores Oligo (dT) (Kit de transcripción inversa Quantitect, Qiagen). La reacción se realizó a 42 °C, durante 30 min. seguido por 95 °C por 3 min. La PCR se realizó con 1-2 μl de reacciones de RT. La amplificación fue de 30 ciclos para bazo y ganglios cocleares con 30 s a 95 °C, 30 segundos a la temperatura de hibridación específica del cebador (58-60 °C) y 1 minuto a 72 °C. Se realizó una extensión final a 72 °C, durante 7 min. Para H₄R, la RT se realizó preferentemente usando cebador específico de secuencia y los productos de PCR (1 μl) se resolvieron en geles de agarosa al 2% que contenían bromuro de etidio (10%). Los resultados se obtuvieron en 3 experimentos diferentes (independientes) y los productos de PCR se secuenciaron sistemáticamente para certificar la naturaleza del producto amplificado a partir de la secuencia de H4R. Para evitar contaminaciones genómicas de ADNc, se realizó una transcripción inversa sin la enzima transcriptasa inversa. Además, los conjuntos de cebadores se diseñaron a través de límites intrón-exón determinados a partir de secuencia de rata H4R (SEQ ID NO: 1) y secuencia de rata GAPDH (SEQ ID NO: 6) usando el software NCBI/Primer-Blast libre (Figura 1) y PCR anidada se realizaron usando los primeros productos de PCR. Los cebadores GAPDH (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8) se usaron como control positivo y para H₄R; los cebadores (SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 5) se analizaron sistemáticamente para determinar la calidad en el tejido del bazo.

55 Tanto para las muestras de cóclea como de control de tejido (bazo), el tamaño de las bandas observadas en geles correspondió a los tamaños predichos de los productos amplificados: 477 pb para H₄R y 502 pb para GAPDH (no

mostrado) usados como control positivo para la reacción de PCR (Figura 1A). Como era de esperar, no se observaron bandas en nuestros controles negativos (RT-) que confirmaran la pureza de nuestras muestras de ARN. Ya que la expresión de H4R era baja con un único experimento de PCR, una segunda amplificación del primer producto de PCR usando cebadores anidados (referenciados como H4R-F2 y H4R-R2 en la figura 1) fue sistemáticamente necesaria para aumentar las posibilidades de revelar la expresión de H4R. En este caso, la expresión de ARNm de H4R ha sido probada y encontrada en 3 experimentos independientes. La secuenciación directa realizada en todos los productos de PCR confirmó la naturaleza del producto amplificado como ARNm de H4R.

Localización H4R-Inmunofluorescencia

- 10 Para confirmar adicionalmente la presencia de H4R en neuronas ganglionares en espiral a todas las edades, verificamos la localización del receptor a nivel de proteína usando un anticuerpo (policlonal) anti-H4R. Estas pruebas se han llevado a cabo usando cóclea "madura" postnatal (P) 10, (P) 27 y cóclea de rata adulta (esto es, en este documento la cóclea madura es en el sentido del inicio de la cóclea auditiva. Ratas Wistar postnatales (P) 10-27 y adultas (12 semanas) se anestesiaron profundamente con pentobarbital (0.4%), luego se perfundieron transcárdialmente con heparina PBS (0.01 M) seguido de una solución de fijación (4% de paraformaldehído, 1% de ácido pícrico, con 5% de sacarosa). Los huesos temporales se fijaron después en la misma solución antes de diseccionar la cóclea en PBS. Los endorgios vestibulares se incrustaron en agarosa al 4% y se cortaron secciones de 40 μm de grosor con un vibrato (HM650V, Microm). Las secciones de flotación libre se permeabilizaron primero con Triton X-100 al 4%, se evitó la unión no específica mediante una etapa de preincubación en una solución de bloqueo de gelatina de pescado al 0.5%, Triton X-100 al 0.5% y BSA al 1%. Luego las muestras se incubaron con anticuerpos primarios: anti-H4R policlonal de rata (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; regalo del Laboratorio P. Chazot) diluido en la solución de bloqueo. Para los experimentos de control, se omitió el anticuerpo primario investigado, mientras que los siguientes procedimientos no se modificaron. La marcación específica se reveló con Alexa anticuerpos secundarios 594-fluorescentes (1: 700) en la solución de bloqueo combinada con tinción de neurofilamentos con faloidina conjugada con Alexa 488 (Fisher Scientific). Las muestras se observaron con un microscopio confocal de barrido láser (LSM 5 LIVE DUO, Zeiss). El procesamiento final de la imagen se realizó con el software Adobe Photoshop (San Jose, CA). Las reacciones de control se observaron y procesaron con los parámetros usados para las secciones teñidas. Todos los experimentos de inmunofluorescencia se han realizado al menos 3 veces (3 experimentos independientes).
- 20 H4R se ha localizado en SGN (marcado doblemente con antineurofilamento) en todos los giros de la cóclea (apical, medio y basal) con un gradiente creciente de expresión durante el desarrollo: las neuronas cocleares de rata P10 expresaron H4R en baja densidad (correlacionando con nuestros datos de RT-PCR a esta edad) (Figura 1B), mientras que la cóclea P27 mostró una mayor expresión de H4R en estas neuronas (Figura 1C). H4R se expresaron también en SGN de cóclea adulta (datos no mostrados). Curiosamente, la comarcación con el anticuerpo antineurofilamento reveló que H4R se localizó en la gran mayoría de los SGN, aunque una pequeña población no expresaba el receptor. A nivel celular, se encontró que H4R se localizaba preferentemente en las regiones membranosa y submembranosa.

