

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 139**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07D 471/14 (2006.01)
A61K 31/55 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 487/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016 PCT/US2016/040612**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2017 WO17007702**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16741742 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 3319967**

54 Título: **Compuestos inhibidores de la señalización de la ruta de Notch**

30 Prioridad:

07.07.2015 US 201562189393 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2019

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (50.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US y
AUDION THERAPEUTICS (50.0%)

72 Inventor/es:

CLAY, JULIA MARIE;
EDGE, ALBERT;
HIPSKIND, PHILIP ARTHUR;
GILL, JOHN C.;
PATEL, BHARVIN KUMAR;
VAN ES, HELMUTH HENDRIKUS GERARDUS;
WROBLESKI, AARON D. y
ZHAO, GAIYING

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 735 139 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 inhibidores de la señalización de la ruta de Notch

La pérdida de las células ciliadas sensoriales en el oído interno a través del envejecimiento, la exposición al ruido, la exposición a agentes químicos, medicamentos, enfermedades y trastornos genéticos causa trastornos de la audición en muchas personas cada año. Independientemente de la etiología, la muerte o disfunción de las células ciliadas mecanosensoriales ubicadas dentro del órgano de Corti de la cóclea es la causa principal de la pérdida auditiva neurosensorial (SNHL, de sus siglas en inglés). Las medidas profilácticas para inhibir la pérdida auditiva se limitan principalmente a la protección periférica, tal como tapones para los oídos o reducción de ruido o cancelación de auriculares. Los tratamientos actuales para la SNHL se basan principalmente en tecnologías electrónicas, tales como la amplificación del sonido con audífonos o la derivación de las células ciliadas mediante estimulación eléctrica de las neuronas del ganglio espiral supervivientes que utilizan implantes cocleares. La administración de esteroides, para proporcionar terapia sistémica o terapia intratimpánica también se ha sugerido para la pérdida auditiva neurosensorial súbita.

El epitelio sensorial coclear contiene células ciliadas adaptadas para la detección de la vibración del sonido, que se transduce mediante los estereocilios en las superficies apicales de las células ciliadas en impulsos eléctricos y se transmiten al cerebro a través del nervio craneal VIII. Las células ciliadas auditivas producidas durante el desarrollo son postmitóticas y no se reemplazan después de la pérdida o como parte del recambio celular normal en mamíferos. Como resultado, la SNHL debido a la pérdida de células ciliadas auditivas es irreversible. El desarrollo de las células ciliadas auditivas durante el período embrionario incluye una diferenciación, en la cual las células epiteliales prosensoriales adquieren destinos diferentes, ya sean células ciliadas o células de sostén, a través de un procedimiento de inhibición lateral que está mediado por la señalización de Notch. Se evita que las células epiteliales prosensoriales se diferencien en células ciliadas mediante la señalización activa de Notch estimulada por ligandos en células ciliadas adyacentes. Estas células se convierten en células de sostén.

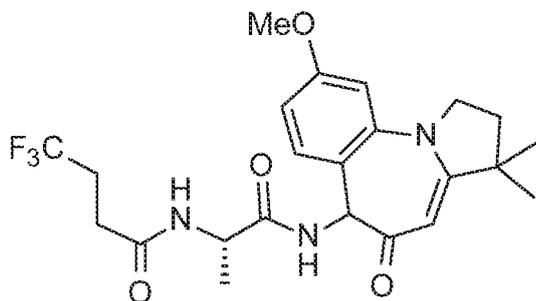
La señalización de Notch es una ruta conservada evolutivamente que desempeña un papel integral en el desarrollo y la homeostasis tisular en mamíferos. Los receptores y ligandos de Notch contienen dominios transmembrana de un solo paso, se expresan en la superficie celular y, por esa razón, la señalización de Notch es particularmente importante para mediar la comunicación entre células adyacentes que expresan los receptores y los ligandos. Hay cuatro receptores Notch conocidos en roedores y seres humanos, denominados Notch 1 a Notch 4. Los receptores Notch son proteínas heterodiméricas compuestas de dominios extracelulares e intracelulares que se sintetizan inicialmente como un único polipéptido. La interacción receptor-ligando desencadena una serie de escisiones proteolíticas del polipéptido del receptor Notch en las que está implicada la actividad de la γ -secretasa. La actividad de la γ -secretasa escinde el dominio intracelular de Notch del lado interno de la membrana plasmática que se transloca al núcleo para formar un complejo de factor de transcripción. El dominio intracelular de Notch (NICD, de sus siglas en inglés) es la forma activa de la proteína. Varias funciones de señalización de Notch incluyen proliferación, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, migración y autorrenovación. Estas diversas funciones de la señalización de Notch durante el desarrollo y mantenimiento de los tejidos normales se pueden activar de manera anormal en diferentes formas de cáncer. Las funciones oncogénicas de la señalización de Notch incluyen la inhibición de la apoptosis y la promoción de la proliferación celular.

La γ -secretasa desempeña un papel fundamental en la cascada de activación de Notch. Como resultado, los inhibidores de la γ -secretasa han sido investigados activamente por su potencial para bloquear la activación del receptor Notch para el tratamiento del cáncer. No han surgido fármacos quimioterapéuticos comerciales con inhibidores de Notch aunque los ensayos clínicos continúan.

La γ -secretasa, a través de la ruta de señalización de Notch, también desempeña un papel fundamental en la diferenciación de células prosensoriales. Como resultado, los inhibidores de la γ -secretasa han sido investigados activamente por su potencial para bloquear la activación del receptor Notch para el tratamiento de la SNHL. En lugar de administrar un agente inhibidor de Notch mediante diversos procedimientos para la entrada en circulación sistémica para inducir la expresión del homólogo 1 atonal (*Atoh1* o *Math1*) a niveles anormalmente elevados y durante largos períodos de tiempo, sería útil y deseable inducir la expresión de *Atoh1*, en el ambiente coclear, a un nivel de expresión y período de tiempo más específico. La incapacidad para modular *Atoh1* sigue siendo un obstáculo para la investigación en células ciliadas auditivas y el desarrollo de terapias para la regeneración de células ciliadas auditivas. Aunque la investigación continúa, tal como el documento WO 2014/039781, no ha surgido ningún inhibidor comercial de Notch para tratar la pérdida auditiva neurosensorial causada por la pérdida de células ciliadas auditivas.

Existe la necesidad de encontrar compuestos que tengan actividad inhibidora de la señalización de la ruta de Notch. Existe una necesidad adicional de encontrar compuestos que inhiban la señalización de la ruta de Notch mediante la actividad inhibidora de la γ -secretasa. También existe la necesidad de encontrar compuestos que posean características estructurales distintas que puedan contribuir a la señalización de la ruta de Notch y la actividad inhibidora de la γ -secretasa. Otra necesidad es encontrar compuestos que induzcan la expresión de *Atoh1* mediante la inhibición de la señalización de la ruta de Notch. Existe una necesidad adicional de encontrar compuestos que demuestren propiedades deseables de absorción, distribución, metabolismo y excreción.

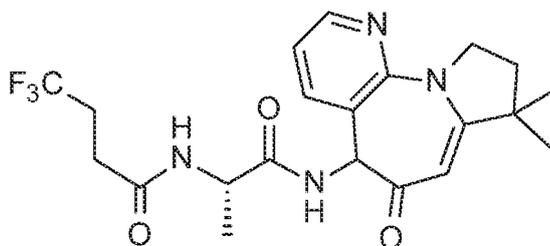
Un aspecto de la invención es proporcionar un compuesto de la estructura:



Compuesto 1

5 4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzof[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida o un isómero sustancialmente diastereoméricamente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

Un aspecto más de la invención es un compuesto de la estructura:



Compuesto 2

10 N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida o un isómero sustancialmente diastereoméricamente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

15 Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende o el compuesto 1 o un diastereómero sustancialmente puro del mismo o el compuesto 2 o un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un cáncer que es leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de piel, meduloblastoma, angiosarcoma, rhabdomioma, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático y extrahepático y carcinoma adenoide quístico en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una
25 cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 Un aspecto más de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un cáncer de pulmón en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida de células ciliadas auditivas en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho paciente.

- 5 Un aspecto más de la presente divulgación proporciona un procedimiento para inducir la generación de células ciliadas auditivas en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho paciente.
- Otro aspecto de la presente invención proporciona el compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.
- 10 Un aspecto más de la presente invención proporciona el compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de piel, meduloblastoma, angiosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático o extrahepático o carcinoma adenoide quístico.
- 15 Otro aspecto más de la presente invención proporciona el compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón.
- 20 Un aspecto más de la presente invención proporciona el compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de la pérdida auditiva neurosensorial provocada por la pérdida de células ciliadas auditivas.
- 25 Un aspecto más de la presente invención proporciona el compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inducción de la generación de células ciliadas auditivas.
- 30 Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de piel, meduloblastoma, angiosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático o extrahepático o carcinoma adenoide quístico.
- 35 Otro aspecto más de la presente invención proporciona el uso del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón.
- 40 Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida de células ciliadas auditivas.
- 45 Un aspecto más de la presente invención proporciona el uso del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la fabricación de un medicamento para inducir la generación de células ciliadas auditivas.
- 50 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para tratar la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida de células ciliadas auditivas en un animal de compañía que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho animal de compañía canino.
- 55 Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para inducir la generación de células ciliadas auditivas en

un animal de compañía canino que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, a dicho animal de compañía canino.

5 La frase "compuesto 1, un diastereómero del mismo", significa 4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida o un diastereómero 4,4,4-trifluoro-N-((S)-1-(((S)-9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida o 4,4,4-trifluoro-N-((S)-1-(((R)-9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida. De forma similar, la frase "compuesto 2, un diastereómero del mismo" significa N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida o un diastereómero N-((S)-1-(((S)-8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida o N-((S)-1-(((R)-8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida.

15 El término "paciente" significa mamífero y "mamífero" incluye, pero no se limita a, un ser humano después del período postnatal. El período postnatal en un ser humano es el período que comienza inmediatamente después del nacimiento y se extiende durante 30 días.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la dosis del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo, que es el isómero 1 o isómero 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo, que es el isómero 1 o isómero 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica que contiene cualquiera de los anteriores, necesario para inhibir la señalización Notch en un paciente con cáncer y o bien destruir el objetivo (células cancerígenas) o ralentizar o detener la progresión del cáncer en un paciente. De forma similar, "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" significa la dosis del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo, que es el isómero 1 o isómero 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo, que es el isómero 1 o isómero 2 o una sal farmacéuticamente eficaz del mismo o una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los anteriores, necesario para inhibir la señalización Notch en un paciente con pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida o lesión de las células ciliadas auditivas o para inducir la generación de las células ciliadas auditivas.

30 El compuesto 1 o el compuesto 2 es "sustancialmente diastereoméricamente puro" y un "diastereómero sustancialmente puro del compuesto 1 o el compuesto 2", es cuando la pureza isomérica en la posición 6 del compuesto 1 o la posición 5 del compuesto 2, es superior al 90 % de exceso enantiomérico. En otra realización, la pureza isomérica es superior al 95 % de exceso enantiomérico en la posición 6 del compuesto 1 o la posición 5 del compuesto 2. En otra realización más, la pureza isomérica es superior al 98 % de exceso enantiomérico en la posición 6 del compuesto 1 o la posición 5 del compuesto 2. En otra realización más, la pureza isomérica es superior al 99 % de exceso enantiomérico en la posición 6 del compuesto 1 o la posición 5 del compuesto 2. Todos los estereoisómeros, incluyendo mezclas diastereoméricas del compuesto 1 o el compuesto 2, están contemplados dentro de la presente invención.

40 Las dosificaciones previstas del compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar el cáncer están en el intervalo de 0,1 a 100 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones preferidas están en el intervalo de 1,0 a 75 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones más preferidas están en el intervalo de 2,0 a 50 mg/paciente/día. Las dosificaciones previstas del compuesto 1, un diastereómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida o lesión de las células ciliadas auditivas o inducir la generación de células ciliadas auditivas, están en el intervalo de 0,01 a 100 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones preferidas están en el intervalo de 0,1 a 10 mg/paciente/día. Se prevé que las dosificaciones más preferidas están en el intervalo de 0,2 a 1,0 mg/paciente/día.

50 Para cáncer, pérdida auditiva neurosensorial o inducción de generación de células ciliadas auditivas, un médico determinará la dosificación exacta requerida para tratar a un paciente y la duración del tratamiento a la vista de la fase y la gravedad de la enfermedad así como de las necesidades específicas y la respuesta del paciente individual. Aunque se expresa como dosificación en una base diaria, el régimen de administración puede ajustarse para proporcionar un mayor beneficio terapéutico a un paciente y para gestionar y mejorar cualquier toxicidad relacionada con el fármaco. Además de la administración diaria, puede ser apropiada la administración cada dos días (C2D); cada dos días durante un periodo de cinco días seguido de dos días sin dosificación (T.I.W.); cada tres días (C3D) durante un ciclo de dosificación de 21 días u otros regímenes de administración.

60 Los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata", se pretende que incluyan el espectro completo de intervención para el cáncer, la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida o lesión de las células ciliadas auditivas o para inducir la generación de células ciliadas auditivas, tal como la administración del compuesto activo para aliviar,

ralentizar o revertir uno o más de los síntomas y para retrasar la progresión del cáncer o la pérdida o lesión de las células ciliadas auditivas por los que el paciente está sufriendo o para inducir la generación de células ciliadas auditivas en el paciente.

5 "Animales de compañía canino" significa caninos domesticados y criados en el hogar incluyendo, pero sin limitarse a, mascotas, perros de servicio, perros de rescate, perros pastor y perros guardianes de ganado.

10 "Pérdida de audición auditiva", "pérdida de audición neurosensorial" o "pérdida de audición" en un ser humano significa que el umbral de audición (el sonido más suave escuchado (intensidad) a una frecuencia específica) en un paciente es de 21 a 40 dB para suave; de 41 a 55 dB para moderada; de 56 a 70 dB para moderadamente grave; de 71 a 90 dB para grave y de 91 dB en adelante para profunda. Las intensidades ensayadas normalmente varían desde 0 dB hasta 120 dB. Las frecuencias ensayadas son normalmente 250, 500, 1000, 2000, 4000 y 8000 Hz. Las evaluaciones diagnósticas de audición se llevan a cabo mediante pruebas de rutina conocidas y usadas por los expertos en la técnica incluyendo audiometría de tonos puros que incluye el promedio de tonos puros, audiometría del habla que incluye el umbral de recepción del habla, evaluaciones de respuesta auditiva del tronco encefálico (RATE), electrococleografía transtimpánica (ECOG) y la prueba de emisiones otoacústicas (EOA). Las evaluaciones pediátricas e infantiles también se llevan a cabo mediante pruebas de rutina conocidas y usadas por los expertos en la técnica incluyendo audiometría por refuerzo visual, audiometría por juego, emisiones otoacústicas (EOA) y evaluaciones de respuesta auditiva del tronco cerebral.

