

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 082**

51 Int. Cl.:

C07D 223/20 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/02 (2006.01)

C07D 223/18 (2006.01)

A61K 47/10 (2007.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/34 (2007.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016 PCT/US2016/059194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17075264**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016 E 16791511 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 3368515**

54 Título: **Compuestos de dibenzo azepina y su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos óticos**

30 Prioridad:

30.10.2015 US 201562248625 P

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

30.03.2020

73 Titular/es:

**PIPELINE THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
10578 Science Center Drive, Suite 200
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**SEIDERS, THOMAS, JON;
LEE, CATHERINE, YULING y
LI, YIWEI**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 751 082 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 de dibenzo azepina y su uso en el tratamiento de enfermedades y trastornos óticos

5 ANTECEDENTES

Campo

10 La presente divulgación está dirigida al uso de ciertos derivados de dibenzo azepina sustituidos y composiciones farmacéuticas de los mismos en el tratamiento de enfermedades y trastornos óticos del oído interno. La presente divulgación está dirigida además a composiciones farmacéuticas y métodos para tratar enfermedades y trastornos óticos.

Descripción

15 La pérdida de audición afecta a más del diez por ciento de la población de los Estados Unidos. El daño al sistema auditivo periférico es responsable de la mayoría de tales déficits auditivos. En particular, la destrucción de las células pilosas y la destrucción de las neuronas aferentes primarias en los ganglios espirales, que transducen las señales auditivas de las células pilosas al cerebro, se han implicado como causas principales de discapacidades auditivas.

20 Los agentes que provocan discapacidad auditiva incluyen ruidos fuertes, envejecimiento, infecciones y productos químicos ototóxicos. Entre los últimos se encuentran ciertos fármacos terapéuticos, contaminantes en alimentos o medicinas, y contaminantes ambientales e industriales. Los agentes terapéuticos que han demostrado tener efectos adversos sobre la audición incluyen antibióticos aminoglucósidos (como la estreptomina, neomicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina y amikacina), agentes antineoplásicos que contienen platino como el cisplatino y el carboplatino, ciertos antibióticos macrólidos como la eritromicina, antibióticos de glicopéptidos como la vancomicina, quinina y sus análogos, salicilato y sus análogos, y diuréticos de asa como la furosemida y el ácido etacrínico. Las ototoxinas como el cisplatino y los antibióticos aminoglucósidos se acumulan en las células pilosas cocleares, y se cree que el daño celular a estas células como resultado de la acumulación es la razón principal de la pérdida de audición inducida químicamente. Los sistemas vestibular y auditivo comparten muchas características, incluyendo las inervaciones neuronales periféricas de las células pilosas y las proyecciones centrales a los núcleos del tronco encefálico. Las funciones vestibulares son similarmente sensibles a las ototoxinas como se ha descrito anteriormente.

35 Los efectos tóxicos de estos fármacos sobre las células auditivas y las neuronas del ganglio espiral son a menudo el factor limitante en su utilidad terapéutica. Por ejemplo, los antibióticos aminoglucósidos son antimicrobianos de amplio espectro eficaces contra bacterias grampositivas, gramnegativas y acidorresistentes. Se usan principalmente para tratar infecciones provocadas por bacterias gramnegativas, a menudo en combinación con betalactámicos que proporcionan efectos sinérgicos. Las ventajas de usar los antibióticos aminoglucósidos incluyen una baja incidencia de diarrea por Clostridium difficile con respecto a otros antibióticos, y un riesgo bajo de reacciones alérgicas. Sin embargo, se sabe que los aminoglucósidos muestran ototoxicidad grave, especialmente a dosis más altas. Por ejemplo, el 25% de los pacientes a los que se les dio un gramo de estreptomina al día durante 40 60 a 120 días mostraron alguna discapacidad vestibular, mientras que a dos gramos por día, la incidencia aumentó al 75%, y algunos pacientes sufren daño permanente (ver Patente de Estados Unidos N° 5.059.591).

50 Los salicilatos, como la aspirina, se han usado durante mucho tiempo por sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antitrombóticos. Desafortunadamente, los salicilatos tienen efectos secundarios ototóxicos, llevando a menudo a tinnitus ("zumbido en los oídos") y a pérdida de audición temporal, y si se usan en dosis altas durante un tiempo prolongado, la discapacidad auditiva puede volverse persistente e irreversible (J.A. Brien, 1993, Drug Safety 9:143-148).

55 Se sabe que los diuréticos de asa (como el ácido etacrínico, la furosemida y la bumetanida) provocan ototoxicidad. También se ha demostrado experimentalmente que varios diuréticos de asa menos usados provocan ototoxicidad; Este grupo incluye torsemida, azosemida, ozolinona, indacrinona y piretanida. La pérdida de audición asociada con los diuréticos de asa es frecuentemente, pero no siempre, reversible.

60 La ototoxicidad es un grave efecto secundario limitante de la dosis para el cisplatino, un agente antineoplásico ampliamente usado que ha demostrado su eficacia en una variedad de cánceres humanos, incluyendo los cánceres de testículo, ovario, vejiga, y cabeza y cuello. Los efectos secundarios tóxicos del cisplatino (neuropatías periféricas, mielosupresión, toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad y ototoxicidad) son bien conocidos. La administración rutinaria de manitol, solución salina hipertónica, y administración de fluidos alta ha mejorado en gran medida la nefrotoxicidad inducida por el cisplatino, dejando la ototoxicidad como el principal factor limitante de la dosis en la actualidad. Por tanto, aunque un número creciente de pacientes con cáncer sobreviven a los regímenes modernos de quimioterapia, con frecuencia padecen de discapacidad auditiva inducida por el cisplatino.

El cisplatino daña tanto el sistema auditivo como el vestibular. Los efectos ototóxicos principales del cisplatino parecen tener lugar en la cóclea. Los cambios anatómicos tienen lugar tanto en la estría vascular como en el órgano de Corti. Los hallazgos histológicos principales incluyen la degeneración de las células pilosas relacionada con la dosis y el daño a las células de soporte, y a dosis altas, puede producirse un colapso total del laberinto membranoso. En el órgano de Corti, hay pérdida de células pilosas externas e internas, con una propensión a la pérdida de células pilosas externas en el giro basal, y alteraciones en las células de soporte y la membrana de Reissner. También se ha informado del ablandamiento de la placa cuticular y un número aumentado de cuerpos lisosomales en la porción apical de la célula pilosa externa.

La pérdida de audición inducida por ruido (NIHL) describe un proceso de enfermedad crónica con discapacidad auditiva que se produce gradualmente durante muchos años de exposición a niveles de ruido menos intensos, en donde el daño es en el oído interno, específicamente, la cóclea. Este tipo de pérdida de audición generalmente es provocada por exposición crónica a ruido continuo de alta intensidad con impacto episódico superpuesto o ruido impulsivo. Tanto un sonido intenso presentado al oído durante un período de tiempo corto como un sonido menos intenso que se presenta durante un período de tiempo más prolongado producirán el mismo daño en el oído interno. La mayoría de las NIHL crónicas se deben a la exposición ocupacional o industrial. Sin embargo, una forma no ocupacional de NIHL, denominada socioacusis, puede ser el resultado de disparos, música alta (en conciertos o por auriculares), vehículos abiertos como motocicletas, motos de nieve o tractores, y herramientas eléctricas por nombrar unas pocas. Aunque el daño auditivo es a menudo simétrico, es decir, están afectados ambos oídos, hay casos, como la pérdida de audición debido a tiro al blanco frecuente, que dan como resultado una pérdida de audición asimétrica.