Ejemplo 2: los antagonistas de H4R son moduladores de la excitabilidad del ganglio espiral.

Cultivo de células

- 40 La cabeza de ratas Wistar de 5-8 días (CERJ, Le Genest, Berthevin, Francia) se hemiseccionó de forma aséptica y la cóclea se disecó del hueso temporal. En medio L15 (Leibovitz) medio (Gibco), el hueso coclear se eliminó suavemente con unos fórceps finos para aislar el tejido neurosensorial. El ganglio espiral se separó del órgano de Corti justo antes de la *habenula perforata* y (colagenasa 0.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, dispasa 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y ADNasa 0.75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) se disoció enzimáticamente durante 15 min a 25 °C. Después de lavar a fondo con una solución de Tyrode (Sigma), se utilizó una pipeta de transferencia para disociar suavemente las neuronas ganglionares en medio de cultivo (medio DMEM/F-12 1: 1, 2% de nutriente N2, Glc 28 mM, Gln 1.5 mM, HEPES 15 mM, AraC 2 μM , 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ de BDNF y 1% de penicilina/estreptomicina). Las neuronas ganglionares en espiral se sembraron en placas de cultivo recubiertas previamente con 10 $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de laminina (Sigma). Estos cultivos de baja densidad se mantuvieron a 37 °C en 5% de CO_2 durante 3 a 5 días antes de los experimentos de patch-clamp de células enteras.
- 45
- 50 Preparación de cóclea semiintacta
- Para esta preparación, se usaron ratas Wistar de 10-14 días posnatales (P). Las primeras etapas del protocolo fueron similares al cultivo celular hasta que la cóclea fue liberada del hueso coclear. Los giros cocleares (apical y medio) se diseccionaron y aislaron en medio L-15 estéril filtrado (Leibovitz). Los explantes se sembraron boca abajo (neuronas ganglionares en espiral en la parte superior) en cubreobjetos de vidrio recubiertos con laminina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Matrigel (BD biosciences) reducido en 10 μl de factor de crecimiento. Estas preparaciones se incubaron primero durante 30 min a 37 °C en una atmósfera de 95%/5% de O_2/CO_2 y luego se cultivaron durante 2 a 5 días in vitro en

(50%) F12/(50%) DMEM (Invitrogen) suplementado con (2%) de nutrientes N2 (Fisher Scientific). El medio se renovó una vez, 3 días después de colocar los explantes.

Electrofisiología In vitro.

5 La eficacia del antagonista de H4R se ha probado usando dos técnicas patch-clamp: registros de fijación de corriente de células enteras con neuronas de ganglios en espiral disociadas (SGN) y registros de parches sueltos para SGN en preparaciones de cócleas semiintactas. Para estos experimentos, se utilizaron ratas Wistar postnatales (P) de 10-14 días en DIV2-5.

10 Todos los experimentos se realizaron usando un amplificador Axopatch 200B. Las huellas se filtraron a paso bajo a 10-20 kHz y se digitalizaron a 100 kHz con una placa Digidata 1440A. Los datos se almacenaron con el software PClamp10.2 (Axon Instruments; Molecular Devices Corp., USA) y se analizaron fuera de línea usando los softwares Clampfit 10.2 (Molecular Devices) y Origin 8 (Origin-Lab).

15 La solución de registro contenía (en mM): NaCl 135, HEPES 10, glucosa 10, MgCl₂ 1, KCl 5 y CaCl₂ 2.5, (pH 7.35). Para registros de patch-clamp de células enteras, las pipetas de vidrio de registro (4-6 MΩ) se recubrieron con cera para reducir la capacitancia de la pipeta y se llenaron con (en mM): KCl 135, HEPES 10, glucosa 10, NaCl 5, EGTA 5, Mg-ATP3, GTPNa1, pH 7.35. Para estas soluciones, se pudo medir un potencial de unión de líquido de 3-7 mV, pero los voltajes de la membrana no se corrigieron. La osmolaridad de todas las soluciones se ajustó a 300 mOsm/L. Las soluciones de control y prueba se aplicaron usando un sistema de perfusión capilar múltiple (velocidad de flujo ~ 500 μl/min). Después de cada aplicación del fármaco probado, las células se lavaron con solución reguladora de control.

20 Los registros se realizaron a temperatura ambiente (TA, 22-25 °C). En las neuronas disociadas, se aplicaba una corriente cuadrada de 150-200 pA DC (1 s de duración) cada 6 s con el fin de obtener trenes de potenciales de acción. Las pruebas farmacológicas se realizaron solo cuando los registros presentaron los siguientes criterios: resistencia en serie (<10 MΩ en promedio) no más de 3 veces la resistencia de la pipeta, potencial estable de membrana en reposo (R.M.P) negativo a -40 mV, potenciales de acción rebasantes (magnitud > 60 mV para el primer potencial de acción), disparo estable durante hasta un minuto en condiciones de control.