15 Un compuesto de la presente invención se formula preferentemente en forma de una composición farmacéutica con un vehículo farmacéuticamente aceptable y se administran por una diversidad de vías. Preferentemente, para tratar el cáncer, dichas composiciones son para administración oral.

20 Para el tratamiento de la pérdida de audición neurosensorial provocada por pérdida o lesión de las células ciliadas auditivas o para inducir la generación de células ciliadas auditivas, puede formularse y administrarse una composición farmacéutica adecuada para administración oral o parenteral para permitir terapia local o sistémica. Las composiciones orales incluyen comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina duras o blandas, soluciones, emulsiones o suspensiones. Pueden formularse composiciones parenterales para permitir la administración incluyendo inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intraesternal, transtimpánica, intralaberíntica o intracoclear o infusión. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para permitir que un compuesto de la invención esté biodisponible tras la administración de la composición a un paciente o formularse para permitir la liberación controlada o mantenida del principio farmacéutico activo. Es preferible una composición farmacéuticamente adecuada para la administración transtimpánica en la cavidad del oído medio y también es preferible la administración en el nicho de la ventana redonda del oído medio. También se contemplan la inyección intralaberíntica y la inyección intracoclear. La vía de administración preferida para el tratamiento de la pérdida de audición es la inyección transtimpánica local, sin embargo, esto no excluye composiciones farmacéuticas adecuadas para vías de administración alternativas para permitir el suministro sistémico y pueden incluir composiciones y regímenes de dosificación alternativos o además de la administración transtimpánica local. También es preferible una composición de administración local de liberación sostenida en la que el intervalo de liberación puede variar desde tres (3) días a noventa (90) días, dependiendo del vehículo de administración o la mezcla de agentes del vehículo de administración, en los que el compuesto 1 o un diastereómero sustancialmente puro o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, está asociado.

30 Se conocen bien en la técnica las composiciones farmacéuticas, los procedimientos para la preparación y los sistemas de administración para el suministro dirigido de fármacos. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, y col., eds., 19ª ed., Mack Publishing Co., 1995); Salt y Plontke, "Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear", *Audiol Neurotol*, 2009, (14); 350-360; Rhee, y col., "Sustained-Release Injectable Drug Delivery", *Pharmaceutical Technology, Special Issue Drug Delivery*, 1 de noviembre de 2010. Las composiciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, aromatizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes enmascarantes o antioxidantes.

35 Un compuesto de la presente invención es capaz de reaccionar con una variedad de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Dichas sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, P. Stahl, y col., *HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE*, (VCH/Wiley-VCH, 2002); S. M. Berge, y col., "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 66, n.º 1, enero de 1977.

40 El compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, pueden prepararse por una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, al igual que los descritos a continuación. Las etapas sintéticas específicas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar el compuesto 1, un diastereómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o el compuesto 2, un diastereómero del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El compuesto 1 se denomina: 4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-

- benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida y también puede denominarse 4,4,4-trifluoro-N-((1S)-2-[(9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]-1-metil-2-oxoetil)butanamida; y también puede denominarse: butanamida, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-1-metil-2-oxo-2-[(2,3,5,6-tetrahidro-9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]etil]-; y pueden usarse otros nombres para identificar de forma inequívoca el compuesto 1. Los diastereómeros se denominan 4,4,4-trifluoro-N-((S)-1-((S)-9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida y 4,4,4-trifluoro-N-((S)-1-((R)-9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida. Pueden usarse otros nombres para identificar de forma inequívoca cada uno de los diastereómeros.
- El compuesto 2 se denomina: N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida y también puede denominarse N-((1S)-2-[(8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino]-1-metil-2-oxoetil)-4,4,4-trifluorobutanamida; y también puede denominarse: butanamida, 4,4,4-trifluoro-N-[(1S)-1-metil-2-oxo-2-[(6,8,9,10-tetrahidro-8,8-dimetil-6-oxo-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino]etil]-; y pueden usarse otros nombres para identificar de forma inequívoca el compuesto 2. Los diastereómeros se denominan N-((S)-1-((S)-8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida y N-((S)-1-((R)-8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida. Pueden usarse otros nombres para identificar de forma inequívoca cada uno de los diastereómeros.

Se entenderá que el compuesto 1 y el compuesto 2 se representan con uno o dos centros quirales fijos. En el presente documento, las designaciones de Cahn-Ingold-Prelog de (R)- y (S)- se usan para referirse a isómeros específicos. Los estereoisómeros específicos pueden prepararse por síntesis estereoespecífica usando materiales de partida enantioméricamente puros o enriquecidos. Los estereoisómeros específicos de cualquiera de los materiales de partida, intermedios o mezclas racémicas que incluyen el compuesto 1 o el compuesto 2 pueden resolverse por técnicas bien conocidas en la técnica, tales como las halladas en Stereochemistry of Organic Compounds, E. I. Eliel y S. H. Wilen (Wiley 1994) y Enantiomers, Racemates, and Resolutions, J., Jacques, A. Collet y S. H. Wilen (Wiley 1991), incluyendo cromatografía sobre fases estacionarias quirales, resoluciones enzimáticas, o cristalización fraccionada o cromatografía de diastereómeros formados para ese fin, tales como sales diastereoméricas. Cuando un compuesto quiral se aísla o se resuelve en sus isómeros, pero no se determinan las configuraciones absolutas o las rotaciones ópticas, los isómeros se denominan de manera arbitraria como isómero 1 e isómero 2, correspondiendo con el orden en que cada uno se eluye por cromatografía quiral y si la cromatografía quiral se inicia pronto en la síntesis, se aplica la misma designación a los intermedios y ejemplos subsiguientes. Si bien se contemplan incluidas dentro de la invención todas las mezclas que contienen los compuestos de la presente invención, la realización preferida es el compuesto 1, isómero 2 o el compuesto 2, isómero 2.

Los compuestos empleados como materiales de partida iniciales en la síntesis de los compuestos de la presente invención son bien conocidos y, en la medida en que no estén disponibles en el mercado, se sintetizan fácilmente usando las referencias específicas proporcionadas, mediante procedimientos convencionales normalmente empleados por los expertos habituales en la técnica o se encuentran en los textos generales de referencia.

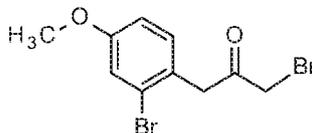
Los ejemplos de los procedimientos y métodos conocidos incluyen los descritos en textos generales de referencia tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, volúmenes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions Mechanisms, and Structure, 5ª edición, Michael B. Smith y Jerry March, Wiley Interscience, 2001; Advanced Organic Chemistry, 4ª edición, parte B, Reactions and Synthesis, Francis A. Carey y Richard J. Sundberg, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2000, etc. y referencias citadas en ese documento.

Tal como se utilizan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados que se indican: "mAtoh1" se refiere a la proteína homóloga 1 atonal murina; "hAtoh 1 se refiere a la proteína homóloga 1 atonal humana; "Atoh1" se refiere al homólogo 1 atonal del gen humano; "Medio básico" se refiere a 500 ml de medio DMEM/F12 + 5 ml de reserva de N2 100X y 10 ml de reserva de B27 50X más 500 µl de reserva de ampicilina (1000X, 50 mg/ml) y 1667 µl de Fungizone (300X); "BFGF" se refiere a factor de crecimiento fibroblástico básico; "DMEM" se refiere a Medio Eagle Modificado por Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminatetraacético; "EGF" se refiere al factor de crecimiento epidérmico; "EGTA" se refiere a ácido etilenglicol-bis(2-aminooetiléter) -N,N,N',N'-tetraacético; ES/MS se refiere a la espectroscopia de masas por electropulverización; "FBS" se refiere a suero fetal bovino; "GFP" se refiere a la proteína verde fluorescente; "h" se refiere a hora u horas; "HBSS" se refiere a solución salina equilibrada de Hank; "HEK" se refiere a riñón embrionario humano; "Cl₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce un 50 % de la máxima respuesta inhibitoria posible para ese agente; "IgG" se refiere a inmunoglobulina G; "Math1" se refiere a homólogo 1 atonal del gen humano; "Medio A" se refiere a 200 ml de Medio Básico + EGF bFGF + IGF-1 + Sulfato de Heparano a 20, 10, 50 y 50 ng/ml respectivamente; "MEM" se refiere a medio esencial mínimo; "min" se refiere a minutos; "MS" se refiere a espectroscopia de masas; "N1ICD" se refiere a dominio intracelular de Notch1; "nGFP" se refiere a la proteína fluorescente verde nuclear; "OC" se refiere a órgano de Corti; "PBS" se refiere a solución salina tamponada con fosfato; "PBST" se refiere a la solución salina tamponada con fosfato + Tween®; "qPCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; "qRT-PCR" se refiere a reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa; "rpm" se refiere a revoluciones por minuto; "RLT buffer" se refiere a tampón de lisis RNeasy;

"RT" se refiere a la temperatura ambiente; "Tbp" se refiere a la proteína de unión a TATA;

Preparación 1

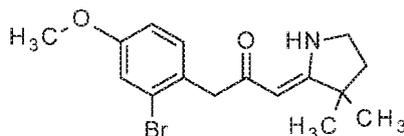
1-bromo-3-(2-bromo-4-metoxi-fenil)propan-2-ona



- 5 Añadir trimetilsilildiazometano (118,4 ml, 236,80 mmol, 2 M en hexanos) gota a gota a una solución en agitación a 0 °C de cloruro de 2-(2-bromo-4-metoxi-fenil)acetilo (52 g, 197,3 mmol) en tetrahidrofurano (197 ml) y acetonitrilo (197 ml) en atmósfera de nitrógeno. Después de 15 minutos dejar calentar a TA y agitar durante 2 h en atmósfera de nitrógeno. Concentrar para obtener un aceite espeso de color rojo (61 g). Añadir bromuro de hidrógeno (36 ml, 197 mmol, 33 % en ácido acético) gota a gota a una solución en agitación a 5 °C de azida de 2-(2-bromo-4-metoxi-fenil)acetilo de la etapa anterior en ácido acético (265 ml). Después de la adición, dejar enfriar a TA en atmósfera de nitrógeno. Después de 45 minutos, inactivar con hielo/agua, (500 ml) dando como resultado un precipitado de color pardo. Filtrar los sólidos y lavar con agua (100 ml) y hexanos (100 ml) y secar al vacío a 45 °C durante 2 h para producir el compuesto del título en forma de un aceite de color naranja (63,0 g, 99 %). RMN 1H (300 MHz, CDCl₃): 7,17-7,12 (m, 2H), 6,85 (dd, J = 2,5, 8,5 Hz, 1H), 4,03 (s, 2H), 3,97 (s, 2H), 3,79 (s, 3H).

15 Preparación 2

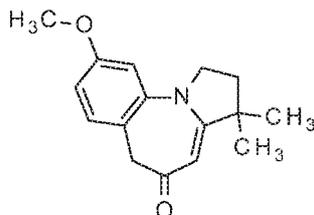
(3Z)-1-(2-bromo-4-metoxi-fenil)-3-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilideno)propan-2-ona



- 20 Añadir 3,3-dimetilpirrolidin-2-ona (26,5 g, 205 mmol) a una suspensión del intermedio proporcionado por la preparación 1, 1-bromo-3-(2-bromo-4-metoxi-fenil)propan-2-ona (60,00 g, 186 mmol) y yoduro potásico (31 g, 86 mmol) en tetrahidrofurano (600 ml) a TA en una porción y agitar durante 1 h. Añadir metil *tert*-butil éter (200 ml), eliminar por filtración los sólidos y aclarar la torta de filtro con metil-*tert*-butil éter (100 ml) para proporcionar yoduro de 1-(2-bromo-4-metoxi-fenil)-3-[(4,4-dimetil-2,3-dihidropirrol-1-ilo-5-il)sulfanil]propan-2-ona en forma de un sólido de color amarillo claro (100 g). A una suspensión del sólido (100 g, 201 mmol) en acetonitrilo (1 l), añadirle trietilamina (56 ml, 401 mmoles) y trifetilfosfina (58 g, 221 mmol) y agitar a 65 °C durante 2,5 h. Añadir metil *tert*-butil éter (200 ml) y eliminar los sólidos por filtración. Evaporar el filtrado, triturar el residuo con metil *tert*-butil éter (20 ml) y eliminar los sólidos por filtración (dos veces). Evaporar los filtrados combinados para obtener 50 g de material en bruto. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-50 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (41 g, 70 %). EM (m/z): 338,0/340,0 (M+/M+2).

30 Preparación 3

9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-A][1]benzazepin-5(6H)-ona

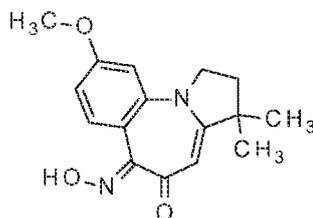


- 35 Desgasificar/enjuagar con nitrógeno (x3) una mezcla del intermedio proporcionado por la preparación 2, (3Z)-1-(2-bromo-4-metoxi-fenil)-3-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilideno)propan-2-ona (40,0 g, 118 mmol), acetato de paladio (2,7 g, 12 mmol), carbonato de cesio (77 g, 237 mmol), 4,5-bis(difenilfosfina)-9,9-dimetilxanteno (13,7 g, 24 mmol) y N-metil-2-pirrolidona (1,2 l). Calentar la suspensión a 150 °C durante 4 h. Enfriar a TA, eliminar los sólidos por filtración, lavar con acetato de etilo y descartar los sólidos. Añadir acetato de etilo (1 l) y agua (500 ml) al filtrado, eliminar los sólidos por filtración a través de tierra de diatomeas y descartar. Separar las capas filtradas, extraer de la capa acuosa con

acetato de etilo (2 x 20 ml), seguido de diclorometano (3 x 100 ml). Lavar las capas orgánicas combinadas dos veces con solución acuosa al 5 % de bicarbonato sódico, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para obtener 100 ml de un aceite de color pardo oscuro. Filtrar el material sobre un lecho de sílice eluyendo con diclorometano seguido por metanol al 1 %/diclorometano y concentrar el filtrado. Repartir el residuo entre acetato de etilo y solución acuosa al 5 % de bicarbonato sódico, volver a extraer del extracto acuoso con acetato de etilo, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para obtener el producto en bruto en forma de una espuma de color pardo oscuro. Disolver la espuma resultante en acetato de etilo (250 ml), añadir SiliaBond Thiol® (80 g) y agitar a TA durante una noche. Eliminar los sólidos por filtración, lavar la torta de filtro con acetato de etilo y diclorometano, concentrar el filtrado para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo claro (19,6 g, 65 %). EM (m/z): 258,0 (M+H).