Tras la exposición a un ruido impulsivo, como una explosión explosiva, un paciente puede sufrir un daño significativo en la membrana timpánica y el oído medio. En la exposición crónica, que generalmente se produce a niveles de intensidad más bajos, los daños al oído medio y a la membrana timpánica son poco probables. En la exposición al ruido, el daño principal e inicial es generalmente coclear, produciéndose con el tiempo una degeneración neural secundaria del sistema auditivo. La pérdida de audición inducida por ruido ha sido revisada por K. Campbell en "Essential Audiology for Physicians" (1998), San Diego: Singular Publishing Group, Inc.

La pérdida de audición relacionada con la edad, o presbiacusia, es un trastorno neurodegenerativo común en adultos de edad avanzada. Aproximadamente una de cada tres personas en los Estados Unidos entre 65 y 74 años de edad tiene pérdida de audición, y casi la mitad de los mayores de 75 años tienen dificultades auditivas (datos del National Institution on Deafness and other Communication Disorders). El proceso de envejecimiento interactúa con muchos otros factores, como la exposición al ruido y otros traumas ototóxicos que son peligrosos para las células pilosas receptoras (HC) y las neuronas del ganglio espiral (SGN) en la cóclea. En muchos casos, es difícil distinguir entre los efectos del envejecimiento per se y los efectos de otros factores peligrosos sobre la muerte celular en la cóclea. La pérdida de audición permanente resultante de la pérdida de HC y SGN es irreversible ya que las células se desarrollan terminalmente y no pueden reemplazarse por mitosis.

La otitis media es una inflamación del oído medio, más comúnmente asociada con infección viral o bacteriana. Un porcentaje relativamente alto de la población, particularmente niños, se ven afectados. En los niños, la enfermedad se asocia con mayor frecuencia con afecciones de las vías respiratorias superiores que desencadenan una respuesta de secreción transudada en la trompa de Eustaquio y el oído medio. Las bacterias y los virus migran desde la nasofaringe al oído medio normalmente lleno de aire a través de la trompa de Eustaquio, y pueden hacer que se bloquee la trompa de Eustaquio, evitando la ventilación y el drenaje del oído medio. Entonces, se acumula fluido detrás del tímpano, provocando dolor e inflamación.

La otitis media es la causa más común de pérdida de audición entre los niños. Aunque la otitis media se trata fácilmente con antibióticos y normalmente no es grave, la otitis media frecuente y/o no tratada puede dañar permanentemente la audición de un niño. El fluido que queda en el oído medio puede provocar episodios repetidos de otitis media aguda y, si la afección se vuelve crónica, puede provocar recurrencias frecuentes de infecciones agudas. En las formas más graves de otitis media, el exudado purulento, las toxinas y las enzimas antimicrobianas endógenas se acumulan en el oído medio, lo que puede provocar daños irreparables en las estructuras sensoriales-neurales y conductoras del sonido. El daño al tímpano, los huesos del oído o los nervios auditivos provocado por tales infecciones puede llevar potencialmente a una pérdida de audición permanente. La pérdida de audición también puede ser el resultado de un deterioro, daño o destrucción de las células pilosas cocleares del oído interno, ya que sustancias dañinas en el espacio del oído medio acceden al oído interno mediante difusión a través de la membrana de la ventana redonda.

Izumikawa, M., et. al., "Auditory Hair Cell Replacement and Hearing Improvement by Atoh1 Gene Therapy in Deaf Mammals", Nat. Med. 11(3), 271-276 (2005), divulga que la administración del gen Atoh1 a través de un adenovector a la cóclea mejoró el umbral de audición en cobayas. Se entiende que los inhibidores de la vía de señalización de Notch, y en particular, los inhibidores de la gamma secretasa selectivos estimulan la diferenciación de células pilosas a través de su efecto positivo sobre la expresión de Atoh1. (Zheng et al., "Hes1 is a Negative

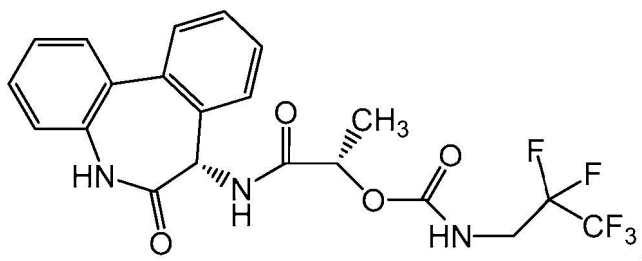
Regulator of Inner Ear Hair Cell Differentiation", Development, 2000, 127(21):4551-60; Zine et al., "Hes1 and Hes5 Activities Are Required for the Normal Development of the Hair Cells in the Mammalian Inner Ear", J Neurosci., 2001, 21(13):4712-20; Yamamoto et al., "Inhibition of Notch/RBP-J Signaling Induces Hair Cell Formation in Neonate Mouse Cochleas", J Mol Med, 2006, 84(1):37-45).

Mizutari, K., et. al., "Notch Inhibition Induces Cochlear Hair Cell Regeneration and Recovery of Hearing after Acoustic Trauma", Neuron 77, 58-69 (2013), describió un estudio de LY411575 en ratones jóvenes con pérdida de audición inducida por ruido.

Los solicitantes han identificado derivados de dibenzo azepina sustituidos seleccionados, que son especialmente adecuados para la tarea del tratamiento (incluyendo la prevención, reducción de la incidencia y/o gravedad, ralentización o detención de la progresión y reversión) de enfermedades y trastornos óticos del oído interno.

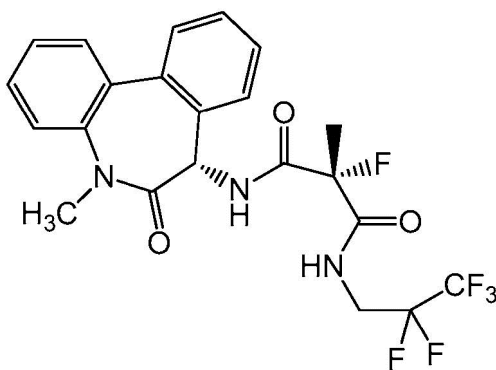
SUMARIO

La presente divulgación proporciona formas cristalinas de un compuesto seleccionado del Compuesto I que tiene la fórmula:



Compuesto I

y el Compuesto II que tiene la fórmula:



Compuesto II

En algunas realizaciones, el presente Compuesto I cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 8,2, 13,8, 14,0, 18,4 y 20,9 $\pm$ 0,5 grados dos-theta.

En algunas realizaciones, el presente Compuesto I cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 4,6, 8,2, 9,2, 13,8, 14,0, 18,2, 18,4, 20,9, 23,8 y 27,7 $\pm$ 0,15 grados dos-theta.

En algunas realizaciones, el presente Compuesto I cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 3,0, 4,6, 8,2, 9,2, 10,4, 13,8, 14,0, 16,4, 18,2, 18,4, 18,8, 19,1, 20,9, 21,5, 22,2, 22,7, 23,0, 23,8, 24,3, 24,7, 25,2, 26,5, 26,6, 27,1, 27,7, 28,1, 28,3, 28,6, 29,0, 30,0, 31,2, 31,5, 31,8, 32,1, 32,4, 35,1, 35,6, 35,8, 36,4, 36,7, 38,4, 38,8, 39,8, 40,5, y 40,8 $\pm$ 0,15 grados dos-theta.