25 Los electrodos para los registros SGN de parche suelto tenían una resistencia de punta de 1.0-1.5 MΩ y se llenaban con la solución de registro. En estas preparaciones de cócleas semiintactas, las descargas espontáneas de potencial de acción se registraron directamente. Para cada prueba, el compuesto se aplicó durante al menos 2 minutos. Para verificar la reversibilidad de la respuesta, las neuronas se lavaron con medio de control después de cada prueba de los fármacos. Los resultados in vitro se expresaron como lo media ± S.E.M.

30 Para evaluar la eficacia de los antagonistas de H4R (JNJ7777120 y JNJ10191584) para modular la hiperexcitabilidad de los SGN, medimos el porcentaje de inhibición del disparo del potencial de acción (A.P) de los dos compuestos. Se han probado dos concentraciones: 100 μM y 100 nM.

35 Por lo general, en los SGN disociados, (Figura 2A1), pequeños pasos de corriente despolarizante (0,1 nA-0,4 nA) provocaron dos tipos de descarga del potencial de acción: transitorios (no más de 1-2 picos-neuronas que se adaptan rápidamente) y disparos sostenidos (número de picos que aumentan linealmente por encima del umbral: neuronas que se adaptan lentamente) (Figura 2A2). Los picos transitorios SGN representaron la mayoría de las neuronas en nuestros cultivos celulares (80% contra 20% de neuronas pico sostenidas). El porcentaje de ambos tipos de neuronas y sus propiedades de membrana (capacitancia, resistencia de entrada, R.M.P., umbral de pico) son comparables con estudios previos (véase el resumen en la tabla-figura 2). Las pruebas de la acción inhibitoria de JNJ10191584 y JNJ7777120 se realizaron tanto en SGN sostenidas como transitorias (Figura 2B, 2C).

40 Para picos transitorios SGN, ni JNJ10191584 ni JNJ7777120 tuvieron un efecto sobre el único pico en todas las concentraciones ensayadas. La frecuencia de los picos (1-3 picos) y la amplitud del primer pico no fueron afectados por los dos antagonistas específicos (85.6 ± 4.1mV (n = 4) contra 83.7 ± 5.2 mV respectivamente para el control y JNJ10191584 100 μM y 77±5.6mV (n = 7) contra 73.3± 6.1 mV respectivamente para el control y JNJ7777120 100 μM (Figura 2B1-B2).

45 Por el contrario, JNJ7777120 y JNJ10191584 redujeron el número medio de potenciales de acción provocados por etapas de una manera dependiente de la dosis (Figura 2C). En la concentración de 100 nM, la frecuencia de disparos de A.P. se inhibió ligeramente en 25.2 ± 2.0% (n = 3) y 21.6 ± 1.7% (n = 2) respectivamente para JNJ10191584 y JNJ7777120 (Figura 2C₁-C₂). El potencial de membrana en reposo de los SGN no se vio afectado por los antagonistas de H4R (en promedio -0.13 ± 0.4 mV de diferencia con JNJ10191584 y 0.55 ± 0.2 mV (n = 2) en promedio en presencia de JNJ7777120 contra control). Del mismo modo, el umbral del potencial de acción no varió significativamente en presencia de antagonistas de H4R (datos no mostrados). A una concentración de 100 μM, tanto JNJ10191584 como JNJ7777120 tuvieron un efecto inhibitor mayor en la frecuencia de AP JNJ10191584 y JNJ7777120 (100 μM) inhibieron la frecuencia en respectivamente 46.2 ± 12% (n = 3) y en 69.05 ± 8% (n = 3)

(Figura 2C₂-C₃). Después de un período de lavado, la frecuencia del potencial de acción aumentó hasta un 70% de la frecuencia medida en las condiciones de control. Además, en presencia de una alta concentración del antagonista de H4R JNJ10191584, el potencial de membrana en reposo no se vio afectado (aumento de 1.5 ± 1 mV frente al control). No obstante, aunque el número de A.P disminuyó en presencia de cualquiera de los antagonistas de H4R, el primer pico no se vio afectado; esto es coherente con una acción moduladora de los compuestos sobre la excitabilidad de SGN en lugar de un efecto de bloqueo puro.

Usando las preparaciones cocleares semiintactas (ex vivo), probamos la eficacia de JNJ10191584 para disminuir la descarga del potencial de acción espontáneo (impulsado sinápticamente) registrado desde los SGN con una configuración de parche suelto. En nuestras condiciones, pocas SGN han mostrado actividad espontánea (9 de 41 SGN registradas). Los registros de la membrana citoplásmica de los SGN en presencia de una capa de mielina grande envolviendo no solo sus neuritas sino también los cuerpos de las células (Figura 3A) limitaron el número de registros exitosos. La frecuencia de A.P espontánea varió de 0.1 a un máximo de 3 Hz (en promedio 1.08 ± 0.3 Hz, $n = 9$). En dos experimentos, la descarga del potencial de acción espontánea de baja frecuencia se anuló por completo dentro de los dos minutos posteriores al comienzo de una aplicación de baño de $100 \mu\text{M}$ de JNJ10191584 (Figura 3B).