Preparación 4

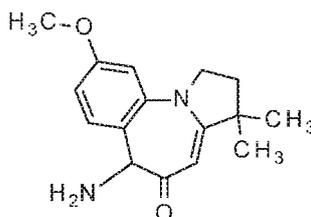
6-hidroxiimino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirroló[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona



Añadir *tert*-butóxido de potasio (11 g, 98 mmol) en varias porciones a una solución en agitación a 0 °C del intermedio proporcionado por la preparación 3, 9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-11H-pirroló[1,2-A][1]benzazepin-5(6H)-ona (16,8 g, 65 mmol), en tetrahidrofurano (336 ml) y agitar durante 15 minutos. Añadir nitrito de amilo (12,2 ml, 91 mmol) gota a gota y agitar la mezcla durante 30 minutos a 0 °C. Verter la mezcla de reacción sobre hielo/agua (200 ml) y extraer la mezcla con acetato de etilo (2 x 200 ml). Eliminar los sólidos cristalizados por filtración, extraer del filtrado con diclorometano (2 x 100 ml). Lavar los extractos orgánicos combinados con salmuera (100 ml), secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para proporcionar un sólido de color pardo claro. Triturar el sólido con 1:1 de metil *tert*-butil éter/hexano, combinar con el sólido recogido anteriormente para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo claro (16,5 g, 88 %). EM (m/z): 287,1 (M+H).

Preparación 5

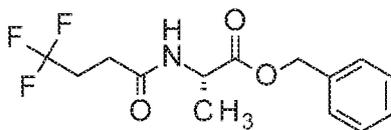
6-amino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirroló[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona



Añadir ácido trifluoroacético (17 ml, 231 mmol) gota a gota durante 10 minutos a una suspensión en agitación a 5 °C-10 °C del intermedio proporcionado por la preparación 4, 6-hidroxiimino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirroló[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona (16,5 g, 58 mmol) y polvo de cinc (11,3 g, 173 mmol) en diclorometano (248 ml), después dejar calentar a TA. Filtrar la mezcla a través de una almohadilla de tierra de diatomeas, verter el filtrado sobre una mezcla de hielo y carbonato sódico acuoso saturado (1:1, 500 ml). Filtrar la suspensión resultante a través de tierra de diatomeas y aclarar la almohadilla de filtro con diclorometano. Extraer de la capa acuosa con diclorometano (100 ml), secar las capas orgánicas combinadas sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para obtener el compuesto del título en forma de una espuma de color pardo claro (14,7 g, 94 %). EM (m/z); 273,1 (M+H).

Preparación 6

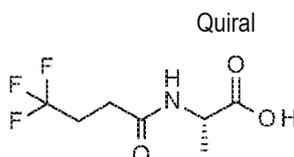
(2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoato de bencilo



- 5 Añadir clorhidrato del éster bencilico de L-alanina (7 g, 32,5 mmol), diisopropiletilamina (28 ml, 162 mmol), hidrato de hidroxibenzotriazol (7,5 g, 49 mmol) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (9,3 g, 49 mmol) a una solución en agitación de ácido 4,4,4-trifluorobutírico (7,1 g, 49 mmol) en diclorometano (162 ml) y agitar a TA en atmósfera de N₂ durante 20 h. Inactivar con solución acuosa al 20 % de ácido cítrico (150 ml), agitar la mezcla durante 5 minutos, separar las capas y extraer de la solución acuosa con diclorometano (100 ml). Lavar las capas orgánicas combinadas con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (150 ml), secar sobre sulfato de magnesio, filtrar y concentrar para obtener 10,6 g de un sólido de color amarillo claro. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 25-50 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (9,2 g, 94 %). EM (m/z): 304,2 (M+H).

Preparación 7

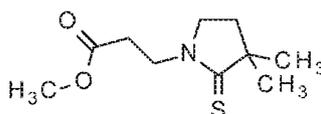
Ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanilamino)propanoico



- 15 Añadir paladio (1,8 g, 0,8 mmol, 5 % sobre C) a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 6, (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanilamino)propanoato de bencilo (8,8 g, 29 mmol) en metanol (88 ml) a TA. Desgasificar la mezcla y agitar en atmósfera de hidrógeno (atmósfera de globo) durante 5 h. Filtrar la mezcla sobre tierra de diatomeas, lavar la almohadilla con metanol y concentrar el filtrado para obtener un sólido de color blanco. Triturar los sólidos con diclorometano y secar al vacío durante una noche a TA para producir el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (6,11 g, 99 % de rendimiento). EM (m/z): 214,1 (M+H).

Preparación 8

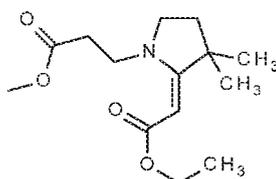
3-(3,3-dimetil-2-tioxopirrolidin-1-il)propanoato de metilo



- 25 Disolver 3,3-dimetilpirrolidin-2-tiona (15,7 g, 122 mmol) y acrilato de metilo (12 ml, 134 mmol) en tetrahidrofurano (100 ml) y agitar a TA en atmósfera de nitrógeno. Añadir hidróxido sódico (0,8 g, 20 mmol) y agitar durante una noche a TA en atmósfera de nitrógeno. Diluir con salmuera, extraer con acetato de etilo, separar las capas, lavar la capa orgánica con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para producir 27,5 g de sólidos en bruto. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 20-50 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color blanco (25,9 g, 99 %). EM (m/z): 216,2 (M+H).

Preparación 9

3-[(2Z)-2-(2-etoxi-2-oxo-etiliden)-3,3-dimetil-pirrolidin-1-il]propanoato de metilo

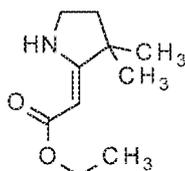


Añadir tetrakis(acetato)dirrodio (II) (3,74 g, 8,5 mmol) a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la

5 preparación 8, 3-(3,3-dimetil-2-tioxopirrolidin-1-il)propanoato de metilo (41,4 g, 192 mmol) en tolueno (156 ml) y calentar a 110 °C en atmósfera de nitrógeno. Añadir etildiazoacetato (89 ml, 844 mmol) gota a gota durante aproximadamente 18 h, después calentar durante una noche a 110 °C. Concentrar y purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con acetato de etilo al 30 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo (34,5 g, 67 %). EM (m/z): 270,2 (M+H).

Preparación 10

(2Z)-2-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilideno)acetato de etilo

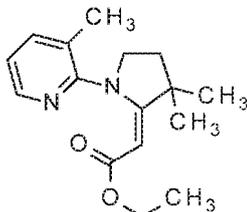


10 Añadir hexametildisilazida de potasio (301 ml, 0,5 M en tolueno, 151 mmol), gota a gota durante 45 minutos, a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 9, 3-[(2Z)-2-(2-etoxi-2-oxo-etilideno)-3,3-dimetilpirrolidin-1-il]propanoato de metilo (33,8 g, 126 mmol), en tetrahidrofurano (430 ml) en atmósfera de nitrógeno usando un baño de hielo/agua para mantener la temperatura <30 °C. Agitar durante 40 minutos tras completar la adición. Inactivar con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (250 ml), después concentrar. Repartir entre éter dietílico y solución de salmuera, extraer de la solución acuosa con acetato de etilo (x 4), secar sobre sulfato

15 sódico, filtrar y concentrar para obtener 37 g de material. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con acetato de etilo al 10 % en hexanos para obtener el compuesto del título (9,1 g, 40 %). EM (m/z): 184,2 (M+H).

Preparación 11

(2Z)-2-[3,3-dimetil-1-(3-metil-2-piridil)pirrolidin-2-ilideno]acetato de etilo

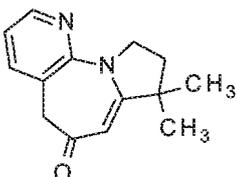


20 Combinar 2-bromo-3-metilpiridina (1,5 g, 8,7 mmol), el intermedio proporcionado por la preparación 10, (2Z)-2-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilideno)acetato de etilo (1,6 g, 8,7 mmol) y sim-dimetiletilendiamina (0,77 ml, 8,7 mmol) en 1,4-dioxano (15 ml) en un matraz de reacción. Burbujear nitrógeno a través de la solución con agitación durante 10 minutos. Añadir carbonato potásico (3,6 g, 26 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,83 g, 4,4 mmol) todo de una vez, cerrar herméticamente y calentar la mezcla en agitación a 120 °C durante 2 días. Diluir con diclorometano, filtrar a través de tierra de diatomeas y concentrar el filtrado. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice con un gradiente de acetato de etilo al 5-100 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un aceite de color amarillo claro (1,58 g, 66 %). EM (m/z): 275,0 (M+H).

25

Preparación 12

30 8,8-dimetil-9,10-dihidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-ona

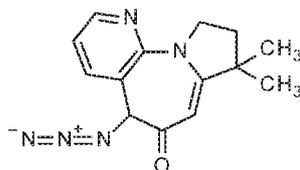


35 Añadir bis(trimetilsilil)amida sódica (22 ml, 1 M en tetrahidrofurano, 22 mmol) mediante una jeringa a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 11, (2Z)-2-[3,3-dimetil-1-(3-metil-2-piridil)pirrolidin-2-ilideno]acetato de etilo (2,88 g, 10,5 mmol) y tetrahidrofurano (60 ml) en un matraz de reacción. Cerrar herméticamente el recipiente y calentar a 70 °C con agitación durante 3 días. Enfriar a TA, inactivar con salmuera,

extraer con acetato de etilo, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para obtener un aceite de color pardo. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 50-100 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,70 g, 71 %). EM (m/z): 229,2 (M+H).

5 Preparación 13

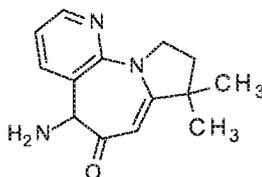
6-azido-10-aza-3,3-dimetil-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-5-ona



Añadir diisopropilamida de litio (7,0 ml, 10,5 mmol, 1,5 M en hexanos) durante 10 minutos a una solución en agitación a -78 °C del intermedio proporcionado por la preparación 12, 8,8-dimetil-9,10-dihidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-ona (1,85 g, 8,1 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) en atmósfera de nitrógeno. Tras 30 minutos añadir ácido acético (2,3 ml, 41 mmol) mediante una jeringa, después dejar calentar a TA en atmósfera de nitrógeno. Inactivar con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico. Repartir la mezcla entre salmuera y acetato de etilo, separar las capas, lavar la capa de acetato de etilo con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para obtener un sólido de color pardo. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 5-60 % en hexanos para obtener el compuesto del título (1,2 g, 55 %). EM (m/z): 270,2 (M+H).

Preparación 14

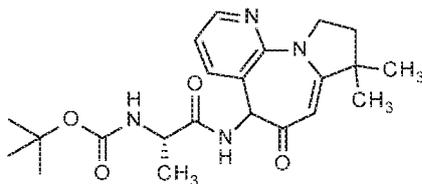
5-amino-3,3-dimetil-9,10-dihidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-ona



Añadir polvo de cinc (1,2 g, 18 mmol) seguido de cloruro de amonio (5 g, 66 mmol) a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 13, 6-azido-10-aza-3,3-dimetil-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-5-ona (1,2 g, 4,5 mmol) en etanol (50 ml) y agua (15 ml) a TA. Tras 1 h diluir con acetato de etilo, eliminar los sólidos por filtración y concentrar el filtrado. Suspender el residuo entre acetato de etilo y salmuera, separar las capas, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de un 5-40 % [10 % 2 M de amoniaco en metanol/diclorometano] en diclorometano para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,72 g, 67 %). EM (m/z): 244,2 (M+H).

Preparación 15

N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]-1-metil-2-oxoetil]carbamato de *tert*-butilo

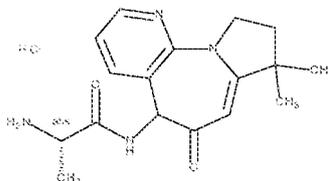


Añadir ácido (2S)-2-(*tert*-butoxicarbonilamino)propanoico (0,69 g, 3,6 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,55 g, 3,6 mmol) y diisopropiletilamina (0,67 ml, 3,9 mmol) a una solución en agitación a 0 °C del intermedio proporcionado por la preparación 14, 5-amino-3,3-dimetil-9,10-dihidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-ona (0,72 g, 3,0 mmol) en tetrahidrofurano (10 ml) en atmósfera de nitrógeno. Añadir clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,68 g, 3,6 mmol) y dejar calentar la mezcla a TA en atmósfera de nitrógeno. Después de 2 h, diluir con agua y extraer con acetato de etilo. Lavar la capa orgánica con salmuera, secar sobre

sulfato sódico, filtrar y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 50-100 % en hexanos para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (1,04 g, 84 %). EM (m/z): 415,0 (M+H).

Preparación 16

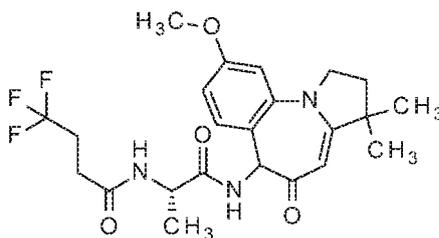
- 5 Clorhidrato de (2S)-2-amino-N-(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)propanamida



- 10 Añadir cloruro de hidrógeno (12,5 ml, 50 mmol, 4 M en dioxano) a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 15, N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de *tert*-butilo (1,04 g, 2,5 mmol) en 1,4-dioxano (40 ml) y calentar a 45 °C con agitación. Cuando la CL/EM indica que se ha completado la reacción, concentrar para obtener el compuesto del título en forma de un sólido de color amarillo (0,93 g, en bruto). EM (m/z): 315,2 (M+1).

Ejemplo 1

4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzof[*f*]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida



- 15 Parte 1
4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzof[*f*]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida diastereomérica

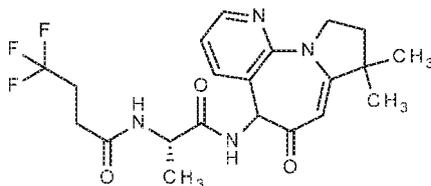
- 20 Añadir clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (12,4 g, 65 mmol) a una solución en agitación del intermedio proporcionado por la preparación 5, 6-amino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona y el intermedio proporcionado por la preparación 7, ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoico (10,9 g, 51 mmol) en diclorometano (294 ml) a TA. Enfriar la mezcla a 5 °C, añadir 1-hidroxibenzotriazol (8,75 g, 65 mmol) y continuar agitando a TA durante 10 minutos. Lavar la mezcla con agua (3 x 100 ml), secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar para proporcionar un sólido de color oscuro. Triturar con metil *tert*-butil éter para proporcionar el compuesto del título (mezcla de diastereómeros) en forma de un sólido de color blanquecino (22,0 g, 87 %). EM (m/z): 468,1 (M+H).