En algunas realizaciones, el presente Compuesto I cristalino se caracteriza además por tener un inicio endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a aproximadamente 238,5° C.

En algunas realizaciones, el presente Compuesto I cristalino se caracteriza además por tener un pico endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a aproximadamente 249,3° C.

5 En algunas realizaciones, el presente Compuesto II cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 8,4, 15,2, 16,0, 20,6 y 22,6 ± 0,15 grados dos-theta.

En algunas realizaciones, el presente Compuesto II cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 6,5, 8,4, 15,2, 16,0, 19,9, 20,6, 22,6, 24,5, 25,1 y 30,6 ± 0,15 grados dos-theta.

10 En algunas realizaciones, el presente Compuesto II cristalino se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 6,5, 8,4, 10,1, 13,1, 14,6, 15,0, 15,2, 16,0, 17,6, 18,0, 18,4, 19,6, 19,9, 20,1, 20,6, 20,9, 21,2, 22,2, 22,6, 23,3, 23,5, 23,8, 24,5, 24,9, 25,1, 25,8, 26,1, 26,7, 26,8, 27,5, 27,8, 29,6, 30,6, 31,2, 32,3, 32,9, 33,2, 33,9, 34,4, 35,4, 36,3, 36,7, 37,3, 37,7, 38,0, 38,9, 40,0, 40,2, 40,8, y 41,6 ± 0,15 grados dos-theta.

15 En algunas realizaciones, la forma cristalina del Compuesto II se caracteriza además por tener un inicio endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a aproximadamente 173° C.

En algunas realizaciones, la forma cristalina del Compuesto II se caracteriza además por tener un pico endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a aproximadamente 175° C.

20 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica acuosa para administración intratimpánica que comprende:

25 (1) un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino de las realizaciones proporcionadas anteriormente, y
(2) una solución acuosa farmacéuticamente aceptable que comprende:

(A) aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407; o

30 (B)

(i) aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407 y

(ii) aproximadamente del 0,5% al 4% en peso (p/p) de hidroxipropilmetilcelulosa que tiene una viscosidad nominal de 40-60 cP o grado 80-120 cP; o

35 (C)

(i) aproximadamente el 10% -20% en peso (p/p) de poloxámero 407, y

(ii) aproximadamente el 0,1% -0,3% en peso (p/p) de Carbopol® 974P; o

40 (D)

(i) aproximadamente del 0,5% al 8% en peso (p/p) de un ácido hialurónico; o

45 (E)

(i) aproximadamente del 0,5% al 4% en peso (p/p) de un ácido hialurónico, y

(ii) aproximadamente del 5% al 20% en volumen de polietilenglicol 400;

50 en donde dicho agente activo está presente en aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 20% p/v de dicha solución acuosa.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, la solución acuosa comprende:

55 (A) aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407; o

(B)

(i) aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407 y

(ii) aproximadamente del 0,5% al 4% en peso (p/p) de hidroxipropilmetilcelulosa que tiene una viscosidad nominal de 40-60 cP o grado 80-120 cP; o

60 (C)

(i) aproximadamente el 10%-20% en peso (p/p) de poloxámero 407, y

(ii) aproximadamente el 0,1%-0,3% en peso (p/p) de Carbopol® 974P.

65

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407.

5 En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, el pH de dicha solución acuosa está entre aproximadamente 7,0 y 8,0.

10 En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, dicha solución acuosa comprende además un agente tampón.

En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, dicha solución acuosa comprende además un agente tampón seleccionado de (i) fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico o una combinación de los mismos; y (ii) tris(hidroximetil)aminometano.

15 En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, dicho agente activo está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v.

20 En algunas realizaciones de la composición farmacéutica acuosa, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso (p/p) de poloxámero 407.

25 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa comprende: (1) el Compuesto I cristalino descrito anteriormente, y (2) una solución acuosa farmacéuticamente aceptable que comprende aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y 8,0; y en donde dicho Compuesto I cristalino está presente en de aproximadamente el 0,01% al 20% p/v de dicha solución acuosa. En algunas realizaciones, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso de poloxámero 407. En algunas realizaciones, el Compuesto I cristalino está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v. En algunas realizaciones, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso de poloxámero 407, y el Compuesto I cristalino está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v.

30 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa comprende: (1) el Compuesto II cristalino descrito anteriormente, y (2) una solución acuosa farmacéuticamente aceptable que comprende aproximadamente del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y 8,0; y en donde dicho Compuesto II cristalino está presente en de aproximadamente el 0,01% al 20% p/v de dicha solución acuosa. En algunas realizaciones, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso de poloxámero 407. En algunas realizaciones, el Compuesto II cristalino está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v. En algunas realizaciones, dicha solución acuosa comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso de poloxámero 407, y el Compuesto II cristalino está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v.

40 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de trastornos óticos que comprende la administración intratimpánica de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo seleccionado de los compuestos cristalinos divulgados en la presente a un paciente con necesidad de ello a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de dicho paciente.

45 En algunas realizaciones del método de tratamiento de trastornos óticos, el trastorno ótico puede ser la pérdida de audición.

50 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar un trastorno ótico que comprende la administración intratimpánica de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente a un paciente con necesidad de dicho tratamiento a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de dicho paciente. En algunas realizaciones, el trastorno ótico puede ser la pérdida de audición. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa puede administrarse a una frecuencia de entre una vez a la semana y una vez cada 3 meses.

55 En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar la pérdida de audición que comprende la administración intratimpánica a un paciente con necesidad de dicho tratamiento a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de dicho paciente de una composición farmacéutica acuosa que comprende (1) un agente activo seleccionado de los compuestos cristalinos descritos en la presente; y (2) una solución acuosa que comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso (p/p) de poloxámero 407, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y 8,0; y en donde dicho agente activo está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v. En algunas realizaciones, el agente activo es el Compuesto I cristalino como se describe en la presente. En algunas realizaciones, el agente activo es el Compuesto II cristalino como se describe en la presente.

65 Algunas realizaciones de la presente divulgación están dirigidas al uso de un agente activo seleccionado de los compuestos cristalinos divulgados en la presente o una composición que comprende los mismos en la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos óticos. En algunas realizaciones, el medicamento

se formula para administración intratimpánica a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de un paciente. En algunas realizaciones del uso, el trastorno ótico puede ser la pérdida de audición.

Algunas realizaciones de la presente divulgación están dirigidas al uso de un agente activo seleccionado de los compuestos cristalinos divulgados en la presente o una composición que comprende los mismos en la preparación de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente para su uso en el tratamiento de un trastorno ótico. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa se formula para la administración intratimpánica a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de un paciente. En algunas realizaciones, el trastorno ótico puede ser la pérdida de audición.

Algunas realizaciones de la presente divulgación están dirigidas al uso de un agente activo seleccionado de los compuestos cristalinos divulgados en la presente o una composición que comprende los mismos en la preparación de una composición farmacéutica acuosa que comprende (1) un agente activo seleccionado de un compuesto cristalino descrito en la presente; y (2) una solución acuosa que comprende aproximadamente del 15% al 18% en peso (p/p) de poloxámero 407, en donde el pH está entre aproximadamente 7,0 y 8,0; y en donde dicho agente activo está presente en aproximadamente del 0,1% al 5% p/v en el tratamiento de la pérdida de audición. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa se formula para la administración intratimpánica a un área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de un paciente. En algunas realizaciones, el agente activo es el Compuesto I cristalino como se describe en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 representa el difractograma de difracción de rayos X en polvo del Compuesto I cristalino.