Para comprobar si los antagonistas de H4R son capaces de modular la excitabilidad de SGN en un estado "patológico" (similar a los SGN hiperexcitables en modelos de tinnitus), se está probando la eficacia de estos compuestos en SGN con una mayor descarga de A.P. Tal hiperexcitabilidad de los SGN se puede inducir, por ejemplo, mediante salicilato de sodio 3-5 mM, que se sabe que potencia fuertemente el A.P inducido sinápticamente en roedores. El resultado positivo de este experimento refuerza la eficacia moduladora de los antagonistas de H4R en picos sostenidos SGN o cualquier tipo de SGN que tendrían una mayor actividad de descarga de A.P.

Ejemplo 3: Eficacia de los antagonistas de H4R para disminuir el modelo de comportamiento del tinnitus

El objetivo de estas pruebas in vivo es medir la eficacia de los antagonistas de H4R para disminuir los síntomas de tinnitus (transitorios y permanentes) inducidos por salicilato de sodio o por la exposición al ruido de alto nivel. La evaluación de la eficacia se lleva a cabo en ratas adultas usando la prueba de tinnitus desarrollada por Turner et al., 2006: the Gap-Prepulse Inhibition of Acoustic Startle (GPIAS) behavioral model. Este modelo usa un hueco en un fondo acústico constante como un preestímulo que reduce la amplitud del reflejo acústico de sobresalto. Las ratas que perciben el tinnitus en una frecuencia específica han disminuido la detección del hueco incrustado en bandas similares a la frecuencia del tinnitus. La reducción de la eficiencia de la puerta del hueco produce un sobresalto acústico más grande (GPIAS reducido).

El nivel de GPIAS se mide en condiciones iniciales en una cohorte de 6 a 8 ratas adultas.

El tinnitus es inducido por una administración i.p. del salicilato sódico (250 mg/kg) y GPIAS se mide en T1h después de la inducción para medir la reducción en GPIAS (que confirma la presencia de tinnitus). Las ratas se tratan con antagonistas H4R (administración i.p. individual) o con el vehículo el mismo día y se mide GPIAS en diferentes momentos según el perfil PK de los compuestos.

Alternativamente, el tinnitus es inducido por una exposición unilateral a un ruido de banda estrecha de 12 kHz presentado a 120-126 dB SPL (la oreja contralateral está protegida con un tapón auditivo) durante 2 h. Se utilizan dos tipos de ruido para esta forma de inducción del tinnitus: ruido de 120 dB para inducir un tinnitus transitorio (que dura hasta 2 días) y 126 dB para inducir un tinnitus permanente (que dura ≥ 10 días). Para estos experimentos de "exposición al ruido", todas las ratas se anestesiaron con gas isoflurano y se colocaron en una almohadilla térmica de control de temperatura. Se usa una exposición de 120-126 dB para inducir tinnitus y se mide GPIAS 24 h después de la exposición para evaluar la reducción en GPIAS (que confirma la presencia de tinnitus transitorio inducido por ruido); y hasta 10 días para confirmar la presencia de un tinnitus permanente (inducido por el ruido). Los animales con tinnitus transitorio se tratan con antagonistas de H4R (administración i.p. individual) T24h después de la inducción de tinnitus y los cambios en GPIAS se miden en diferentes puntos de tiempo según el perfil de PK de los antagonistas de H4R. De forma similar, los animales con tinnitus permanente (≥ 10 días) se tratan con antagonistas de H4R (administración individual i.p.) el día 11 después de la inducción del tinnitus y se miden los cambios en GPIAS en diferentes momentos.

El aumento en los valores de GPIAS en ratas tratadas con antagonistas de H4R (JNJ7777120 y JNJ10191584) en comparación con la condición de pretratamiento (salicilato solo) o el tratamiento simulado (vehículo solo) mostrará una mejora del tinnitus en estos modelos.

Material

Fármacos/productos químicos: La 1-[(5-Chloro-1H-bencimidazol-2-il)carbonil]-4-metil piperazina (JNJ 10191584) y la 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metil piperazina maleato (JNJ 7777120) se adquirieron de Axon Medchem BV (Groningen, The Netherlands). Las soluciones madre se prepararon a 60 mM en dimetilsulfóxido al 100% según lo

recomendado por los proveedores. A continuación, los fármacos se diluyeron el día del experimento en la solución de registro de acuerdo con lo anterior para obtener concentraciones de 100 nM y 100 μ M para ambos compuestos.