Parte 2

- 30 4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzof[*f*]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida, isómeros 1 y 2
Separar una mezcla de diastereómeros del ejemplo 1, parte 1 en una columna Chiralpak AD eluyendo con acetonitrilo al 10 %/etanol (dimetiletilamina al 0,2 %) para obtener el isómero 1 del compuesto ($T_r=3,20$ min.) en forma de un sólido de color blanco (9,8 g, 38 %) y el isómero 2 del compuesto ($T_r=7,37$ min.) en forma de un sólido de color blanco (9,0 g, 36 %). EM (m/z): 468,2 (M+H) para ambos isómeros.

Ejemplo 2

- 35 N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-*f*]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida



Parte 1

N-((1S)-2-[(8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino]-1-metil-2-oxoetil)-4,4,4-trifluorobutanamida

- 5 Añadir ácido 4,4,4-trifluorobutanoico (0,45 g, 3,2 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,49 g, 3,2 mmol) y diisopropiletamina (2,3 ml, 13,2 mmol) a una solución en agitación a 0 °C del intermedio proporcionado por la preparación 16, clorhidrato de (2S)-2-amino-N-(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)propanamida (0,93 g, 2,6 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) en atmósfera de nitrógeno. Añadir clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,61 g, 3,2 mmol) y dejar que la mezcla se caliente a TA en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. Diluir con agua y extraer con acetato de etilo. Lavar la capa orgánica con salmuera, secar sobre sulfato sódico, filtrar y concentrar. Purificar el residuo mediante cromatografía ultrarrápida en columna sobre sílice eluyendo con un gradiente de acetato de etilo al 75-100 % en hexanos para obtener el compuesto del título (mezcla de diastereómeros) (0,82 g, 71 %). EM (m/z): 439,2 (M+1).

Parte 2

- 15 N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida, isómeros 1 y 2

- 20 Separar una mezcla de diastereómeros del ejemplo 2, parte 1 en una columna Chiralpak AD-H eluyendo con MeOH al 15 %/CO₂(gas) para obtener el isómero 1 (T_r=1,60 min.) en forma de un sólido de color blanco (194 mg, 24 %, epimeriza al 32 % de ED (exceso diastereomérico)) y el isómero 2 (T_r=2,31 min.) en forma de un sólido de color blanco (469 mg, 57 %). EM (m/z): 439,0 (M+H) para ambos isómeros.

- 25 El cáncer es reconocido cada vez más como una colección heterogénea de enfermedades cuyo principio y progresión son inducidos por la función anormal de uno o más genes que regulan la reparación del ADN, estabilidad del genoma, proliferación celular, muerte celular, adhesión, angiogénesis, invasión y metástasis en microentornos tisulares y celulares. La función variante o anormal de los genes "cancerosos" puede resultar del polimorfismo de ADN de aparición natural, cambios en el número de copias del genoma (a través de amplificación, delección, pérdida de cromosomas, o duplicación), cambios en la estructura de genes y cromosomas (a través de translocación cromosómica, inversión, u otra transposición que conduce a una expresión génica desregulada), y mutaciones puntuales. Pueden inducirse neoplasias cancerosas por una función génica anormal, y mantenerse por la misma función génica anormal, o mantenimiento y avance exacerbados por funciones génicas anormales adicionales.

- 30 Más allá de las aberraciones cromosómicas genéticas mencionadas anteriormente, cada uno de los cánceres puede también incluir modificaciones epigenéticas del genoma, incluyendo metilación de ADN, sellado genómico, y modificación de histona por acetilación, metilación o fosforilación. Una modificación epigenética puede desempeñar un papel en la inducción y/o mantenimiento del tumor maligno.

- 35 Se han compilado extensos catálogos de las aberraciones citogenéticas en el cáncer humano, y estos se mantienen y actualizan regularmente en línea (véase la base de datos The Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer del US National Cancer Institute (NCI) Cancer Genome Anatomy Project (CGAP). La base de datos incluye aberraciones cromosómicas para al menos algunos de los tumores malignos de la presente invención. The Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project mantiene un "censo de genes cancerosos" detallado en línea de todos los genes humanos que se han relacionado causalmente con la tumorigénesis así como la base de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) de mutaciones somáticas en cáncer humano. Una fuente adicional que contiene información abundante acerca de los cambios citogenéticos vinculados causalmente a diversos cánceres es el Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.

- 45 El diagnóstico de tumores malignos cancerosos mediante biopsia, inmunofenotipificación y otras pruebas se conoce y se utiliza de manera rutinaria. Además de las tecnologías de bandejo cromosómico de alta resolución y de obtención de imágenes cromosómicas avanzadas, las aberraciones cromosómicas en casos sospechosos de cáncer pueden determinarse a través de análisis citogénético tal como fluorescencia en hibridación in situ (FISH), cariotipado, cariotipado espectral (SKY), FISH múltiple (M-FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), matrices de polimorfismo de nucleótido único (chips SNP) y otras pruebas diagnósticas y de análisis conocidas y usadas por los expertos en la materia.

- 50 El papel oncogénico de Notch se informó por primera vez en la leucemia de linfocitos T humana que implica una

translocación del dominio intracelular de Notch1 a la región del promotor β del receptor de linfocitos T, lo que da como resultado la sobreexpresión del dominio intracelular de Notch1 (Grabber y col. *Nature Review Cancer*, 2006 (6):347-359; Weng y col. *Science*, 2004(306):269-271). La sobreexpresión del dominio intracelular de Notch1 en células progenitoras hematopoyéticas de ratones hizo que los ratones presentaran leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T similar a los seres humanos. Además de la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, hay cada vez más pruebas de que las señales de Notch son oncogénicas en otros cánceres a través de múltiples mecanismos que incluyen la amplificación del receptor y la sobreexpresión de ligandos y/o receptores que incluyen la leucemia linfoblástica aguda, la leucemia linfoblástica crónica (Rosati y col., *Blood*, 2009(113): 856-865), la leucemia mielógena aguda (Sliwa y col. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014(7(3)): 882-889), la leucemia mielógena crónica (Nakahara y col. *Blood*, 2010(115(14)): 2872-2881), y la eritroleucemia (Robert-Moreno y col., *Leukemia*, 2007(21): 1496-1503). La señalización de Notch constitutiva anormal debida a la mutación o sobreexpresión de ligandos y/o receptores también está implicada en una serie de tumores malignos de tumores sólidos, incluido el cáncer de mama triple negativo (Stoeck y col., *Cancer Discovery*, 2014(4): 1154-1167), cáncer de mama, cáncer de ovario (Park y col. *Cancer Research*, 2006(66):6312-6318), melanoma (Gast y col. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2010(49):733-745), cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (Westhoff y col. *PNAS*, 2009 (106): 22293-22298), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel y meduloblastoma (Rangathan y col., *Nature Review Cancer*, 2011(11):338-351 e información suplementaria S1 (tabla)). La señalización de Notch constitutiva anormal debida a la mutación o sobreexpresión de ligandos y/o receptores también está implicada en el angiosarcoma (Ravi y col., *J Clin Oncol*, 2007, (25(18S, Suplemento del 20 de junio)): Abstract 10030), rabdomiosarcoma (Belyea y col., *Clin Cancer Res*, 2011(17(23)): 7324-7336; Roma y col., *Clin Cancer Res*, 2011(17(3)): 505-513), liposarcoma (*J Clin Oncol*, 2009, (27(15S, Suplemento)): Abstract 10526), histiocitoma fibroso maligno (Wang y col., *Cancer Res*, 2012, (72): 1013-1022), carcinoma hepatocelular (Villanueva y col., *Gastroenterology*, 2012, (143): 1660-1669), colangiocarcinoma intrahepático y extrahepático (Wu y col., *Int J Exp Pathol*, 2014, (7(6)): 3272-3279; Sekiya y col., *J Clin Invest*, 2012, (122(11)): 3914-3918; Yoon y col., *World J Gastroenterol*, 2011, (17(35)): 4023-4030), y carcinoma adenoide quístico (Bell y col., *Annals of Diagnostic Pathology*, 2014, (18): 10-13; Stoeck y col., *Cancer Discov*, 2014, (4): 1154-1167). La inhibición de la señalización de Notch presenta una diana atractiva para proporcionar beneficios terapéuticos a los pacientes con cáncer cuya enfermedad fue inducida mediante la activación anormal de la ruta de señalización constitutiva de Notch. Shih y col. *Cancer Research*, 2007(67)1879-1882.

Uno de los genes definitivos para el desarrollo de las células ciliadas del oído interno es el homólogo de los mamíferos del factor de transcripción hélice-bucle-hélice básico atonal-1 (Atoh1). La expresión de Atoh1 en células cocleares es necesaria para la génesis de las células ciliadas auditivas. Las células epiteliales sensoriales dentro del órgano de Corti en desarrollo que expresan Atoh1 se diferenciarán en células ciliadas auditivas (Helms y col., *Development* 2000, (127(6)): 1185-1196), y Atoh1 es uno de los primeros marcadores de la diferenciación de células ciliadas auditivas. Las células de sostén del órgano de Corti mantienen el potencial para desarrollar características de las células ciliadas, incluida la formación de cilios (Zheng y col., *Nature Neuroscience*, 2000(3(6)): 580-586; Kawamoto y col., *J Neurosci*, 2003, (23(11)): 4395-4400; Izumikawa y col., *Nat Med*, 2005, (11(3)):271-276; y la función adecuada de las células ciliadas (Kawamoto y col., 2003).

Cada célula ciliada en la cóclea está rodeada por células de sostén no sensoriales que proporcionan soporte trófico y estructural para las células ciliadas y el ganglio y son esenciales para mantener concentraciones iónicas adecuadas en el órgano de Corti a través de la comunicación intercelular de la unión comunicante. Hay dos tipos de células ciliadas: células ciliadas internas y externas. Las células ciliadas cocleares en mamíferos, incluidos los seres humanos, consisten en una fila de células ciliadas internas y tres filas de células ciliadas externas. Las células ciliadas internas son los receptores sensoriales reales, y el 95 % de las fibras del nervio auditivo que se proyectan al cerebro surgen de esta subpoblación. Las terminaciones en las células ciliadas externas son casi todas de axones eferentes que surgen de las células en el cerebro y estas células funcionan como preamplificadores acústicos. Las células de sostén desempeñan un papel clave en la generación de células ciliadas auditivas después de la pérdida o daño de las células ciliadas auditivas. Durante el desarrollo, las células de sostén y ciliadas se desarrollan a partir de un progenitor común y la aparición de una célula ciliada indica que las células que lo rodean se convierten en células de sostén a través de la inhibición por contacto mediada por la ruta de señalización de Notch (Kelley, *Nat Rev Neurosci*, 2006, (11): 837-849).

Sobre la base de la capacidad de las células de sostén para transdiferenciarse en células ciliadas auditivas, junto con su ruta de desarrollo compartida, se ha postulado que las células de sostén pueden funcionar como progenitores de células ciliadas (Parker y col., *Audiology and Neurootology*, 2004, (9(2)): 72-80). Varios estudios han demostrado que eludir la inhibición del ciclo celular en las células de sostén puede dar como resultado la generación de células ciliadas auditivas en mamíferos (Lowenheim y col., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, (96): 4084-4088; Torchinsky y col., *J Neurocytol*, 1999, (28(10-11)): 913-924; Minoda y col., *Hear Res*, 2007, (232): 44-51). Por lo tanto, las células de sostén de mamíferos adultos mantienen la capacidad de transdiferenciarse en células ciliadas auditivas una vez que están libres para entrar en el ciclo celular.

El tratamiento farmacológico para la restauración de células ciliadas auditivas es un nuevo enfoque y la administración intratimpánica al líquido del oído medio, preferentemente al hueco de la ventana redonda, sin una inyección real en la cóclea puede inducir de manera eficaz la expresión de Atoh1 en una dosis terapéutica y durante

un período de tiempo adecuado para provocar la transdiferenciación de células ciliadas auditivas de las células de sostén en la cóclea. Mizutari y col., *Neuron*, 2013, (77(1)): 58-69 demostró que la administración en el oído medio de un inhibidor de la gamma secretasa (LY411575) se puede emplear para regenerar células ciliadas auditivas perdidas por traumas acústicos en ratones y que esta generación de células ciliadas nuevas a partir de células de sostén dio como resultado una recuperación auditiva significativa y mensurable. Este trabajo proporcionó evidencia conceptual de un efecto terapéutico de la inhibición de la señalización de la ruta de Notch en la generación de células ciliadas auditivas y la restauración de la audición en un modelo de ratón, y proporcionó una explicación mecanicista (que respalda la diferenciación celular a las células ciliadas auditivas) para el efecto fisiológico. La toxicidad limitante de la dosis se mostró durante la administración sistémica de LY411575.

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* muestran la actividad inhibidora de la señalización de la ruta de Notch y la eficacia de los compuestos 1 y 2, o un diastereómero sustancialmente puro de los mismos, contra una línea celular de cáncer específica. Estos ensayos son generalmente reconocidos por los expertos en la materia como indicativos de actividad quimioterapéutica clínica humana. Se cree que la inhibición de la escisión del dominio intracelular de Notch mediante la γ -secretasa es eficaz contra cada uno de los receptores Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4. Los ensayos que evidencian la actividad inhibidora de la señalización de la ruta de Notch y la eficacia pueden llevarse a cabo sustancialmente como sigue o mediante ensayos similares que proporcionan datos similares.