La Fig. 2 representa la curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el Compuesto cristalino I.

La Fig. 3 representa el difractograma de difracción de rayos X en polvo del Compuesto II cristalino.

La Fig. 4 representa la curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para el Compuesto II cristalino.

La Fig. 5A representa PK de cobaya en la perilinfa para una composición farmacéutica acuosa que comprende el Compuesto I en forma amorfa y en forma cristalina.

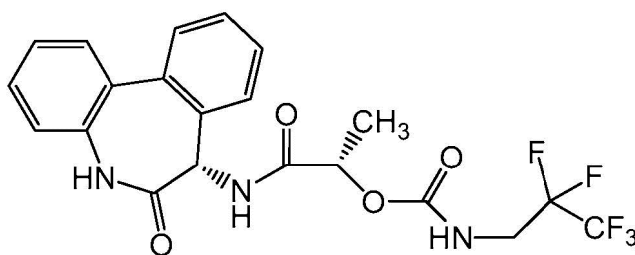
La Fig. 5B representa PK de cobaya en la cóclea para una composición farmacéutica acuosa que comprende el compuesto I en forma amorfa y en forma cristalina.

La Fig. 6A representa PK de cobaya en la perilinfa para una composición farmacéutica acuosa que comprende el Compuesto II en forma amorfa y en forma cristalina.

La Fig. 6B representa PK de cobaya en la cóclea para una composición farmacéutica acuosa que comprende el Compuesto II en forma amorfa y en forma de cristalina.

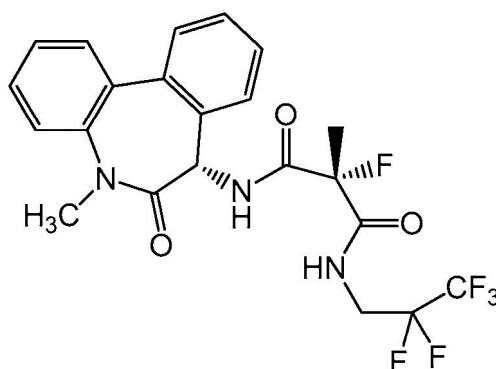
DESCRIPCIÓN DETALLADA

El término "Compuesto I" se refiere al compuesto ácido (2,2,3,3,3-pentafluoropropil)-carbámico (S)-1-((S)-6-oxo-6,7-dihidro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-ilcarbamoil) etil éster que tiene la fórmula de la estructura:



Compuesto I

El término "Compuesto II" se refiere al compuesto (2R)-2-fluoro-2-metil-N-[(S)-5-metil-6-oxo-6,7-dihidro-5H-dibenzo[b,d]azepin-7-il]-N'-(2,2,3,3,3-pentafluoropropil)malonamida que tiene la fórmula de la estructura:



Compuesto II

Las formas cristalinas del Compuesto I y el Compuesto II pueden obtenerse disolviendo el material amorfo correspondiente en un alcohol como metanol o etanol, y recogiendo posteriormente los sólidos formados. El Compuesto I y el Compuesto II cristalinos se caracterizaron usando difracción de rayos X en polvo usando un difractómetro Bruker (Billerica, Massachusetts) AXS C2 GADDS o un Bruker AXS D8 Advance utilizando radiaciones de cobre K-alfa (40kV, 40mA). Los datos de DSC se recopilaron en un DSC 823E de Mettler (Columbus, Ohio) equipado con un muestreador automático de 34 posiciones. El instrumento fue calibrado para energía y temperatura usando indio certificado. Típicamente, se calentaron 0,5-3 mg de cada muestra, en un recipiente de aluminio con agujereado, a 10° C/min de 25° C a 300° C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra.

El Compuesto I cristalino puede caracterizarse por el patrón de difracción de rayos X en polvo de Cu K-α (XRPD) sustancialmente como se muestra en la Fig. 3. Alternativamente, el Compuesto I cristalino puede caracterizarse por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 8,2, 13,8, 14,0, 18,4, 20,9 ± 0,15 grados dos-theta; o por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 4,6, 8,2, 9,2, 13,8, 14,0, 18,2, 18,4, 20,9, 23,8, 27,7 ± 0,15 grados dos-theta; o por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 3,0, 4,6, 8,2, 9,2, 10,4, 13,8, 14,0, 16,4, 18,2, 18,4, 18,8, 19,1, 20,9, 21,5, 22,2, 22,7, 23,0, 23,8, 24,3, 24,7, 25,2, 26,5, 26,6, 27,1, 27,7, 28,1, 28,3, 28,6, 29,0, 30,0, 31,2, 31,5, 31,8, 32,1, 32,4, 35,1, 35,6, 35,8, 36,4, 36,7, 38,4, 38,8, 39,8, 40,5, 40,8 ± 0,15 grados dos-theta. Alternativamente, el Compuesto I cristalino puede caracterizarse como se describe en la sección de Ejemplos, más adelante.

El Compuesto II cristalino puede caracterizarse por el patrón de difracción de rayos X en polvo de Cu K-α (XRPD) sustancialmente como se muestra en la Fig. 4. Alternativamente, el Compuesto II cristalino puede caracterizarse por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 8,4, 15,2, 16,0, 20,6, 22,6 ± 0,15 grados dos-theta; o por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 6,5, 8,4, 15,2, 16,0, 19,9, 20,6, 22,6, 24,5, 25,1, 30,6 ± 0,15 grados de dos theta; o por el patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a aproximadamente 6,5, 8,4, 10,1, 13,1, 14,6, 15,0, 15,2, 16,0, 17,6, 18,0, 18,4, 19,6, 19,9, 20,1, 20,6, 20,9, 21,2, 22,2, 22,6, 23,3, 23,5, 23,8, 24,5, 24,9, 25,1, 25,8, 26,1, 26,7, 26,8, 27,5, 27,8, 29,6, 30,6, 31,2, 32,3, 32,9, 33,2, 33,9, 34,4, 35,4, 36,3, 36,7, 37,3, 37,7, 38,0, 38,9, 40,0, 40,2, 40,8, 41,6 ± 0,2. Alternativamente, el Compuesto II cristalino puede caracterizarse como se describe en la sección de Ejemplos, más adelante.

El Compuesto I y el Compuesto II cristalinos son útiles en la preparación de composiciones farmacéuticas acuosas para administración intratimpánica como se describe en la presente. El Compuesto I y el Compuesto II cristalinos y las composiciones farmacéuticas acuosas que los contienen son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos óticos.

Composición farmacéutica

En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a composiciones farmacéuticas acuosas para administración intratimpánica que comprenden un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino, y una solución acuosa farmacéuticamente aceptable. Los agentes activos son inhibidores de la vía de señalización de Notch y, en particular, son inhibidores de la gamma secretasa selectivos.

En algunas realizaciones, el agente activo se selecciona del Compuesto I cristalino como se describe y caracteriza en la presente. En algunas realizaciones, el agente activo es el Compuesto II cristalino como se describe y caracteriza en la presente.