Lista de secuencias

<110> SENSORION

5 WERSINGER, Eric

<120> Inhibidores del receptor H4 para el tratamiento de tinnitus

<130> CV - 218/EP

<140> EP13727899.0

<141> 2013-06-10

10 <150> US61/657,460

<151> 2012-06-08

<160> 8

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

15 <211> 1593

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> Secuencia del receptor de la histamina 4

20 <400> 1

ES 2 683 380 T3

agtggaaactt ctgtagtggc ccattattta atgtgatgtc ggagtctaac ggcactgacg 60
 tcttgccact gactgctcaa gtccccttgg catttttaat gtccctgctt gcttttgcta 120
 taacgatagg caatgctgtg gtcattttag cctttgtagc agacagaaac cttagacatc 180
 gaagtaatta tttttttcct aatttggcta tttctgactt cttcgtgggt gtcactcca 240
 ttcctctgta catccctcac acgctgttta actggaattt tgggaagtga atctgcatgt 300
 tttggctcat tactgactat cttttgtgca cagcatccgt ctacagtatt gtcctcatta 360
 gctacgatcg ataccagtca gtttcaaacg ctgtgctgta tagagcacag cacactggca 420
 tcctgaaaat tgttgctcaa atgggtggctg tttggatact ggctttcttg gtcaatggcc 480
 caatgattct ggcttcggat tcttgggaaga acagcaccaa cacagaggag tgcgagcctg 540
 gctttgttac tgagtggtag atcctcgcca ttacagcatt cttggaattc ctgctccctg 600
 tctccttggg ggtctatttc agtgtacaga tttactggag cctgtggaag cgtgggagtc 660
 tcagtaggtg ccctagccac gctggattca tcgctacctc ttccaggggc actggacact 720
 cacgcagaac tgggttggct tgtaggacaa gtcttcctgg attaaaggaa ccagccgcat 780
 cccttcattc agaaagtcca cgaggaaaga gcagtctcct ggtgtcctta aggactcaca 840
 tgagcggtag tatcatcgcc ttcaaagtgg gttccttctg ccgatcagaa agcccagtgc 900
 ttaccagag agagcacgtg gagcttctca gaggcaggaa gctagccagg tcgctagctg 960
 tcctcctgag tgcttttgcc atttgctggg ctccgtattg cctgttcaca attgttcttt 1020

 caacttatcg cagaggggag cgccccaaat cgatttggtg cagcatagcc ttttggctac 1080
 agtgggtcaa ttcacttatt aatcccttcc tatacccttt gtgccacaga cgtttccaga 1140
 aggctttctg gaagatactc tgtgtgacaa agcaaccagc accttcacag acccagtcag 1200
 tatcttcttg aggagaagct tcatgtgtgc cagcttctgt ctctgtcccc tgaacggatc 1260
 taagcttcca tcttgctctg tccactcgag caaacaatgc acaaaatgta atgttcgaca 1320
 attttaataa aaaccctcca cattcaagtc agtggaacac gagccaacag cagttaagg 1380
 aacgtgacaa actgacagct gcaaaaatac taatattttc ctcagtgtc tctgtctctt 1440
 ttttgataca acattgattg tgttaccctt gtcttcttcc tgtctcagtg tttctccaa 1500
 tagcattagt ttctttgtgt gtatatgtgt gcgtgtgtgc atgtgtacat ctatgtgggtg 1560
 tgtacatgta tctatgtgtg tgcattgtga tct 1593

<210> 2

<211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador de avance 1 H4R
 <400> 2
 tgtgatgtcg gagtctaacg 20
 <210> 3
 <211> 20
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador reverso 1 H4R
 <400> 3
 15 cgaggatgta ccactcagta 20
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> H4R Cebador de avance 2
 <400> 4
 gccactgact gctcaagttc cct 23
 <210> 5
 25 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador reverso 2 H4R
 30 <400> 5
 ccaggctcgc actcctctgt gt 22
 <210> 6
 <211> 1306

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<220>

<223> Secuencia GAPDH

5 <400> 6

```

ggggctctct gctcctccct gttctagaga cagccgcata ttcttgtgca gtgccagcct      60
cgtctcatag acaagatggg gaaggtcggg gtgaacggat ttggccgat cggacgcctg      120
gttaccaggg ctgccttctc ttgtgacaaa gtggacattg ttgccatcaa cgacccttc      180
attgacctca actacatggg ctacatgttc cagtatgact ctaccacggg caagttcaac      240
ggcacagtca aggctgagaa tgggaagctg gtcatcaacg ggaaacccat caccatcttc      300
caggagcgag atcccgctaa catcaaattg ggtgatgctg gtgctgagta tgtcgtggag      360
tctactggcg tcttcaccac catggagaag gctggggctc acctgaaggg tggggccaaa      420
agggtcatca tctccgcccc tctcgctgat gccccatgt ttgtgatggg tgtgaaccac      480
gagaaatatg acaactccct caagattgtc agcaatgcat cctgcaccac caactgctta      540
gccccctgg ccaaggtcat ccatgacaac tttggcatcg tgggaagggt catgaccaca      600
gtccatgcca tcaactgccac tcagaagact gtggatggcc cctctggaaa gctgtggcgt      660
gatggccgtg gggcagccca gaacatcadc cctgcatcca ctggtgctgc caaggctgtg      720
ggcaagggtca tcccagagct gaacgggaag ctcaactggca tggccttccg tgttcctacc      780
cccaatgtat ccgttgtgga tctgacatgc cgctggaga aacctgcca gtatgatgac      840
atcaagaagg tggatgaagca ggcggccgag ggcccactaa agggcatcct gggctacact      900
gaggaccagg ttgtctcctg tgacttcaac agcaactccc attcttccac ctttgatgct      960
ggggctggca ttgctctcaa tgacaacttt gtgaagctca tttcctggta tgacaatgaa     1020
tatggctaca gcaacagggt ggtggacctc atggcctaca tggcctccaa ggagtaagaa     1080
accctggacc acccagccca gcaaggatac tgagagcaag agagaggccc tcagttgctg     1140
aggagtcccc atcccaactc agcccccaac actgagcadc tcctcacia ttccatccca     1200
gacccataa caacaggagg ggctgggga gccctcctt ctctcgaata ccatcaataa     1260
agttcgctgc accctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa                       1306