Ensayo de imágenes celulares de acumulación nuclear del N1ICD de Notch1

Células HEK293ΔE12 (las células HEK293 están diseñadas para expresar de forma estable el ADNc de Notch1 de ratón que codifica el aminoácido 1703-2183, NP_032740.3, (precursor de la proteína Notch 1 de ratón de longitud completa: SEQ ID NO: 1) con una secuencia de péptidos señal de 23 aminoácidos, MPRLTPLLCLLLPALAARGLR (SEQ ID NO: 2), en su extremo N) se colocan en placas a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, se incuban en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)-alto contenido de glucosa con suero bovino fetal al 5 % (FBS) a 37 °C, CO₂ al 5 % durante 24 horas. Las células se tratan con compuesto de prueba, dosificando en 10 puntos de diluciones 1:3 en el intervalo de 1000 nM a 0,05 nM, y con una concentración final de dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,2 %. Después de 24 horas de tratamiento, las placas celulares se procesan mediante las siguientes etapas de manera secuencial: se fijan las células con 100 μ l/pocillo de fijador PREFER™ durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT); Se permeabilizan las células con 100 μ l/pocillo de TRITON® X100 al 0,1 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 20 minutos a RT; se lava 3 veces con 100 μ l/pocillo de PBS cada uno; se añaden 50 μ l/pocillo de anticuerpo anti-N1ICD (dominio intracelular de Notch1) de conejo, a 1:2000 en PBS con albúmina de suero bovino al 1 % y se incuba durante 1,5 horas a 37 °C; se lava 3 veces con 100 μ l/pocillo de PBS cada uno; se incuba con 50 μ l/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG (Inmunoglobulina G) de conejo Alexa 488 a una dilución 1:1000 en PBS con albúmina de suero bovino al 1 % y se incuba 1 hora a 37 °C; se lava 3 veces con 100 μ l/pocillo de PBS cada uno y se añaden 100 μ l/pocillo de yoduro de propidio 15 μ M con 50 μ g/ml de ARNasa durante 30 minutos para teñir los núcleos. Las placas se escanean con el citómetro de microplaca de fluorescencia de exploración láser ACUMEN EXPLORER™ (TTP LABTECH LTD) para medir el recuento nuclear celular total/pocillo y el área nuclear total/pocillo con fluorescencia a 655 nm-705 nm (emisión de yoduro de propidio unido a ADN) y fluorescencia de anticuerpo que se une al N1ICD en la región nuclear a 505 nm-530 nm. El producto principal del ensayo es una relación de fluorescencia total del N1ICD nuclear a área nuclear total, la señal del N1ICD nuclear normalizada. Se recogió un perfil de citotoxicidad relativa como el % del número de células a células de control con DMSO al 0,2 %. El anticuerpo que reconoce N1ICD o Notch1 escindido se eleva a un péptido humano correspondiente al sitio de escisión amino terminal de Notch1 humano en Val1744. En células de control no tratadas, el N1ICD generado a partir de Notch1 se translocará y acumulará en el núcleo. Cuando las células se tratan con un compuesto inhibidor de la escisión de Notch 1, la señal del N1ICD nuclear disminuirá. La respuesta de concentración y la CI₅₀ se determinan mediante el ajuste de la curva a una logística de cuatro parámetros para la señal N1ICD nuclear, mientras que el % del número de células se representa en el mismo gráfico para el perfil de citotoxicidad. Realizando el ensayo esencialmente como se describe anteriormente, la CI₅₀ promedio para el Compuesto 1, Isómero 2 es 0,37 nM (+/- 0,16; n = 2) y el Compuesto 2, Isómero 2 es 1,55 nM (+/- 1,12; n = 2). Ninguno de los compuestos afecta el número de células hasta una concentración de 1000 nM. Estos datos evidencian que el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 tienen afinidad por Notch 1 e inhiben la acumulación intracelular del péptido de señalización celular del dominio intracelular de Notch 1.

Estudios de inhibición de diana *in vivo*

Estudios en animales

Para evaluar el efecto *in vivo* del Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 en la inhibición de la farmacodinámica (PD) del procesamiento de Notch, se realizaron estudios en animales en ratones Balb/C que no tenían tumores (Charles River). Se utilizan un total de 5 ratones para cada grupo. Los ratones se alimentan *ad libitum* con comida normal. El tratamiento se inicia con la administración oral (sonda) del compuesto o vehículo (Na-CMC al 1 % en Tween-80 al 0,25 %) en un volumen de 0,2 ml. En los puntos de tiempo designados (4 u 8 horas después de la dosis) después del tratamiento, los animales se sacrifican por asfixia con CO₂ y dislocación cervical. Los tejidos (pulmones) se extraen y se utilizan para el análisis de la respuesta de la PD según se mide mediante el N1ICD escindido.

Análisis del N1ICD

Para evaluar los niveles del N1ICD en el pulmón, se cortan aproximadamente 75 mg del tejido congelado y se trocean antes de la homogeneización (se registra la masa real). Las muestras de tumores congelados se transfieren a tubos Lysing Matrix-D™ y se resuspenden en un tampón de lisis XY helado (Tris 25 mM, pH 7,5, inhibidor de tripsina/quimotripsina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, fosfato de beta-glicerina 60 mM, Triton® X-100 al 1 %, NaF 10 mM, pirofosfato 2,5 mM, NaCl 150 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 15 mM, pH 8,0, ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5 mM, pH 8,0, vanadato de sodio 1 mM, Leupeptina 10 µg/ml, ditiotreitól 1 mM, microcistina LR 1 µM, clorometil cetona N-p-tosil-L-fenilalanina (TPCK) 10 µg/ml, hidrocloreuro de éster metílico de N-p-tosil-L-arginina (TAME) 2 mM, sal di(tris) de fosfato de 4-nitrofenilo (PNPP) 15 mM, clorhidrato de fluoruro de 4-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo (AEBSF) 0,1 mM, benzamidina 5 mM, ácido okadaico 1 µM) que contiene un comprimido completo 1X (Roche Complete™ N.º 11697 498 001) y un cóctel inhibidor de la proteasa 1X (Sigma-Aldrich P8340) en una relación masa:volumen de 75 mg/ml de tampón. Los tejidos se homogeneizan en un homogeneizador Fast Prep FP120 (Thermo Scientific, Rockford, IL) a una velocidad de 6,0 durante 30 segundos a 4 °C, seguido de 15 minutos de incubación en hielo. Esto se repite durante un total de 2-3 ciclos hasta que se completa la homogeneización. Los lisados se centrifugan en una centrífuga Eppendorf a 4 °C a 30.000 rpm durante 15 minutos para eliminar los residuos. Se eliminan 400 µl de sobrenadante y se transfieren a un nuevo tubo Eppendorf y se someten a un ciclo de congelación/descongelación. Las muestras se vuelven a centrifugar en una centrífuga Eppendorf a 4 °C a 30.000 rpm durante 30 minutos y se recogen 120 µl de sobrenadante para su análisis. La concentración total de proteínas se determina utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) utilizando un lector de placas Thermomax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los niveles de N1ICD se determinan utilizando un ELISA N1ICD personalizado. El analito se captura con un anticuerpo monoclonal de conejo personalizado específico de Notch1 (Val1744) escindido y se detecta con un anticuerpo policlonal de oveja Notch1 C-terminal SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los lisados se diluyen a 2 µg/µl en un tampón de lisis tris ELISA (R6OTX) enfriado con hielo (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland) que contiene 1 comprimido completo (Roche Complete™ mini N.º 11 836 153 001) y un cóctel inhibidor de proteasa 1X (Sigma-Aldrich P8340) y se añaden 25 µl a la placa ELISA. La incubación de 50 µg de lisado de proteínas se realiza a RT durante una hora cada una para capturar el analito y con el anticuerpo de detección. Las placas se leen en un Sector Imager 6000™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). El N1ICD restado previo se normaliza a la proteína total y se presenta como % de inhibición en relación con el grupo tratado con vehículo. El % de inhibición del N1ICD y la significación estadística (valor de p) medidos mediante el procedimiento de Dunett en tumores recogidos 4 horas después de la última dosis del Compuesto 1, Isómero 2 o Compuesto 2, Isómero 2 se analizan esencialmente como se describe anteriormente y se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Tiempo (horas) después del tratamiento	% de inhibición del N1ICD (Media ± DE; n = 1)	Valor p
1, Isómero 2	10	4	70 ± 12	< 0,0001
1, Isómero 2	10	8	65 ± 11	< 0,0001
1, Isómero 2	100	8	92 ± 3	< 0,0001
1, Isómero 2	30	8	87 ± 3	< 0,0001
1, Isómero 2	10	8	52 ± 31	0,0054
1, Isómero 2	3	8	11 ± 13	No Significativo
1, Isómero 2	1	8	6 ± 15	No Significativo
1, Isómero 2	0,3	8	-7 ± 26	No Significativo
2, Isómero 2	10	4	65 ± 11	< 0,0001
2, Isómero 2	10	8	15 ± 14	No Significativo

Los datos en la Tabla 1 evidencian la inhibición de la escisión del N1ICD por el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 en tejido de pulmón de ratón. Los datos en la Tabla 1 proporcionan además una correlación *in vivo* con los datos de actividad funcional descritos anteriormente.

Inducción de la expresión de mAtoh1 en esferas óticas

Generalmente, el aislamiento de células del órgano de Corti se lleva a cabo en el Día 0, en gran parte mediante el procedimiento de Oshima y col., *Methods Mol Biol.*, 2009; 493: 141-162. El cultivo y la propagación celular se llevan a cabo durante 3-4 días. El tratamiento de ensayo celular y del compuesto de prueba se lleva a cabo el día 3 o 4. El anclaje y la diferenciación pueden tener lugar durante los próximos 7 días. En los días 10 u 11, se lleva a cabo la lisis celular y el aislamiento de ARN. TaqMan qRT-PCR se lleva a cabo el día 12 y los resultados se analizan en los días 13-15 para la expresión de Atoh1 y Tbp1.

Aislamiento de células

El tejido circundante de la porción pétreo del hueso temporal se extrajo de ratones postnatales de 1 a 4 días de edad (cepa transgénica: nGFP impulsada por *mAtoh1*; Lumpkin EA, y col., Gene Expr Patterns, 2003; (36): 389-95 de ambos sexos. La cóclea en forma de caracol se separa del sistema vestibular usando pinzas. En esta etapa de desarrollo, el laberinto óseo no está completamente calcificado y se puede diseccionar fácilmente con pinzas. Se abre con cuidado el laberinto óseo de la cóclea y se extrae el ligamento espiral y el órgano de Corti unido enrollados a lo largo de la espiral del serpentín mediante el desenrollado apicalmente del serpentín. Comenzando en la base, se separa el ligamento espiral del órgano de Corti con unas pinzas finas.

Se transfiere el órgano de Corti (OC) diseccionado a tubos individuales de 1,5 ml llenos con 850 µl de HBSS helado. Se transfieren hasta 12 tejidos del OC al mismo tubo. Se hace girar rápidamente los tejidos del OC y se retira el HBSS. Se desasocian las células mediante la adición de 100 µl de TrypLE™ Select (Life Technologies) precalentado y se incuban a 37 °C durante 13 min. Se hace girar rápidamente hacia abajo los tejidos del OC disociados. Se elimina TrypLE™ Select. Se añaden 100 µl de Medio A (DMEM/F12, suplemento de N2 (LifeTechnologies), suplemento de B27 (LifeTechnologies), ampicilina (50 µg/ml) y Fungizone (LifeTechnologies), EGF (20 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), IGF-1 50 ng/ml) y sulfato de heparano (50 ng/ml)). El tejido diseccionado y digerido se tritura luego con una punta de pipeta P200. Se elimina cualquier agregado celular y residuos; se transfiere la suspensión celular y se lava a través de un filtro celular de 70 µm previamente empapado para juntar la suspensión celular en un solo tubo de cultivo fresco. Se enjuagan los tubos de disociación y el filtro celular con suficiente Medio A y se mezcla con la suspensión celular. Se cuenta la densidad celular con hemocitómetro o Countess® (Life Technologies). Se añade Medio A fresco a la suspensión celular para lograr una densidad de placa final de 1,0E5 células/ml y la placa en el material de cultivo de fijación ultra bajo, T-75 (Greiner).

Cultivo en suspensión para propagar esferas del OC

Las células individuales disociadas se cultivan en un material de cultivo de fijación ultra bajo, (Greiner) en Medio A durante 3 a 4 días en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C para obtener esferas cultivadas clonalmente, denominadas esferas de primera generación, de las células flotantes. Si las células se adhieren a las placas no adherentes durante el período de cultivo, se pueden desalojar mediante una mezcla suave.

Cultivo y tratamiento de unión

Después de cultivar las esferas durante 3-4 días, se cuentan visualmente las esferas con un microscopio para estandarizar la densidad de siembra de esferas óticas por ml para esta etapa. Se recolectan las células mediante centrifugación y se vuelven a suspender las esferas en medio básico a una concentración de aproximadamente 2000 esferas por ml. Se siembran las esferas en un volumen de 150 µl por pocillo en una placa de 96 pocillos tratada con cultivo celular para obtener aproximadamente 300 esferas por pocillo. Se tratan las esferas con agentes experimentales por cuadruplicado a un volumen final de 200 µl en medio básico (DMEM/F12, suplemento de N2 (LifeTechnologies), suplemento de B27 (LifeTechnologies), ampicilina (50 µg/ml) y Fungizone (LifeTechnologies)). Se cultivan las esferas tratadas durante 7 días en una incubadora con control de temperatura humidificada con CO₂ al 5 %, a 37 °C. Se elimina el medio y se procede con la extracción del ARN.

Extracción de ARN

Se añade tampón RLT plus (Qiagen) suplementado con Beta-mercaptoetanol al 1 %, 175 µl por pocillo. Se añaden 2,5 µl de 4 ng/µl de portador de ARN (RNeasy® Plus Micro Kit; Qiagen) diluido en tampón RLT Plus en cada pocillo antes de la extracción del ARN. El ARN total se extrae utilizando el kit RNeasy® Plus Micro (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se lleva a cabo utilizando el sistema de síntesis de primera hebra Superscript® III (LifeTechnologies, catálogo 18080-051) siguiendo el protocolo del fabricante que utiliza hexámeros aleatorios para la síntesis de ADNc. Se diluye el ADNc al 50 % mediante la adición de 21 µl de agua ultra pura sin nucleasas. Se utilizan 5 µl de ADNc diluido para la qPCR.

qPCR

Para cuantificar la expresión de marcadores de células ciliadas de los cultivos de esfera tratados, la qPCR con sondas para detectar un gen de interés *mAtoh1* y un gen de control endógeno se lleva a cabo en una única reacción multiplex de dos colores. La mezcla TaqMan Gene Expression Master (LifeTechnologies, 4369016) y una sonda de interés (*Atoh1*; Mm00476035_s1 y una sonda de control endógena (*Tbp1*; Mm00446971_m1, LifeTechnologies) se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones se mantienen constantes para cada sonda. La expresión génica relativa entre los grupos de tratamiento se analiza mediante el procedimiento $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas. Los experimentos se llevan a cabo por triplicado, como mínimo, y se informan como una gran media.

Tabla 2

Compuesto	RQ a 10 nM	RQ a 100 nM	RQ a 1 µM
1, Isómero 2	1,43 ± 0,17*	1,76 ± 0,17*	1,64 ± 0,13*
2, Isómero 2	1,14 ± 0,07	1,21 ± 0,13	1,57 ± 0,11*

Los datos en la Tabla 2 muestran los valores de cuantificación relativos (RQ) de la expresión Atoh1, un marcador de la generación de células ciliadas, en esferas óticas tratadas con cada uno del Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 en tres concentraciones (10 nM, 100 nM y 1 µM). Los datos (± error estándar de la media, EEM) representan el factor de inducción en la expresión génica en relación con las muestras tratadas con control negativo. (*, diferencia significativa del control negativo, $p < 0,05$).

Inducción de la expresión de hAtoh1 en líneas celulares de tumores humanos

Para evaluar la potencia de los Compuestos 1, Isómero 2 y 2, Isómero 2 en su capacidad para inducir la expresión de hAtoh1, se utiliza una línea de células tumorales humanas. La regulación de la señalización de Notch endógena para esta línea celular es similar a la del oído interno. Generalmente, este ensayo se lleva a cabo siguiendo los principios de Kazanjian y col., Gastroenterology, 2010, 139(3): 918-928 y en Supplementary Materials and Methods.