En algunas realizaciones, el agente activo cristalino se procesa adicionalmente para proporcionar un tamaño de partícula más uniforme o para controlar el tamaño de partícula o para reducir el tamaño de partícula. Por ejemplo, el material cristalino inicial puede someterse a medios de impacto mecánico como trituración, pulverización, molienda (como molienda de bolas y molienda por chorro), y similares para proporcionar partículas que tengan la

distribución del tamaño de partícula deseada.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas acuosas para administración intratimpánica comprenden proporcionar una liberación sostenida del agente activo en el oído medio. Las formulaciones de liberación sostenida incluyen típicamente un polímero; los polímeros adecuados para la presente divulgación que pueden mencionarse incluyen, pero no están limitados a, gelatina, ácido hialurónico/hialuronatos, quitosano y copolímeros tribloque de polioxietileno-polioxipropileno [ver, por ejemplo, Liu et al, Acta Pharmaceutica Sinica B, 2013, 13(2): 86-96, y Swan et al, Adv. Drug Deliv. Rev., 2008, 60(15):1583-1599].

En algunas realizaciones, las presentes composiciones farmacéuticas acuosas pueden administrarse al oído medio como un líquido de menor viscosidad a temperatura ambiente que forma in situ un gel que tiene una viscosidad más alta. Las ventajas de dicha composición incluyen (1) la conveniencia de manejar un líquido en el momento de la administración, y (2) una vez gelificado in situ, un tiempo prolongado de liberación del fármaco en el sitio de depósito. Aumentar el tiempo de liberación da como resultado un tiempo prolongado de eficacia terapéutica y una dosis de fármaco potencialmente disminuida. Tales composiciones comprenden ventajosamente un gel termorreversible que tiene la propiedad de ser un líquido a temperatura ambiente y un gel a aproximadamente la temperatura corporal de un mamífero.

Los geles termorreversibles que son adecuados para la aplicación farmacéutica pueden prepararse usando polímeros incluyendo poli(ácido láctico)-poli(etilenglicol) (PLA-PEG) o copolímeros tribloque de PEG-PLGA-PEG. Una solución de quitosano-glicerolfosfato puede formar un gel termoestable reversible. La adición de fosfatos a base de azúcar transforma el quitosano en un sistema de administración de fármacos en gel termorreversible. Un grupo común de geles termorreversibles son los polímeros a base de polioxialquileo, como los copolímeros tribloque de polioxietileno-polioxipropileno conocidos genéricamente como poloxámeros. Los poloxámeros en soluciones acuosas muestran propiedades termorreversibles que son ventajosas para la presente divulgación. Por tanto, las soluciones acuosas de poloxámero pueden pasar del estado líquido al estado de gel con el aumento de la temperatura. La temperatura de transición líquido-gel puede ajustarse variando la concentración del poloxámero así como mediante la adición de otros excipientes como agentes modificadores de la viscosidad; por tanto, pueden prepararse soluciones de poloxámero que estén en estado líquido a temperatura ambiente o inferior, y que pasen al estado de gel a temperatura corporal. En una realización de la presente composición, el gel termorreversible es el poloxámero 407 (por ejemplo, Pluronic® F127 comercializado por BASF, Florham Park, NJ).

En algunas realizaciones, la presente composición farmacéutica acuosa para administración intratimpánica comprende un agente activo seleccionado entre el Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino, y una solución acuosa farmacéuticamente aceptable que comprende el poloxámero 407. El poloxámero puede estar presente en una concentración de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 25% en peso. En algunas realizaciones, la concentración de poloxámero 407 es de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 18% en peso. En alguna realización, la concentración de poloxámero 407 es de aproximadamente el 16 a aproximadamente el 17% en peso. En algunas realizaciones, el poloxámero está presente en aproximadamente el 15 o el 16 o el 17 o el 18% en peso. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación que comprenden poloxámero 407 pueden incluir opcionalmente hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) que tiene una viscosidad nominal de 40 a 120 cP, y en una cantidad de aproximadamente el 0,5% al 4% en peso.

En algunas realizaciones, la composición de la presente divulgación es una composición farmacéutica acuosa para administración intratimpánica que comprende un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino, y un portador farmacéuticamente aceptable que comprende (a) aproximadamente del 0,5% al 8% en peso de un ácido hialurónico; o (b) (i) aproximadamente del 0,5% al 4% en peso de un ácido hialurónico, y (ii) aproximadamente del 5% al 20% en volumen de polietilenglicol 400 (PEG400).

En las composiciones farmacéuticas acuosas para administración intratimpánica la concentración del agente activo seleccionado entre el Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino es generalmente de aproximadamente el 0,01% p/v al 20% p/v. Este intervalo incluye el subintervalo de aproximadamente el 0,05 p/v a aproximadamente el 15 p/v, de aproximadamente el 0,1 p/v a aproximadamente el 10 p/v, de aproximadamente el 0,1% p/v a aproximadamente el 5% p/v. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 0,5% p/v a aproximadamente el 5% p/v. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 0,5 a aproximadamente el 4% p/v. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 5% p/v. En algunas realizaciones, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 1 a aproximadamente a aproximadamente el 4%. En alguna realización, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 o 5% p/v. En alguna realización, la concentración del agente activo es de aproximadamente el 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1% p/v.

La composición divulgada en la presente puede contener cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable no tóxico convencional. En algunas realizaciones, el pH de la composición está entre aproximadamente 6 a 8, o aproximadamente 6 a 7, o aproximadamente 7 a 8. En algunas realizaciones, la composición puede incluir un

tampón como fosfato monosódico o fosfato disódico o una combinación de los mismos y puede ser solución salina tamponada con fosfato (PBS) o un tampón como el tris(hidroximetil)aminometano (TRIS). La cantidad de tampón puede ser de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 0,5% en peso.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la presente divulgación puede incluir un modificador de la viscosidad como Carbopol® 974P (Lubrizol Advanced Materials, Cleveland, OH). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa para administración intratimpánica comprende un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino, y un portador farmacéuticamente aceptable que comprende poloxámero 407 y un modificador de la viscosidad como Carbopol® 974P. En algunas realizaciones el poloxámero 407 está presente en aproximadamente del 10% al 20% en peso, y el Carbopol® 974P está presente en aproximadamente el 0,1% a aproximadamente el 0,3% en peso. En algunas realizaciones, el agente activo es el Compuesto I cristalino o el Compuesto II cristalino. Otros excipientes comunes pueden incluir conservantes como metilparabeno, así como cloruro de sodio para proporcionar isotonicidad. Las composiciones se formulan de tal manera que proporcionan una liberación sostenida del agente activo durante un período suficiente para efectuar la inhibición de la gamma secretasa. La inhibición sostenida de la gamma secretasa minimiza la frecuencia de administración a una vez a la semana, cada dos semanas, mensual, bimestral, trimestral, semestral, anual, etc. En algunas realizaciones, la frecuencia de dosificación es una vez cada dos semanas, o dos veces al mes, o mensualmente o una vez cada dos meses, o trimestralmente.

La composición farmacéutica acuosa divulgada en la presente que comprende un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino y un portador puede prepararse usando métodos convencionales como se describe en los Ejemplos, y puede envasarse para uso de dosis individuales como en una jeringuilla o para dosis múltiples, como en un vial. Alternativamente, el componente de agente activo y el componente de solución acuosa pueden envasarse por separado, en compartimentos separados o en recipientes separados, y se mezclan antes de la administración.

En la sección de Ejemplos, a continuación, se proporcionan ejemplos ilustrativos de composiciones adecuadas para la administración en el oído interno local de compuestos de la presente divulgación.