```

<210> 7

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de avance GAPDH

<400> 7

5 ggtgaaggtc ggtgtgaacg gattt 25

<210> 8

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador reverso GAPDH

<400> 8

gatgccaag ttgtcatgga tgacc 25

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor del receptor de la histamina tipo 4 (H4R) para uso en el tratamiento del tinnitus, en el que dicho inhibidor de H4R se selecciona entre:

- 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina,
- 5 - 4-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-d]pirimidin-2-ilamina,
- cis-4-(piperazin-1-il)-5,6,7a,8,9,10,11,11a-octahidrobenzofuro[2,3-h] quinazolin-2-amina,
- 7-(furan-2-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-amina,
- 1-(7-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-ciclopentilketona,
- 1-[(5-cloro-1H-bencimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina maleato,
- 10 - N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina,
- N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina tartrato,
- (R)-4-(3-amino-pirrolidin-1-il)-6-isopropil-pirimidin-2-ilamina,
- 2-isobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-isobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 15 - 2-ciclohexilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(4-fluorobencil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-tert-butil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-isopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 20 - 2-(ciclopropilmetil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-tert-butil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-isopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 25 - 6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina,
- 6-(3-aminoazetidín-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina,
- 2-isobutil-6-(3-metil-3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 6-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina,
- 2-ciclobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 30 - 2-ciclobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclopentil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclopentil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(2,2-dimetilpropil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(2,2-dimetilpropil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,

- 2-(2-ciclopentiletil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclohexilmetil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclopropilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclohexil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 5 - 2-ciclohexil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina, y
 - 2-(4-fluorobencil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina.
2. El inhibidor para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor es:
- 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina,
 - 4-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-d]pirimidin-2-ilamina,
 - 10 - cis-4-(piperazin-1-il)-5,6,7a,8,9,10,11,11a-octahidrobenzofuro[2,3-h]quinazolin-2-amina,
 - 7-(furan-2-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-amina,
 - 1-(7-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-ciclopentiletanona,
 - 1-[(5-cloro-1H-bencimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina maleato,
 - N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina,
 - 15 - N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina tartrato,
 - (R)-4-(3-amino-pirrolidin-1-il)-6-isopropil-pirimidin-2-ilamina, o
 - 2-isobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina.
3. El inhibidor para uso según la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor es:
- 2-isobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 20 - 2-isobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclohexilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-(4-fluorobencil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-tert-butil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 25 - 2-isopropil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-(ciclopropilmetil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina,
 - 2-ciclopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 2-tert-butil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 30 - 2-isopropil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
 - 6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)-2-(fenoximetil)pirimidin-4-amina,
 - 6-(3-aminoazetidín-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina,
 - 2-isobutil-6-(3-metil-3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,

- 6-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-2-isobutilpirimidin-4-amina,
- 2-ciclobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclobutil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclopentil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 5 - 2-ciclopentil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(2,2-dimetilpropil)-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(2,2-dimetilpropil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-(2-ciclopentiletil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclohexilmetil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 10 - 2-ciclopropilmetil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclohexil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina,
- 2-ciclohexil-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina, o
- 2-(4-fluorobencil)-6-((3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il)pirimidin-4-amina.
- 15 4. El inhibidor para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho inhibidor es 2-isobutil-6-(3-(metilamino)azetidín-1-il)pirimidin-4-amina.
- 5. El inhibidor para uso según la reivindicación 1 o 2, en el que dicho inhibidor se selecciona entre:
 - 1-[(5-cloro-1H-indol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina,
 - 4-((3R)-3-aminopirrolidin-1-il)-6,7-dihidro-5H-benzo[6,7]ciclohepta[1,2-d]pirimidin-2-ilamina,
 - cis-4-(piperazin-1-il)-5,6,7a,8,9,10,11,11a-octahidrobenzofuro[2,3-h]quinazolin-2-amina,
 - 20 - 7-(furan-2-il)-4-(piperazin-1-il)quinazolin-2-amina,
 - 1-(7-(2-amino-6-(4-metilpiperazin-1-il)pirimidin-4-il)-3,4-dihidroisoquinolin-2(1H)-il)-2-ciclopentilketona,
 - 1-[(5-cloro-1H-benzimidazol-2-il)carbonil]-4-metilpiperazina maleato,
 - N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina,
 - N⁴-(ciclopropilmetil)-6-[(3R)-3-(metilamino)pirrolidin-1-il]pirimidina-2,4-diamina tartrato, y
 - 25 - (R)-4-(3-amino-pirrolidin-1-il)-6-isopropil-pirimidin-2-ilamina.
- 6. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de H4R según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de tinnitus.