Generalmente, se utilizan técnicas estándar de cultivo celular. La línea celular LS174T de adenocarcinoma colorrectal humano de paso bajo (ATCC CL-188) mantenida en medio de crecimiento (MEM FBS al 10 %) se coloca en placas de 10.000 células en 100 µl de medio de ensayo (MEM FBS al 1 %) por pocillo en placas tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos.

Al día siguiente, se llevaron a cabo diluciones en serie de medio registro de compuestos de prueba de reserva 10 mM (diluidos en DMSO al 100 %) para obtener once dosis decrecientes de compuesto farmacológico. Las concentraciones finales deben abarcar de 10 µM a 0,127 nM. Se utiliza una dilución en serie de 3,16 veces, con concentraciones de DMSO en cada pocillo del 100 %. Se lleva a cabo en medio de ensayo una dilución adicional de 1:10 de la dilución inicial con DMSO. Se lleva a cabo otra dilución de 1:100 de nuevo en medio de ensayo.

Se añaden 100 µl de las diluciones del compuesto de prueba a cada pocillo que contiene células y medios de crecimiento y se cultivan durante 72 horas a 37 °C en CO₂ al 5 %.

Las células se recogen de las placas el día 4 y el ARN se extrae y se purifica utilizando RNeasy® Plus 96 RNA (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

La síntesis de ADNc se lleva a cabo utilizando el sistema de síntesis de primera hebra Superscript® III (LifeTechnologies, 18080-051) siguiendo el protocolo del fabricante que utiliza hexámeros aleatorios para la síntesis de ADNc. Se diluye el ADNc al 50 % mediante la adición de 21 µl de agua ultra pura sin nucleasas. Se utilizan 5 µl de ADNc diluido para la qPCR.

qPCR

Para cuantificar la expresión de marcadores de células ciliadas de los cultivos de esfera tratados, se llevan a cabo sondas de qPCR para detectar la expresión de hAtoh1 o TBP en una única reacción multiplex de dos colores. Para medir la expresión génica relativa para cada muestra, la mezcla TaqMan Gene Expression Master (LifeTechnologies, 4369016) y una sonda de interés (Atoh1 humana; LifeTechnologies Assay Id Hs00944192_s1) más un control endógeno (TBP humano; LifeTechnologies Assay Id Hs00427620_m1) se utilizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones se mantienen constantes para cada sonda. La expresión génica relativa entre los grupos de tratamiento se analiza mediante el procedimiento $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas.

Se llevan a cabo cuatro ensayos separados para obtener valores de CI_{50} para cada compuesto de prueba. El valor de CI_{50} se determina mediante el ajuste de los datos de respuesta de concentración al modelo "log (antagonista) frente a respuesta (tres parámetros)" utilizando el software GraphPad Prism® para 12 dosis en un intervalo de concentración de 4,0E-11 a 1,0E-6 M con 108 puntos totales analizados para cada compuesto. El valor de CI_{50} para los Compuestos 1, Isómero 2 y 2, Isómero 2 se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Compuesto	CI_{50} nM
1, Isómero 2	16,64
2, Isómero 2	54,34

Los datos en la Tabla 3 muestran los valores de CI_{50} del Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2, calculados mediante la expresión relativa de hAtoh1, un marcador de la generación de células ciliadas auditivas en este ensayo.

Respuesta a los compuestos en un ensayo de explantes del órgano de Corti

Generalmente, el cultivo de explantes organotípicos del órgano de Corti se lleva a cabo en el día 0 de acuerdo con el

procedimiento descrito en Parker y col., Journal of Visualized Experiments, 2010, (36), e1685. El cultivo de explantes se lleva a cabo durante 4-7 días, momento en el que el cultivo se prepara para la lisis celular para qRT-PCR o la fijación de tejido para inmunohistoquímica.

Aislamiento y cultivo de explantes del órgano de Corti

5 La vesícula y el tejido circundante de la porción pétreo del hueso temporal se extrajo de ratones postnatales de 1 a 4 días de edad (cepa transgénica: nGFP impulsada por *Atoh1*; Lumpkin EA, y col., Gene Expr Patterns, 2003, (36):389-95) de ambos sexos. Los órganos de Corti se diseccionan en solución de Hank, se retira el ligamento espiral y los explantes se colocan en cubreobjetos recubiertos con poli-L-ornitina (0,01 %, Sigma) y laminina (50 mg/ml, Becton Dickinson) para obtener una preparación con una superficie coclear plana. Cada explante coclear se coloca luego en un solo pocillo de una placa de 24 pocillos (Falcon) y se cultiva en DMEM (Invitrogen) con suero fetal bovino al 5 %, suero de caballo al 5 % y penicilina-estreptomycin (LifeTechnologies). Los compuestos experimentales se añaden con medio en el día 0 y se reemplazan cada 2-3 días. Todos los cultivos se mantienen en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 % a 37 °C.

Análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR

15 La extracción de ARN se lleva a cabo mediante la lisis del tejido del explante con 350 µl de tampón RLT Plus (Qiagen) por pocillo, y el ARN total se purifica mediante el kit RNeasy® Plus Mini (Qiagen). La síntesis de ADNc se lleva a cabo con el sistema de síntesis de primera hebra SuperScript® III (LifeTechnologies) utilizando hexámeros aleatorios. Para cuantificar la inducción de la expresión de marcadores de células ciliadas, la qPCR se realiza con la mezcla TaqMan Gene Expression Master (LifeTechnologies, 4369016) y sondas para detectar genes de interés (por ejemplo, *hAtoh1* ensayo ID Mm00476035_s1, *Pou4f3*; ensayo ID Mm04213795_s1 y *Myo7a*; ensayo ID Mm01274015_m1, LifeTechnologies) y un gen de control endógeno, *Tbp* (ensayo ID Mm00446971_m1, LifeTechnologies). La expresión génica relativa entre los grupos de tratamiento se analiza mediante el procedimiento $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas. Los experimentos se llevan a cabo por triplicado, como mínimo, y se informan como una gran media.

25 **Tabla 4**

Compuesto	<i>Atoh1</i>	<i>Pou4f3</i>	<i>Myo7a</i>
1, Isómero 2	3,72 ± 0,54	2,04 ± 0,35	1,73 ± 0,33
2, Isómero 2	3,10 ± 0,69	1,65 ± 0,25	1,49 ± 0,22

Los datos en la Tabla 4 muestran los valores de cuantificación relativos (RQ) de la expresión de los marcadores de generación de células ciliadas; *Atoh1*, *Pou4f3*, y *Myo7a*, en explantes del órgano de Corti tratados con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 a 1 µM. Los datos (± EEM) representan el factor de inducción en la expresión génica en relación con las muestras tratadas con control negativo.

30 Inmunotinción de nuevas células ciliadas que expresan *Atoh1*

Después del cultivo de explantes, los tejidos se fijan en la placa de 24 pocillos con 200 µl de Cytifix/Cytoperm (BD) durante 30 minutos, se enjuagan con PBS que contiene TritonX100 (PBST) y se tiñen con 200 µl de solución de anticuerpo primario, que consiste en un suero de burro normal al 4 % en PBST con anti-GFP de cabra (1:2500; AbCAM, ab5450) y antimiosina VIIa de conejo (1:1000; Proteus Bioscience n.º 25-6790) durante 1 hora. Luego, los tejidos se lavan a fondo con PBST y se tiñen con una solución de anticuerpo secundario, que consiste en anticuerpo de burro anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488 (1:1000; Invitrogen, A-11055) y anticuerpo de burro anti-IgG de conejo Alexa Fluor 568 (1:1000; Invitrogen, A 10042) durante 1 hora. Luego se lavan a fondo con PBST y se montan en portaobjetos de microscopio. Las células ciliadas individuales se identifican mediante la expresión del marcador sustituto de *Atoh1* GFP (verde) y la miosina VIIa (roja), se toman imágenes y luego se cuentan dentro de una longitud de 100 µM en la región media del ápice para examinar la formación de células ciliadas nacientes en muestras experimentales, tratadas con compuesto, en contraste con el número de células ciliadas en muestras tratadas con control negativo (compuesto inactivo biológico) o no tratadas. Los recuentos enmascarados de células se miden en cinco experimentos separados.

45 **Tabla 5**

Compuesto	Número de células ciliadas externas (por 100 µM)	Porcentaje de aumento
1, Isómero 2	50,4 ± 4,9	14,15 ± 1,9 %
2, Isómero 2	55,8 ± 3,1	17,26 ± 1,2 %

Los datos en la Tabla 5 muestran los números de células ciliadas externas en los explantes del órgano de Corti cultivados durante cuatro días en presencia del Compuesto 1, Isómero 2 (n = 13) o el Compuesto 2, Isómero 2 (n = 15) a 1 µM e inmunoteñidos con GFP (un marcador *Atoh1* en sustitución) y miosina VIIa. El porcentaje de aumento en las células ciliadas es relativo a las muestras tratadas con control negativo (n = 18).

Análisis de la expresión génica después del daño ototóxico

Se utiliza una variación del cultivo de explantes organotípicos del órgano de Corti para modelar la regeneración de las células ciliadas en respuesta al tratamiento posterior con el compuesto después del daño ototóxico. Este modelo de daño se lleva a cabo de acuerdo con el procedimiento descrito en Korrapati y col., PLOSOne, 2013, 8(8), e73276, en el que se informó de una reducción del 95 % en células ciliadas apicales medias. En el Día 0, para dañar y destruir selectivamente células ciliadas dentro del explante del órgano de Corti, se añade el tratamiento con aminoglucósidos (gentamicina (100 μ M)) durante 18-24 horas. En el Día 1, se elimina la gentamicina y se inicia el tratamiento con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 a 5 μ M. El cultivo de explantes continúa durante un total de 4 días, momento en el que se prepara el cultivo para el protocolo de qRT-PCR descrito anteriormente. La confirmación visible del daño inducido por gentamicina se observa fácilmente entre los cultivos tratados con compuestos de control negativo. Sin embargo, la medición cuantitativa de la respuesta al tratamiento con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 después del daño ototóxico obtenido mediante qRT-PCR midió aumentos en la expresión génica para los marcadores de células ciliadas prosensoriales Atoh1 y Pou4f3 y el marcador de células ciliadas Myo7A.

Tabla 6

	% de inducción sobre el órgano de Corti dañado tratado con control (media \pm EEM; Valor p) n = 11		
Compuesto (5 μ M)	Atoh1	Pou4f3	Myo7A
1, Isómero 2	242 \pm 16; < 0,0005*	114 \pm 25; < 0,05*	102 \pm 18; 0,0522
2, Isómero 2	169 \pm 24; < 0,05*	28 \pm 11; 0,0633	52 \pm 15; no signif.

Los datos en la Tabla 6 muestran aumentos relativos en la expresión génica mediante qRT-PCR de los marcadores de generación de células ciliadas Atoh1, Pou4f3 y Myo7a, en explantes del órgano de Corti tratados con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 a 5 μ M después del daño con gentamicina (100 μ M). Los datos representan el porcentaje de aumento en la expresión génica en relación con las muestras tratadas con control negativo con el daño a células ciliadas inducido por gentamicina. (*, diferencia significativa del control negativo, p < 0,05)

Inducción del marcador de células ciliadas en el cultivo de cápsulas óticas completas

La cápsula ótica (explante de cápsula ótica), compuesta por el laberinto óseo coclear y el sistema vestibular, se disecciona de ratones postnatales de 1 a 4 días de edad (cepa transgénica: nGFP impulsada por Atoh1; Lumpkin EA, y col., Gene Expr. Patterns, 2003, 3(4): 389-95) de ambos sexos, generalmente de acuerdo con el procedimiento descrito en Parker y col., Journal of Visualized Experiments, 2010, (36), e1685. La cápsula ótica completa se aísla del hueso parietal y se mantiene *ex vivo* en un sistema de cultivo de tubo de rodillo durante hasta 3 días en medio que contiene DMEM, alto contenido de glucosa, FBS al 5 %, suero de caballo al 5 %, ampicilina 1 μ g/ml.

El explante de cápsula ótica se utiliza para evaluar el compuesto de prueba, en varios vehículos de administración, penetrancia en el oído interno. Las pruebas se llevan a cabo con composiciones del Compuesto 1, Isómero 2, (7,2 mM) en varios vehículos de administración. Los volúmenes pequeños (100-200 nl) se aplican directamente al hueco de la ventana redonda de la cóclea. La cóclea se disecciona, se trata, se incuba durante 1-2 horas, y luego se introduce en el cultivo de rodillos. Después de 48 hrs, el explante de cápsula ótica se abre para extraer el órgano de Corti del laberinto óseo de la cóclea y se analiza mediante RT-PCR.

Se deja que la composición permanezca durante 1-2 horas y luego se lava con medio de cultivo. El explante de cápsula ótica se cultiva luego durante 48 horas en medio no tratado. La cóclea se rompe y el órgano de Corti completo luego se disecciona y se prepara para una RT-PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión del marcador de células ciliadas Atoh1 (como se describe en el ensayo de explante del órgano de Corti, más arriba). La Tabla 7 muestra la inducción de Atoh1 en el vehículo de administración especificado. La regulación ascendente de Atoh1 por el Compuesto 1, Isómero 2, en todas las composiciones ensayadas (2-3 veces, n de 12-17) se mide en comparación con los explantes de cápsulas óticas tratados con control de solo vehículo después de 48 horas en cultivo.

Tabla 7: Expresión génica de Atoh1 (RT-PCR)

	PEG (polietilenglicol 400) al 45-70 %	Poloxámero (Pluronic® F108) al 10 %	Poloxámero (Pluronic® F108) al 20 %	Ácido hialurónico al 1-2 %
Estado líquido	Líquido viscoso	Líquido viscoso	Gel	Gel
Solubilidad de los compuestos de ensayo	Disolución clara	Suspensión	Suspensión	Suspensión
Factor de inducción medio	2,933	2,398	2,612	2,459
EEM	0,3193	0,2653	0,4441	0,2567
Valor de P	< 0,0001	0,0002	0,0019	0,0001

Captación del compuesto de prueba en perilinfa *in vivo* en el oído interno

- 5 Se anestesian conejillos de indias Hartley albinos hembra (Charles River, Francia) con una mezcla de ketamina/xilazina antes de inyectar con 70 μ l de Compuesto 1, Isómero 2, en composiciones como las descritas anteriormente para el ensayo de cultivo de cápsula ótica completa, por vía transtimpánica para completar el llenado del oído medio. Las muestras de perilinfa (líquido del oído interno) se extraen a las 0,5, 1, 6, 24 y 48 horas después de la inyección y se analizan mediante LCMS (n de 5) para determinar la concentración del compuesto de prueba. La Tabla 8 muestra que el compuesto de prueba se toma en el oído interno después de la administración transtimpánica en el oído medio con estos vehículos de administración.