Método de tratamiento

En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a métodos para el tratamiento de trastornos óticos que comprenden la administración intratimpánica de una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente activo seleccionado del Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino a un paciente con necesidad de ello a una área en o cerca de la membrana de la ventana redonda en el oído de dicho paciente. El término "trastornos óticos" se refiere generalmente a afecciones resultantes de la pérdida de células pilosas cocleares incluyendo, pero no limitado a, pérdida de audición y sordera, así como afecciones asociadas con disfunción vestibular, que pueden manifestarse a través de síntomas como mareos, desequilibrio, vértigo, náuseas, y visión borrosa. La pérdida de audición o sordera puede deberse a productos químicos ototóxicos, ruido excesivo y envejecimiento.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" o "terapia" o "tratar" y similares incluye controlar, aliviar, revertir o ralentizar la progresión de la afección que se está tratando; por ejemplo, reducción o interrupción de pérdida de audición adicional debido a los factores anteriores u otros; y la restauración de la audición después de una pérdida de audición parcial o profunda debido a los factores anteriores u otros. El tratamiento también incluye la prevención (por ejemplo, retrasar la aparición o reducir el riesgo de desarrollar) de la pérdida de audición, así como el uso profiláctico como antes, durante o después de recibir productos químicos ototóxicos como un antibiótico aminoglucósido como la gentamicina o un agente quimioterapéutico de platino como el cisplatino.

Como se usa en la presente, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad del agente activo suficiente para provocar un efecto deseado o beneficioso en la enfermedad o trastorno que se está tratando; para la profilaxis, se refiere a una cantidad del agente activo suficiente para prevenir la aparición o disminuir el efecto de la enfermedad o trastorno. La cantidad a usar depende del agente activo elegido, la gravedad de la enfermedad o trastorno que se va a tratar, la vía de administración y las características del paciente, como la edad.

En la presente divulgación, el agente activo se administra al oído mediante inyección intratimpánica en el oído medio, el oído interno o la cóclea, o combinaciones de los mismos. Intratimpánico también se conoce como transtimpánico, y ambos términos se usan indistintamente en la presente. La inyección intratimpánica es la técnica de inyectar un agente terapéutico a través de la membrana timpánica en el oído medio donde el agente terapéutico puede difundirse a través de la membrana de la ventana redonda para llegar al oído interno. Se ha usado en la práctica clínica durante muchos años y es una intervención relativamente menor que puede llevarse a cabo en la consulta de un médico. Para inyecciones repetidas, se puede insertar un tubo de ventilación del oído medio en la membrana timpánica, a través del cual el medicamento puede administrarse en el espacio del oído medio detrás de la membrana timpánica en el oído medio y/o interno. En una realización, el agente activo se administra por vía intratimpánica a un área cerca o sobre la membrana de la ventana redonda.

En algunas realizaciones del presente método, el agente activo se administra en una composición farmacéutica acuosa que comprende un gel termorreversible; tales composiciones son líquidas a temperatura ambiente (para facilitar la administración) y se convierten en gel a temperatura corporal de tal manera que la composición farmacéutica no drene rápidamente a través de la trompa de Eustaquio. En algunas realizaciones, el presente método utiliza las composiciones farmacéuticas descritas a continuación en la presente.

Las dosis para la administración interna local del Compuesto I cristalino o el Compuesto II cristalino incluyen de aproximadamente 0,06 mg a aproximadamente 100 mg. Este intervalo incluye el subintervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 90 mg, 0,25 mg a aproximadamente 80 mg, 0,4 mg a 70 mg, 0,6 mg a 60 mg, 0,80 mg a 50 mg, 1,0 mg a 40 mg, 2 mg a 30 mg, 3 mg a 20 mg. Las dosis pueden administrarse en una composición farmacéutica acuosa que comprende una solución acuosa, en la que el volumen de solución acuosa a administrar comprende un intervalo de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 500 μ l en volumen. Este intervalo de volúmenes incluye un subintervalo de aproximadamente 100 μ l a 150 μ l, 100 μ l a 200 μ l, 100 μ l a 250 μ l, 100 μ l a 300 μ l, 100 μ l a 350 μ l, 100 μ l a 400 μ l, 100 μ l a 450 μ l y 100 μ l a 500 μ l. Este intervalo de volúmenes también incluye un subintervalo de aproximadamente 200 μ l a 250 μ l, 200 μ l a 300 μ l, 200 μ l a 350 μ l, 200 μ l a 400 μ l, 200 μ l a 450 μ l y 200 μ l a 500 μ l. Este intervalo de volúmenes también incluye un subintervalo de aproximadamente 300 μ l a 350 μ l, 300 μ l a 400 μ l, 300 μ l a 450 μ l y 300 μ l a 500 μ l. Este intervalo de volúmenes también incluye un subintervalo de aproximadamente 400 μ l a 450 μ l y 400 μ l a 500 μ l. Debido a limitaciones físicas, se contempla que la proporción del agente activo a la composición farmacéutica acuosa sea del 20% en peso o menos.

En un aspecto, los compuestos divulgados en la presente pueden coadministrarse con uno o más agentes adicionales como un esteroide; por ejemplo, dexametasona. En ciertas realizaciones, los agentes adicionales pueden administrarse por separado del Compuesto I cristalino o del Compuesto II cristalino (por ejemplo, secuencialmente, por ejemplo, en diferentes esquemas superpuestos). En otras realizaciones, estos agentes pueden ser parte de una forma de dosificación individual, mezclada junto con el Compuesto I o el Compuesto II en una composición individual. En otra realización más, estos agentes pueden administrarse como una dosis separada que se administra aproximadamente al mismo tiempo que se administra el Compuesto I cristalino o el Compuesto II cristalino. Cuando las composiciones divulgadas en la presente incluyen una combinación de un Compuesto I cristalino o Compuesto II cristalino y uno o más agentes terapéuticos o profilácticos adicionales, tanto el compuesto como el agente adicional pueden estar presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente el 1 y el 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente el 5 y el 95% de la dosificación administrada en un régimen de monoterapia.

FUNCION BIOLOGICA

La utilidad de la presente divulgación puede demostrarse mediante uno o más de los métodos siguientes u otros métodos conocidos en la técnica:

A. Ensayo de diferenciación de otosfera

Para determinar la actividad del compuesto en la inducción de la diferenciación de las células pilosas de ratón, se generaron otosferas a partir del órgano de ratón de Corti como se describe en Oshima et al., Auditory and Vestibular Res Methods, 2009. Brevemente, se aislaron los epitelios sensoriales del órgano neonatal de Corti, se trataron con tripsina y se disociaron suavemente. Las células disociadas se transfirieron luego a un pocillo de baja adhesión en medio DMEM/F12 que contenía suplementos de 1x B27 y N2 (Invitrogen Life Sciences, Carlsbad, CA), EGF, IGF-1 y bFGF para la formación de esferas. Después de 3 días de formación de esferas, las esferas se aislaron por centrifugación y se transfirieron a placas recubiertas de fibronectina y se dejaron adherir durante la noche en medios que carecían de factores de crecimiento. Las esferas adherentes se trataron luego con el compuesto de prueba a concentraciones que variaban de 10^{-5} a 10^{-10} M para 4d. Luego se recogió el ARN con un kit RNeasy (Qiagen®, Hilden, Alemania) y se analizaron usando PCR cuantitativa realizada usando cebadores específicos de genes contra Atoh1 y MYO7a usando Rpl19 como un gen constitutivo. Los valores se analizaron posteriormente usando el Método $\Delta\Delta$ Ct. Los expertos en la materia entenderán que el método $\Delta\Delta$ Ct se usa comúnmente en la técnica de la PCR.