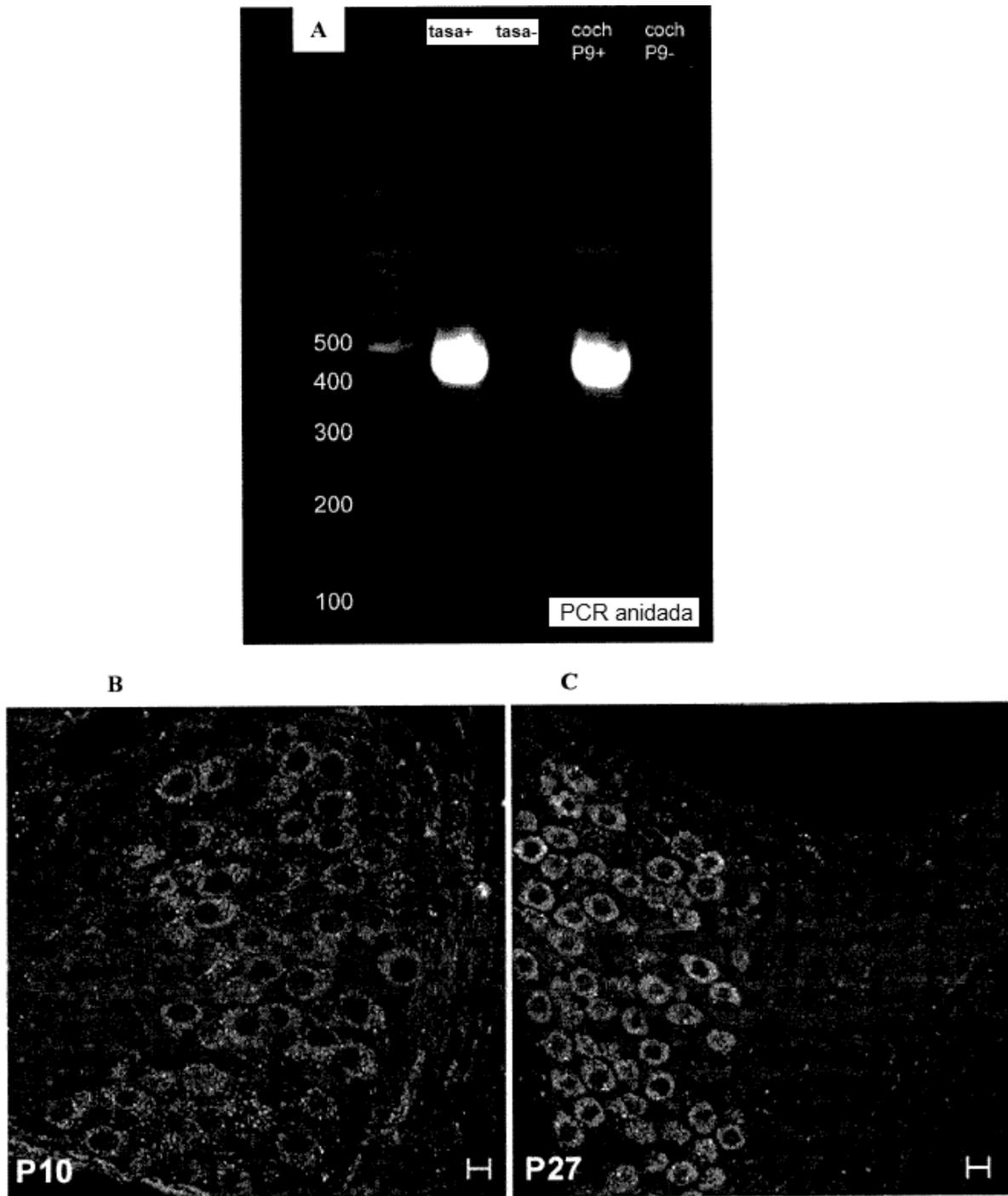


FIG. 1

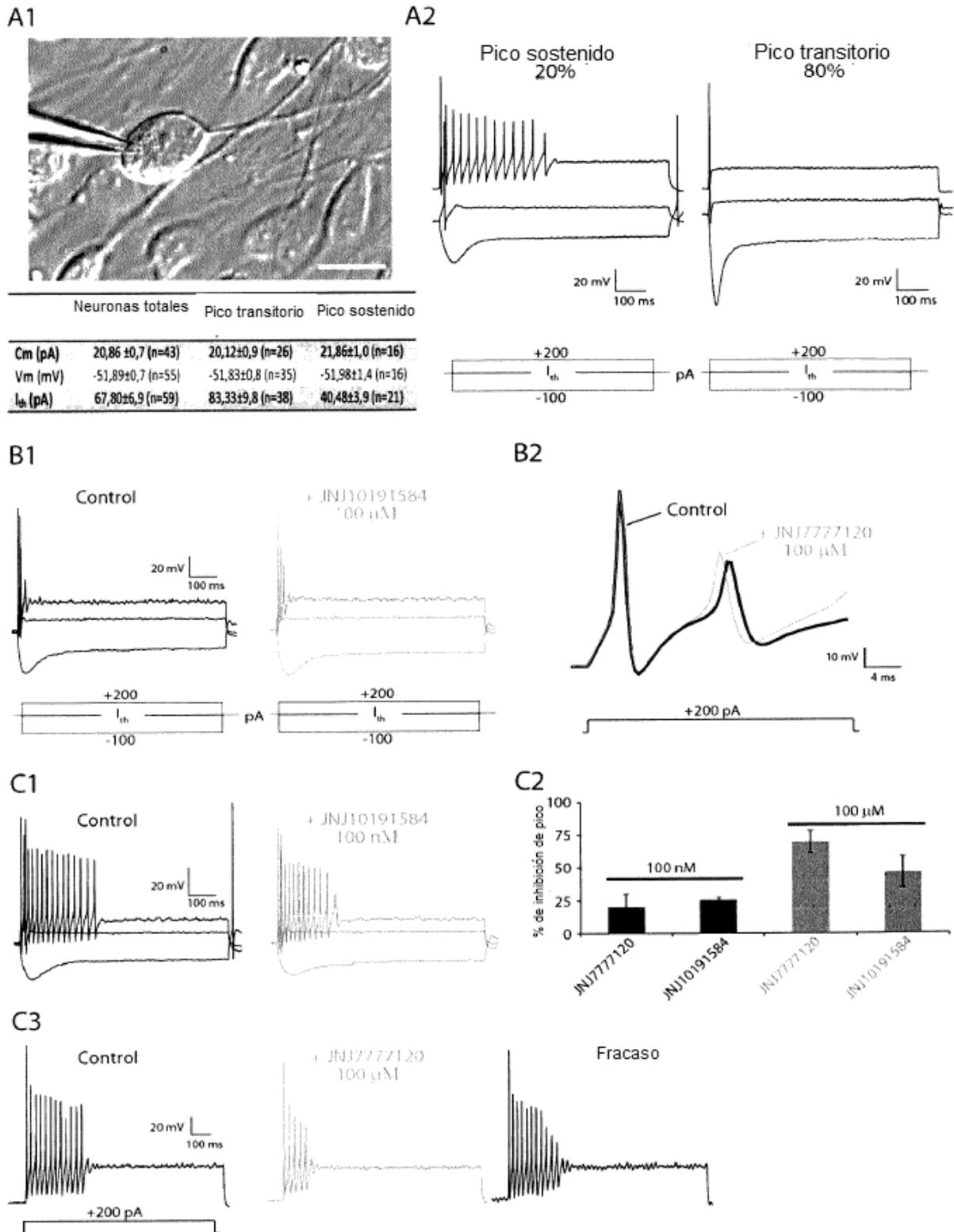