Tabla 8: Niveles de perilinfa *IN VIVO*

	PEG (polietilenglicol 400) al 70 %	Poloxámero (Pluronic® F108) al 10 %	Poloxámero (Pluronic® F108) al 20 %	Ácido hialurónico al 1 %
Cmax (μM)	327,1	753,0 \pm	1926,2 \pm	187,3 \pm
\pm EEM	\pm 93	306	493	113
Tiempo Cmax	1 hora	30 min	30 min	1 hora
% de compuesto de prueba aplicado en perilinfa	1,04	2,39	6,11	0,59
R al cuadrado	0,5262	0,7640	0,5600	0,4229
ABC (μmol.hr.L⁻¹)	1451	7002	8634	2711

10 **Secuencias de aminoácidos**

SEQ ID NO: 1 (precursor de la proteína Notch 1 de ratón; longitud completa)

MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVANGTEACVCSGAFVG
 QRCQDSNPCLSTPCKNAGTCHVVDHGGTVVDYACSCPLGFSGPLCLTPLDNACLA
 NPCRNGGTCDLLTLTEYKCRCPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYI
 CRCPPGFHGPTRQDNECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATHTGPHCELP
 YVPCSPSPCQNGGTCRPTGDTTTHEACCLPGFAGQNCENVDCCPGNNCKNGGAC
 VDGVNTYNCRCPEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCNHNHGGYNCVCV
 NGWTGEDCSENIDDCASAACFQGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLCHLNDACIS
 NPCNEGSNCDTNPVNGKAICTCPSGYTGPAQSQDVDECALGANPCEHAGKCLNT
 LGSFECQCLQGYTGPRCEIDVNECISNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVYCE
 INTDECASSPCLHNGHCMDKINEFQCQCPKGFNGHLCQYDVDECASTPCKNGAK
 CLDGPNTYTCVCTEGYTGTHCEVDIDECDPDPCHYGSCCKDGVATFTCLCQPGYT
 GHHCEYNINECHSQPCRHHGGTCQDRDNSYLCLCLKGTTPNCEINLDDCASNPCD
 SGTCLDKIDGYEACCEPGYTGSMCNVNIDECAGSPCHNGGTCEDGIAGFTCRCPE
 GYHDPCLSEVNECNSNPCIHGACRDGLNGYKCDCAPGWSGTNCDINNECESN
 PCVNGGTCKDMTSGYVCTCREGFSGPNQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYK
 CNCPLPYTGATCEVVLAPCATSPCKNSGVCKESEDYESFSCVCPGTGWQGGTCEV
 DINECVKSPCRHGAQCNTNGSYRCLCQAGYTGRNCESDIDDCRPNPCHNGGSC
 TDGINTAFCDCLPGFQGAFCCEEDINECASNPCQNGANCTDCVDSYTCCTCPVGFNG
 IHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCPPGFTGSYCYQYDVNECDSRPCLHG
 GTCQDSYGTYKCTCPQGYTGLNQCQLVRWCDSAPCKNGGRCWQTNTQYHCEC
 RSGWTGVNCDVLSVSCEVAAQKRVIDVLLCQHGGGLCVDEGDKHYCHCQAGY
 TGSYCEDEVDECSPNPCQNGATCTDYLGGFSCCKVAGYHGSNCSEEBINECLSQPC
 QNGGTCIDLNTSYKCSQPRGTQGVHCEINVDCHPPLDPASRSPKCFNNGTCVDQ
 VGGYTCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQVRVDFHCECRAHGT
 GRRCESVINGCRGKPKCKNGGVCASANTARGFICRCPAGFEGATCENDARTCGS
 LRCLNGGTCISGPRSPCLCLGSFTGPECQFPASSPCVGSNPCYNQGTCEPTSENP
 YRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDIPPPQIEEACELPECQVDAGNKVCNLQ
 CNNHACGWDDGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDSDQNSAGCLFDG
 FDCQLTEGQCNPPLYDQYCKDHFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPERLAA
 GTLVLVVLLPPDQLRNSFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQGQQMIFPYYGHEEE
 LRKHPIKRSTVGWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVYLEIDNRQCVQSSSQ
 CFQSATDVA AFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSEPVPEPLPSQLHLMYVAAA AFVL
 LFFVCGVLLSRKRRRQHGLWFPEGFVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNA
 SDGALMDDNQNEWGDEDLETKKFRFEPPVLPDLSQTDHRQWTQQHLDAAD
 LRMSAMAPTTPQGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEBEDA
 PAVISDFIYQGASLHNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNM
 GRTPLHA AVSADAQGVFQILLRN RATDL DARMHDGTTPLIL AARLAVEGMLEDL
 INSHADVNAVDDLGKSALHWAAAVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNNKEETPLF
 LAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDHMDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVR
 SPQLHGTALGGTPTLSPTLCSPNGYLG NLKSATQGKKARKPSTKGLACGSKEAK
 DLKARRKKSQDGKGCLLDSSSMLSPVDSLES PHGYLSDVASPPLLPSPFQSPSM
 PLSHLPMPDTHLGISHLNVA AKPEMAALAGGSRLAFEP PPPRLSHLPVASSASTV
 LSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEWLPRLQNGMVPSQYNPLRPGVTPGTLSTQA

AGLQHSMMGPLHSSLSTNTLSPIIYQGLPNTRLATQPHLVQTQQVQPQNLQLQPQ
 NLQPPSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPSSLPVHTILPQESQALPT
 SLPSSMVPPMTTQFLT PPSQHSYSSSPVDNTPSHQLQVPEHPFLTPSPESPQWSS
 SSPHSNISDWSEGISSPPTTMP SQITHIPEAFK

SEQ ID NO: 2 (péptido señal) MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Eli Lilly and Company Audion Therapeutics

5 < 120> COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA RUTA DE NOTCH

ES 2 735 139 T3

<130> X20729

<150> 62/189.393

<151> 07/07/2015

<160> 2

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2531

<212> PRT

<213> Mus musculus

10 <400> 1

Met Pro Arg Leu Leu Thr Pro Leu Leu Cys Leu Thr Leu Leu Pro Ala
1 5 10 15

Leu Ala Ala Arg Gly Leu Arg Cys Ser Gln Pro Ser Gly Thr Cys Leu
20 25 30

Asn Gly Gly Arg Cys Glu Val Ala Asn Gly Thr Glu Ala Cys Val Cys
35 40 45

Ser Gly Ala Phe Val Gly Gln Arg Cys Gln Asp Ser Asn Pro Cys Leu
50 55 60

Ser Thr Pro Cys Lys Asn Ala Gly Thr Cys His Val Val Asp His Gly
65 70 75 80

Gly Thr Val Asp Tyr Ala Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Ser Gly Pro
85 90 95

Leu Cys Leu Thr Pro Leu Asp Asn Ala Cys Leu Ala Asn Pro Cys Arg
100 105 110

Asn Gly Gly Thr Cys Asp Leu Leu Thr Leu Thr Glu Tyr Lys Cys Arg
115 120 125

Cys Pro Pro Gly Trp Ser Gly Lys Ser Cys Gln Gln Ala Asp Pro Cys
130 135 140

Ala Ser Asn Pro Cys Ala Asn Gly Gly Gln Cys Leu Pro Phe Glu Ser
145 150 155 160

ES 2 735 139 T3

Ser Tyr Ile Cys Arg Cys Pro Pro Gly Phe His Gly Pro Thr Cys Arg
 165 170 175

Gln Asp Val Asn Glu Cys Ser Gln Asn Pro Gly Leu Cys Arg His Gly
 180 185 190

Gly Thr Cys His Asn Glu Ile Gly Ser Tyr Arg Cys Ala Cys Arg Ala
 195 200 205

Thr His Thr Gly Pro His Cys Glu Leu Pro Tyr Val Pro Cys Ser Pro
 210 215 220

Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Arg Pro Thr Gly Asp Thr Thr
 225 230 235 240

His Glu Cys Ala Cys Leu Pro Gly Phe Ala Gly Gln Asn Cys Glu Glu
 245 250 255

Asn Val Asp Asp Cys Pro Gly Asn Asn Cys Lys Asn Gly Gly Ala Cys
 260 265 270

Val Asp Gly Val Asn Thr Tyr Asn Cys Arg Cys Pro Pro Glu Trp Thr
 275 280 285

Gly Gln Tyr Cys Thr Glu Asp Val Asp Glu Cys Gln Leu Met Pro Asn
 290 295 300

Ala Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys His Asn Thr His Gly Gly Tyr Asn
 305 310 315 320

Cys Val Cys Val Asn Gly Trp Thr Gly Glu Asp Cys Ser Glu Asn Ile
 325 330 335

Asp Asp Cys Ala Ser Ala Ala Cys Phe Gln Gly Ala Thr Cys His Asp
 340 345 350

Arg Val Ala Ser Phe Tyr Cys Glu Cys Pro His Gly Arg Thr Gly Leu
 355 360 365

Leu Cys His Leu Asn Asp Ala Cys Ile Ser Asn Pro Cys Asn Glu Gly
 370 375 380

Ser Asn Cys Asp Thr Asn Pro Val Asn Gly Lys Ala Ile Cys Thr Cys
 385 390 395 400

Pro Ser Gly Tyr Thr Gly Pro Ala Cys Ser Gln Asp Val Asp Glu Cys
 405 410 415

ES 2 735 139 T3

Ala Leu Gly Ala Asn Pro Cys Glu His Ala Gly Lys Cys Leu Asn Thr
420 425 430

Leu Gly Ser Phe Glu Cys Gln Cys Leu Gln Gly Tyr Thr Gly Pro Arg
435 440 445

Cys Glu Ile Asp Val Asn Glu Cys Ile Ser Asn Pro Cys Gln Asn Asp
450 455 460

Ala Thr Cys Leu Asp Gln Ile Gly Glu Phe Gln Cys Ile Cys Met Pro
465 470 475 480

Gly Tyr Glu Gly Val Tyr Cys Glu Ile Asn Thr Asp Glu Cys Ala Ser
485 490 495

Ser Pro Cys Leu His Asn Gly His Cys Met Asp Lys Ile Asn Glu Phe
500 505 510

Gln Cys Gln Cys Pro Lys Gly Phe Asn Gly His Leu Cys Gln Tyr Asp
515 520 525

Val Asp Glu Cys Ala Ser Thr Pro Cys Lys Asn Gly Ala Lys Cys Leu
530 535 540

Asp Gly Pro Asn Thr Tyr Thr Cys Val Cys Thr Glu Gly Tyr Thr Gly
545 550 555 560

Thr His Cys Glu Val Asp Ile Asp Glu Cys Asp Pro Asp Pro Cys His
565 570 575

Tyr Gly Ser Cys Lys Asp Gly Val Ala Thr Phe Thr Cys Leu Cys Gln
580 585 590

Pro Gly Tyr Thr Gly His His Cys Glu Thr Asn Ile Asn Glu Cys His
595 600 605

Ser Gln Pro Cys Arg His Gly Gly Thr Cys Gln Asp Arg Asp Asn Ser
610 615 620

Tyr Leu Cys Leu Cys Leu Lys Gly Thr Thr Gly Pro Asn Cys Glu Ile
625 630 635 640

Asn Leu Asp Asp Cys Ala Ser Asn Pro Cys Asp Ser Gly Thr Cys Leu
645 650 655

Asp Lys Ile Asp Gly Tyr Glu Cys Ala Cys Glu Pro Gly Tyr Thr Gly
660 665 670

ES 2 735 139 T3

Ser Met Cys Asn Val Asn Ile Asp Glu Cys Ala Gly Ser Pro Cys His
675 680 685

Asn Gly Gly Thr Cys Glu Asp Gly Ile Ala Gly Phe Thr Cys Arg Cys
690 695 700

Pro Glu Gly Tyr His Asp Pro Thr Cys Leu Ser Glu Val Asn Glu Cys
705 710 715 720

Asn Ser Asn Pro Cys Ile His Gly Ala Cys Arg Asp Gly Leu Asn Gly
725 730 735

Tyr Lys Cys Asp Cys Ala Pro Gly Trp Ser Gly Thr Asn Cys Asp Ile
740 745 750

Asn Asn Asn Glu Cys Glu Ser Asn Pro Cys Val Asn Gly Gly Thr Cys
755 760 765

Lys Asp Met Thr Ser Gly Tyr Val Cys Thr Cys Arg Glu Gly Phe Ser
770 775 780

Gly Pro Asn Cys Gln Thr Asn Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys
785 790 795 800

Leu Asn Gln Gly Thr Cys Ile Asp Asp Val Ala Gly Tyr Lys Cys Asn
805 810 815

Cys Pro Leu Pro Tyr Thr Gly Ala Thr Cys Glu Val Val Leu Ala Pro
820 825 830

Cys Ala Thr Ser Pro Cys Lys Asn Ser Gly Val Cys Lys Glu Ser Glu
835 840 845

Asp Tyr Glu Ser Phe Ser Cys Val Cys Pro Thr Gly Trp Gln Gly Gln
850 855 860

Thr Cys Glu Val Asp Ile Asn Glu Cys Val Lys Ser Pro Cys Arg His
865 870 875 880

Gly Ala Ser Cys Gln Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Leu Cys Gln
885 890 895

Ala Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Glu Ser Asp Ile Asp Asp Cys Arg
900 905 910

Pro Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Ser Cys Thr Asp Gly Ile Asn Thr

ES 2 735 139 T3

Ala Phe Cys Asp Cys Leu Pro Gly Phe Gln Gly Ala Phe Cys Glu Glu
 930 935 940

Asp Ile Asn Glu Cys Ala Ser Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala Asn Cys
 945 950 955 960

Thr Asp Cys Val Asp Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Val Gly Phe Asn
 965 970 975

Gly Ile His Cys Glu Asn Asn Thr Pro Asp Cys Thr Glu Ser Ser Cys
 980 985 990

Phe Asn Gly Gly Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Ser Phe Thr Cys Leu
 995 1000 1005

Cys Pro Pro Gly Phe Thr Gly Ser Tyr Cys Gln Tyr Asp Val Asn
 1010 1015 1020

Glu Cys Asp Ser Arg Pro Cys Leu His Gly Gly Thr Cys Gln Asp
 1025 1030 1035

Ser Tyr Gly Thr Tyr Lys Cys Thr Cys Pro Gln Gly Tyr Thr Gly
 1040 1045 1050

Leu Asn Cys Gln Asn Leu Val Arg Trp Cys Asp Ser Ala Pro Cys
 1055 1060 1065

Lys Asn Gly Gly Arg Cys Trp Gln Thr Asn Thr Gln Tyr His Cys
 1070 1075 1080

Glu Cys Arg Ser Gly Trp Thr Gly Val Asn Cys Asp Val Leu Ser
 1085 1090 1095

Val Ser Cys Glu Val Ala Ala Gln Lys Arg Gly Ile Asp Val Thr
 1100 1105 1110

Leu Leu Cys Gln His Gly Gly Leu Cys Val Asp Glu Gly Asp Lys
 1115 1120 1125

His Tyr Cys His Cys Gln Ala Gly Tyr Thr Gly Ser Tyr Cys Glu
 1130 1135 1140

Asp Glu Val Asp Glu Cys Ser Pro Asn Pro Cys Gln Asn Gly Ala
 1145 1150 1155

ES 2 735 139 T3

Thr Cys Thr Asp Tyr Leu Gly Gly Phe Ser Cys Lys Cys Val Ala
 1160 1165 1170

Gly Tyr His Gly Ser Asn Cys Ser Glu Glu Ile Asn Glu Cys Leu
 1175 1180 1185

Ser Gln Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Ile Asp Leu Thr Asn
 1190 1195 1200