B. Ensayo de explante de órgano de ratón de Corti

(a) *Inhibición de Notch*. Se usaron explantes de ratón neonatal para determinar la inhibición de la vía de Notch y para evaluar la capacidad del compuesto para generar células pilosas en un sistema ex vivo. Brevemente, se diseccionaron órganos de Corti de ratones posnatales de día 3 y se colocaron en placas en cámaras de 4 pocillos recubiertas con poli-L-lisina y fibronectina. Los explantes se colocaron en placas directamente en medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10%, suplemento B27 con y sin compuesto de prueba. Para verificar la inhibición de Notch, se extrajo ARN 24 h después de la adición del compuesto usando un kit RNeasy, y se realizó una PCR cuantitativa usando cebadores de genes específicos contra

Hes5. Se usó Rpl19 como un gen constitutivo y los valores se analizaron usando el método $\Delta\Delta Ct$.

(B) *Inducción de células pilosas*. Para los estudios de inducción de células pilosas, se generaron explantes y se trataron con el compuesto como anteriormente; sin embargo, los explantes se trataron durante 3-5 días con medios que se reponían diariamente en presencia o ausencia de compuesto. Luego se fijaron los explantes con paraformaldehído y se inmunotifieron con anticuerpos contra MY07A, SOX2 y se contratiñeron con Alexa647-faloidina y Hoechst. Las imágenes se tomaron en un sistema confocal Nikon N2 usando el software NIS-Elements (Nikon, Melville, NY, USA). Luego se cuantificaron las células pilosas positivas para MY07A/faloidina y se compararon con los grupos tratados con vehículo.

C. Ensayo de células madre neurales humanas

Las células madre neurales (NSC) se derivaron de células madre embrionarias usando un protocolo publicado (Yuan et al., 2 de marzo de 2011, PLoS ONE, 6(3):e17540). Las células se clasificaron y caracterizaron en el pase 3 y se expandieron. Luego, las células se congelaron en el pase 5. Las células se mantuvieron en medio NSC (DMEM/F12, N2 (1x), B27 (1x) (Invitrogen) y Pen/Strep (1x) (Life Technologies) con 20 ng/ml de bFGF (BD Bioscience/Corning)). En el día 1, las células se colocaron en placas de 96 pocillos que se habían recubierto previamente con poliornitina y laminina, 60.000 células/pocillo en 100 μ l de medio. En el día 2, se retiró el medio gastado y se añadieron 180 μ l de medio nuevo a las células. Más tarde ese mismo día (día 2), las células se trataron con 20 μ l de medio NSC que contenía compuestos de prueba (CRC de 7 puntos). En el día 3, se retiró el medio gastado y se añadieron a las células 140 μ l de RLT/bME. El ARN se extrajo usando el QiaCube (Qiagen® Germantown, MD, USA) usando el protocolo de extracción total de ARN + ADNsa. Luego, el ARN se transcribió inversamente a ADNc usando iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Luego se usó el ADNc para análisis de PCR en tiempo real usando iTaQ Sybergreen (BioRad). La expresión de los genes Atoh1, Hes5, Hes1, Miosina7a se evaluó usando CFX96 o CFX384 (Bio-Rad). El HPRT1 se usó como gen de referencia. El análisis se realizó usando Microsoft® Excel® y CBIS (ChemInnovation Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Se siguió el procedimiento anterior para determinar una EC_{50} para cada compuesto.

Compuesto	hNSC Atoh1 EC_{50} (μ M)	hNSC HES1 IC_{50} (μ M)	hNSC HES5 IC_{50} (μ M)
I	0.625	0.242	0.288
II	0.023		0.023

D. Diferenciación de células madre embrionarias humanas a células similares a células pilosas

Este protocolo se diseñó para diferenciar células madre embrionarias humanas (hESC) en células progenitoras óticas y diferenciar aún más las células progenitoras en células similares a las células pilosas. Las hESC se mantuvieron en fibroblastos embrionarios de ratón tratados con mitomicina C (MEF) en medio DMEM/F12 knockout suplementado con suero knockout al 20%, 1x aminoácidos no esenciales, 1x 1-glutamina, 1x β -mercaptoetanol (bME) y 8-10 ng/ml de bFGF humano. Las hESC se pasaron usando colagenasa sobre MEF nuevos hasta que estuvieron listas para comenzar la diferenciación, en cuyo caso se pasaron a placas recubiertas con matrigel en medio acondicionado con MEF suplementado con 8 ng/ml de bFGF durante 3-5 días.

Se diferenciaron células ES humanas usando un protocolo publicado (Ronaghi M et al., Stem Cells Dev. 2014, 1275-84). Con la excepción de que se usaron placas AggreWells (de Stem Cell Technology, Vancouver, CA) para generar cuerpos embrioides (EB) en los primeros 6 días del protocolo. El tratamiento con Atoh1 potencial o inductores de células pilosas se administró a las células en el día 34-39. En el día 39, las células se lisaron para proteínas, se fijaron para obtener imágenes o se extrajeron para ARN como se describe a continuación.

(A) *Análisis de transferencia Western de Miosina7a*: la proteína se extrajo simultáneamente de dos pocillos experimentalmente similares usando tampón RIPA. La concentración de proteína se determinó usando un protocolo establecido, y se realizó una transferencia Western con las muestras de proteínas diferenciadas, una muestra de las hESC del mismo pase, un marcador y una muestra de células de control positivo que expresa Miosina7a (células Y79). La membrana se incubó con el anticuerpo Miosina7a así como con un anticuerpo α -actina como control de carga. Una vez que se obtuvieron las imágenes de la transferencia, se usó el sistema Licor para cuantificar las bandas Miosina7a y α -actina para el análisis comparativo.

(B) *Inmunocitoquímica*: los pocillos se enjuagaron brevemente con DPBS y luego se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4%, seguido de una incubación de 10 minutos con glicina 100 mM en DPBS. Los pocillos se lavaron 3 veces con DPBS, se permeabilizaron durante 10 minutos con TritonX-100 al 0,2% y luego se bloquearon durante una hora con tampón que contenía BSA al 0,1% y TritonX-100 al 0,2%. Se añadieron anticuerpos primarios para Miosina7a y Sox2 y se mantuvieron durante la noche a 4° C. Al día siguiente, los pocillos se lavaron 3 veces con DPBS y se añadieron anticuerpos secundarios y se incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas. Los pocillos se lavaron 2 veces y las células se tñieron con 488-Faloidina durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron

2 veces con DPBS y se añadió tinción Hoechst a los pocillos y se incubaron durante 10 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron 3 veces finales y se obtuvieron imágenes usando el sistema de obtención de imágenes automatizado InCell 2200 de GE Healthcare Life Sciences (Pittsburgh, PA, USA).

(c) *PCR*: se extrajo y aisló ARN usando el kit de aislamiento de ARN de Qiagen® (incluyendo el tratamiento con DNasa). La concentración de ARN se determinó usando Nano-Drop. El ADNc se elaboró usando iScript (Bio-Rad) en CFX96 (BioRad). La cantidad de genes objetivo como Miosina7a, Atoh1, Hes5, Axin2 y GAPDH, se determinó usando el kit de PCR iTaq (Bio-Rad) en una PCR en tiempo real CFX-96 o CFX-384 (BioRad). Todos los cebadores fueron de OriGene (Rockville, MD) o Integrated DNA Technologies (IDT, Coralville, IA).