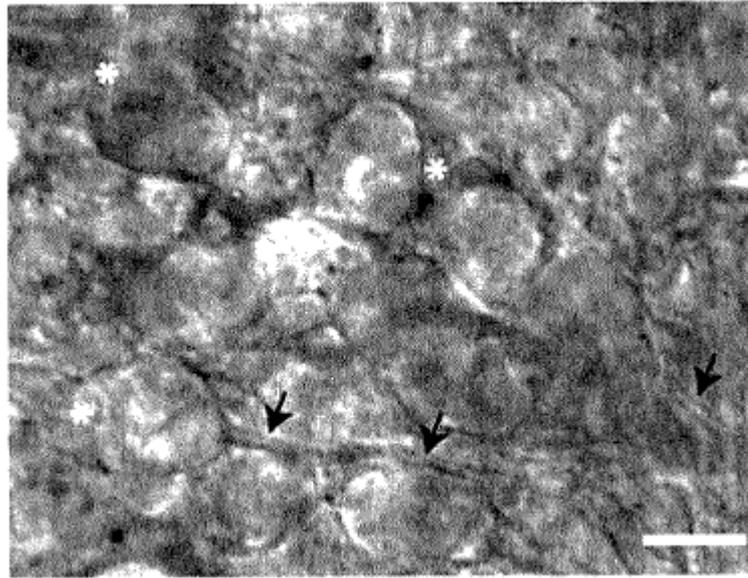


FIG. 2

A



B

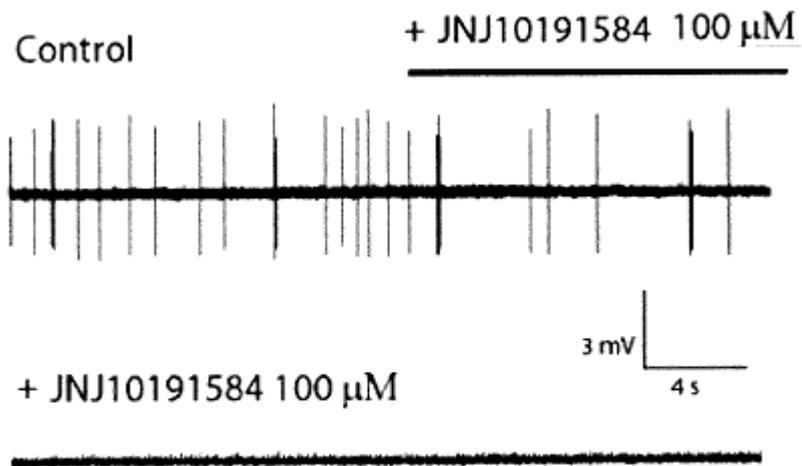


FIG. 3