Ser Tyr Lys Cys Ser Cys Pro Arg Gly Thr Gln Gly Val His Cys
 1205 1210 1215

Glu Ile Asn Val Asp Asp Cys His Pro Pro Leu Asp Pro Ala Ser
 1220 1225 1230

Arg Ser Pro Lys Cys Phe Asn Asn Gly Thr Cys Val Asp Gln Val
 1235 1240 1245

Gly Gly Tyr Thr Cys Thr Cys Pro Pro Gly Phe Val Gly Glu Arg
 1250 1255 1260

Cys Glu Gly Asp Val Asn Glu Cys Leu Ser Asn Pro Cys Asp Pro
 1265 1270 1275

Arg Gly Thr Gln Asn Cys Val Gln Arg Val Asn Asp Phe His Cys
 1280 1285 1290

Glu Cys Arg Ala Gly His Thr Gly Arg Arg Cys Glu Ser Val Ile
 1295 1300 1305

Asn Gly Cys Arg Gly Lys Pro Cys Lys Asn Gly Gly Val Cys Ala
 1310 1315 1320

Val Ala Ser Asn Thr Ala Arg Gly Phe Ile Cys Arg Cys Pro Ala
 1325 1330 1335

Gly Phe Glu Gly Ala Thr Cys Glu Asn Asp Ala Arg Thr Cys Gly
 1340 1345 1350

Ser Leu Arg Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Ile Ser Gly Pro Arg
 1355 1360 1365

Ser Pro Thr Cys Leu Cys Leu Gly Ser Phe Thr Gly Pro Glu Cys
 1370 1375 1380

Gln Phe Pro Ala Ser Ser Pro Cys Val Gly Ser Asn Pro Cys Tyr
 1385 1390 1395

ES 2 735 139 T3

Asn Gln Gly Thr Cys Glu Pro Thr Ser Glu Asn Pro Phe Tyr Arg
 1400 1405 1410

 Cys Leu Cys Pro Ala Lys Phe Asn Gly Leu Leu Cys His Ile Leu
 1415 1420 1425

 Asp Tyr Ser Phe Thr Gly Gly Ala Gly Arg Asp Ile Pro Pro Pro
 1430 1435 1440

 Gln Ile Glu Glu Ala Cys Glu Leu Pro Glu Cys Gln Val Asp Ala
 1445 1450 1455

 Gly Asn Lys Val Cys Asn Leu Gln Cys Asn Asn His Ala Cys Gly
 1460 1465 1470

 Trp Asp Gly Gly Asp Cys Ser Leu Asn Phe Asn Asp Pro Trp Lys
 1475 1480 1485

 Asn Cys Thr Gln Ser Leu Gln Cys Trp Lys Tyr Phe Ser Asp Gly
 1490 1495 1500

 His Cys Asp Ser Gln Cys Asn Ser Ala Gly Cys Leu Phe Asp Gly
 1505 1510 1515

 Phe Asp Cys Gln Leu Thr Glu Gly Gln Cys Asn Pro Leu Tyr Asp
 1520 1525 1530

 Gln Tyr Cys Lys Asp His Phe Ser Asp Gly His Cys Asp Gln Gly
 1535 1540 1545

 Cys Asn Ser Ala Glu Cys Glu Trp Asp Gly Leu Asp Cys Ala Glu
 1550 1555 1560

 His Val Pro Glu Arg Leu Ala Ala Gly Thr Leu Val Leu Val Val
 1565 1570 1575

 Leu Leu Pro Pro Asp Gln Leu Arg Asn Asn Ser Phe His Phe Leu
 1580 1585 1590

 Arg Glu Leu Ser His Val Leu His Thr Asn Val Val Phe Lys Arg
 1595 1600 1605

 Asp Ala Gln Gly Gln Gln Met Ile Phe Pro Tyr Tyr Gly His Glu
 1610 1615 1620

 Glu Glu Leu Arg Lys His Pro Ile Lys Arg Ser Thr Val Gly Trp
 1625 1630 1635

ES 2 735 139 T3

Ala Thr Ser Ser Leu Leu Pro Gly Thr Ser Gly Gly Arg Gln Arg
1640 1645 1650

Arg Glu Leu Asp Pro Met Asp Ile Arg Gly Ser Ile Val Tyr Leu
1655 1660 1665

Glu Ile Asp Asn Arg Gln Cys Val Gln Ser Ser Ser Gln Cys Phe
1670 1675 1680

Gln Ser Ala Thr Asp Val Ala Ala Phe Leu Gly Ala Leu Ala Ser
1685 1690 1695

Leu Gly Ser Leu Asn Ile Pro Tyr Lys Ile Glu Ala Val Lys Ser
1700 1705 1710

Glu Pro Val Glu Pro Pro Leu Pro Ser Gln Leu His Leu Met Tyr
1715 1720 1725

Val Ala Ala Ala Ala Phe Val Leu Leu Phe Phe Val Gly Cys Gly
1730 1735 1740

Val Leu Leu Ser Arg Lys Arg Arg Arg Gln His Gly Gln Leu Trp
1745 1750 1755

Phe Pro Glu Gly Phe Lys Val Ser Glu Ala Ser Lys Lys Lys Arg
1760 1765 1770

Arg Glu Pro Leu Gly Glu Asp Ser Val Gly Leu Lys Pro Leu Lys
1775 1780 1785

Asn Ala Ser Asp Gly Ala Leu Met Asp Asp Asn Gln Asn Glu Trp
1790 1795 1800

Gly Asp Glu Asp Leu Glu Thr Lys Lys Phe Arg Phe Glu Glu Pro
1805 1810 1815

Val Val Leu Pro Asp Leu Ser Asp Gln Thr Asp His Arg Gln Trp
1820 1825 1830

Thr Gln Gln His Leu Asp Ala Ala Asp Leu Arg Met Ser Ala Met
1835 1840 1845

Ala Pro Thr Pro Pro Gln Gly Glu Val Asp Ala Asp Cys Met Asp
1850 1855 1860

Val Asn Val Arg Gly Pro Asp Gly Phe Thr Pro Leu Met Ile Ala

ES 2 735 139 T3

Ser Cys Ser Gly Gly Gly Leu Glu Thr Gly Asn Ser Glu Glu Glu
 1880 1885 1890

Glu Asp Ala Pro Ala Val Ile Ser Asp Phe Ile Tyr Gln Gly Ala
 1895 1900 1905

Ser Leu His Asn Gln Thr Asp Arg Thr Gly Glu Thr Ala Leu His
 1910 1915 1920

Leu Ala Ala Arg Tyr Ser Arg Ser Asp Ala Ala Lys Arg Leu Leu
 1925 1930 1935

Glu Ala Ser Ala Asp Ala Asn Ile Gln Asp Asn Met Gly Arg Thr
 1940 1945 1950

Pro Leu His Ala Ala Val Ser Ala Asp Ala Gln Gly Val Phe Gln
 1955 1960 1965

Ile Leu Leu Arg Asn Arg Ala Thr Asp Leu Asp Ala Arg Met His
 1970 1975 1980

Asp Gly Thr Thr Pro Leu Ile Leu Ala Ala Arg Leu Ala Val Glu
 1985 1990 1995

Gly Met Leu Glu Asp Leu Ile Asn Ser His Ala Asp Val Asn Ala
 2000 2005 2010

Val Asp Asp Leu Gly Lys Ser Ala Leu His Trp Ala Ala Ala Val
 2015 2020 2025

Asn Asn Val Asp Ala Ala Val Val Leu Leu Lys Asn Gly Ala Asn
 2030 2035 2040

Lys Asp Met Gln Asn Asn Lys Glu Glu Thr Pro Leu Phe Leu Ala
 2045 2050 2055

Ala Arg Glu Gly Ser Tyr Glu Thr Ala Lys Val Leu Leu Asp His
 2060 2065 2070

Phe Ala Asn Arg Asp Ile Thr Asp His Met Asp Arg Leu Pro Arg
 2075 2080 2085

Asp Ile Ala Gln Glu Arg Met His His Asp Ile Val Arg Leu Leu
 2090 2095 2100

ES 2 735 139 T3

Asp Glu Tyr Asn Leu Val Arg Ser Pro Gln Leu His Gly Thr Ala
 2105 2110 2115

 Leu Gly Gly Thr Pro Thr Leu Ser Pro Thr Leu Cys Ser Pro Asn
 2120 2125 2130

 Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Lys Ser Ala Thr Gln Gly Lys Lys Ala
 2135 2140 2145

 Arg Lys Pro Ser Thr Lys Gly Leu Ala Cys Gly Ser Lys Glu Ala
 2150 2155 2160

 Lys Asp Leu Lys Ala Arg Arg Lys Lys Ser Gln Asp Gly Lys Gly
 2165 2170 2175

 Cys Leu Leu Asp Ser Ser Ser Met Leu Ser Pro Val Asp Ser Leu
 2180 2185 2190

 Glu Ser Pro His Gly Tyr Leu Ser Asp Val Ala Ser Pro Pro Leu
 2195 2200 2205

 Leu Pro Ser Pro Phe Gln Gln Ser Pro Ser Met Pro Leu Ser His
 2210 2215 2220

 Leu Pro Gly Met Pro Asp Thr His Leu Gly Ile Ser His Leu Asn
 2225 2230 2235

 Val Ala Ala Lys Pro Glu Met Ala Ala Leu Ala Gly Gly Ser Arg
 2240 2245 2250

 Leu Ala Phe Glu Pro Pro Pro Pro Arg Leu Ser His Leu Pro Val
 2255 2260 2265

 Ala Ser Ser Ala Ser Thr Val Leu Ser Thr Asn Gly Thr Gly Ala
 2270 2275 2280

 Met Asn Phe Thr Val Gly Ala Pro Ala Ser Leu Asn Gly Gln Cys
 2285 2290 2295

 Glu Trp Leu Pro Arg Leu Gln Asn Gly Met Val Pro Ser Gln Tyr
 2300 2305 2310

 Asn Pro Leu Arg Pro Gly Val Thr Pro Gly Thr Leu Ser Thr Gln
 2315 2320 2325

 Ala Ala Gly Leu Gln His Ser Met Met Gly Pro Leu His Ser Ser
 2330 2335 2340

ES 2 735 139 T3

Leu Ser Thr Asn Thr Leu Ser Pro Ile Ile Tyr Gln Gly Leu Pro
 2345 2350 2355

Asn Thr Arg Leu Ala Thr Gln Pro His Leu Val Gln Thr Gln Gln
 2360 2365 2370

Val Gln Pro Gln Asn Leu Gln Leu Gln Pro Gln Asn Leu Gln Pro
 2375 2380 2385

Pro Ser Gln Pro His Leu Ser Val Ser Ser Ala Ala Asn Gly His
 2390 2395 2400

Leu Gly Arg Ser Phe Leu Ser Gly Glu Pro Ser Gln Ala Asp Val
 2405 2410 2415

Gln Pro Leu Gly Pro Ser Ser Leu Pro Val His Thr Ile Leu Pro
 2420 2425 2430

Gln Glu Ser Gln Ala Leu Pro Thr Ser Leu Pro Ser Ser Met Val
 2435 2440 2445

Pro Pro Met Thr Thr Thr Gln Phe Leu Thr Pro Pro Ser Gln His
 2450 2455 2460

Ser Tyr Ser Ser Ser Pro Val Asp Asn Thr Pro Ser His Gln Leu
 2465 2470 2475

Gln Val Pro Glu His Pro Phe Leu Thr Pro Ser Pro Glu Ser Pro
 2480 2485 2490

Asp Gln Trp Ser Ser Ser Ser Pro His Ser Asn Ile Ser Asp Trp
 2495 2500 2505

Ser Glu Gly Ile Ser Ser Pro Pro Thr Thr Met Pro Ser Gln Ile
 2510 2515 2520

Thr His Ile Pro Glu Ala Phe Lys
 2525 2530

<210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

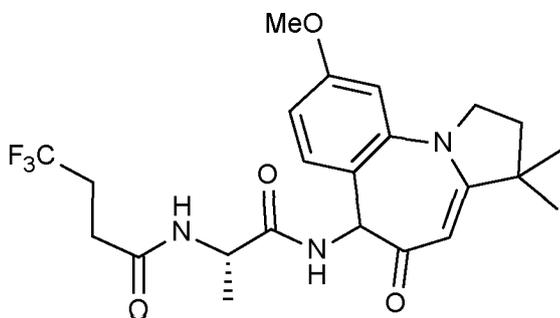
5

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 2

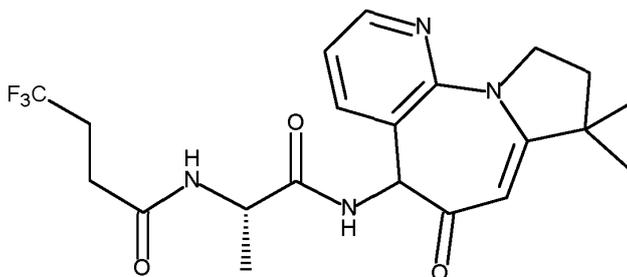
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de estructura:



5 4,4,4-trifluoro-N-((2S)-1-((9-metoxi-3,3-dimetil-5-oxo-2,3,5,6-tetrahidro-1H-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida, un isómero diastereomérico del mismo con una pureza isomérica en la posición 6 mayor del 90 % de exceso enantiomérico o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

2. Un compuesto de estructura:



10 N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-oxopropan-2-il)-4,4,4-trifluorobutanamida, un isómero diastereomérico del mismo con una pureza isomérica en la posición 5 mayor del 90 % de exceso enantiomérico o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

3. Una composición farmacéutica que comprende o un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

15 4. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en terapia.

5. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovarios, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de piel, meduloblastoma, angiosarcoma, rabdomiosarcoma, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático o extrahepático o carcinoma adenoide quístico.

25 6. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 en el tratamiento del cáncer de pulmón.

30 7. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la pérdida de audición neurosensorial provocada por la pérdida de células ciliadas auditivas.

8. Un compuesto de la reivindicación 1 o 2 o un diastereómero del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en la inducción de la generación de células ciliadas auditivas.