E. PK de cobaya

Se anestesiaron cobayas Hartley macho (300-350 g) con ketamina y xilazina. Se administraron treinta microlitros de una composición farmacéutica acuosa de las presentes realizaciones transtimpánicamente para depositar el fármaco en la membrana de la ventana redonda. La administración fue unilateral. Los animales se colocaron en una cámara templada en una posición reclinada lateral manteniendo la oreja dosificada hacia arriba hasta que se recuperaron de la anestesia.

En varios puntos temporales después de la administración, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Se recogieron la sangre y el LCR y se almacenaron a -80° C. Se decapitaron los animales, se extrajeron los huesos temporales y se abrió la ampolla para exponer la cápsula ótica. Se recogieron perilinfas ipsilaterales y contralaterales del ápice usando un tubo microcapilar. La cóclea ipsilateral se retiró de la cápsula ótica y se almacenó a -80° C. Todos los tejidos recogidos se analizaron usando LC/MS/MS para la concentración del compuesto de prueba como sigue. Se prepararon estándares analíticos aumentando concentraciones conocidas de las soluciones madre del compuesto de prueba en matrices como plasma o CSF artificial. Se precipitaron cantidades fijas de tejidos recogidos y estándares aumentados con acetonitrilo que contenía buspirona como estándar interno. Las muestras precipitadas se centrifugaron a 4000 g durante 10 minutos a 4° C. Los sobrenadantes se analizaron usando LC-MS/MS. El sistema LC-MS/MS se ajustó usando el AB Sciex 4000 Qtrap (AB Sciex, Framingham, MA) equipado con HPLC serie Agilent 1200 y muestreador automático CTC PAL (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

F. Farmacodinámica funcional

(A) *Administración quirúrgica del compuesto de prueba a la membrana de la ventana redonda*. La cirugía se realizó en ratones sin tratamiento o ratones con oídos dañados por ruido o farmacológicamente. Los animales se anestesiaron con isoflurano y se realizó una incisión retroauricular de 8 mm en el borde caudal inferior del pabellón de la oreja. Se retrajo la piel y se diseccionó con herramienta roma el tejido graso lejos de donde se unen el nervio facial y el músculo. El músculo se retrajo para revelar una área en la ampolla timpánica donde el hueso era delgado. Se usó una aguja de 30 g para perforar un orificio en la parte delgada expuesta de la ampolla ótica. Se insertó una jeringuilla Hamilton equipada con una aguja roma de 32 g en la abertura de la ampolla ótica. La formulación del fármaco se administró mediante inyección y se retiró la aguja. El cierre de la herida se realizó con pegamento de tejido.

(B) *PD funcional*. En varios puntos temporales después de la administración del fármaco, típicamente 24 horas, se sacrificaron los ratones fueron por exposición a CO₂ y se retiró el hueso temporal a RNAlater® enfriado con hielo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La cápsula ótica se disecó cuidadosamente del hueso temporal, se colocó en un tubo limpio que contenía TriZol (Zymo Research, Irvine, CA, USA), se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C hasta el aislamiento del ARN. El ARN se aisló usando un kit Qiagen® RNA MiniElute de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó ADNc y se realizó PCR en cebadores específicos usando BioRad iTaq.

G. inducción de células pilosas

En ratones, la presente formulación de fármaco se administró quirúrgicamente a la ventana redonda como se describe en la Sección F, anterior. En cobayas, la presente formulación de fármaco se administró mediante inyección transtimpánica al nicho de ventana redonda como se describe en la Sección E, anterior. Siete a 14 días después de la administración del fármaco, los animales se sacrificaron con ketamina y xilacina, se perfundió todo su cuerpo con formalina tamponada neutra al 10% y se extrajeron los huesos temporales y se almacenaron en formalina. Para las cobayas, cuando se iban a preparar los montajes completos de la cóclea, se realizó una perfusión intraescolar para bañar completamente la cóclea en formalina. Se prepararon secciones midmodiolares o montajes completos de cóclea y se tiñeron para identificar las células pilosas.

H. Respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR)

Se anestesiaron con ketamina/xilazina/acepromacina ratones sin tratamiento o ratones en varios momentos después de ensordecimiento por ruido o farmacológico y se determinó la respuesta auditiva del tronco encefálico en ambos oídos usando un aparato RZ6 de Tucker Davis (Alachua, FL). Los ratones se expusieron a clics o tonos puros

de 4, 8, 16, 24 y 32 kHz a 90-10 dB en pasos descendentes de 10 dB y se determinó el umbral de audición.

Los resultados del experimento anterior realizado usando las formulaciones de los Ejemplos 3(c) y 3(d) se proporcionan en la Tabla siguiente:

	Mejora del umbral de ABR (dB)		
	16 kHz	24 kHz	32 kHz
Compuesto I	7	10	8
Compuesto II	8	11	7

Se anestesiaron cobayas, sin tratamiento o después de un ensordecimiento farmacológico, con ketamina/xilazina. La respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR) se determinó bilateralmente usando un aparato RZ6 de Tucker Davis. Los cobayas se expusieron a clics o tonos puros de 4, 8, 16 o 24 kHz a 90-10 dB en pasos descendentes de 10 dB y se determinó el umbral de audición.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación del Compuesto 1 cristalino

El compuesto I se divulga en Flohr et al. Patente de Estados Unidos N° 7.166.587, concedida el 23 de enero de 2007, y el procedimiento sintético divulgado en la misma, cuando se sigue, produce el Compuesto I como un material amorfo. El Compuesto I amorfo (2 g) se suspendió en MeOH (60 ml) y la suspensión se calentó a 65 grados C para producir una solución transparente. La solución se dejó enfriar y permanecer a temperatura ambiente durante 18 horas. Durante ese tiempo se produjo la cristalización. La reacción se filtró y el sólido se recogió y se secó al vacío para producir un sólido blanco (1 g) que se determinó que era cristalino, y se caracteriza por los picos de difracción de rayos X en polvo en la Tabla 1 y el patrón que se muestra en la Figura 1. El inicio endotérmico de DSC se produce a 238.5° C como se muestra en la Fig. 2.

TABLA 1-localizaciones de picos de XRPD para Compuesto I cristalino

Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa	Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa
1	3.0	266	11.4	24	27.1	112	4.8
2	4.6	1173	50.3	25	27.7	680	29.2
3	8.2	2332	100.0	26	28.1	147	6.3
4	9.2	1038	44.5	27	28.3	127	5.4
5	10.4	410	17.6	28	28.6	202	8.7
6	13.8	1400	60.0	29	29.0	86	3.7
7	14.0	1342	57.5	30	30.0	87	3.7
8	16.4	859	36.8	31	31.2	459	19.7
9	18.2	1281	54.9	32	31.5	139	6.0
10	18.4	1352	58.0	33	31.8	371	15.9
11	18.8	192	8.2	34	32.1	279	12.0
12	19.1	185	7.9	35	32.4	121	5.2
13	20.9	1427	61.2	36	35.1	137	5.9
14	21.5	152	6.5	37	35.6	146	6.3

(continuación)

Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa	Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa
15	22.2	193	8.3	38	35.8	172	7.4
16	22.7	335	14.4	39	36.4	137	5.9
17	23.0	548	23.5	40	36.7	166	7.1
18	23.8	840	36.0	41	38.4	98	4.2
19	24.3	296	12.7	42	38.8	136	5.8
20	24.7	144	6.2	43	39.8	362	15.5
21	25.2	145	6.2	44	40.5	133	5.7
22	26.5	143	6.1	45	40.8	353	15.1
23	26.6	151	6.5				

Ejemplo 2. Preparación del Compuesto II cristalino

El Compuesto II se divulga en Flohr et al. Patente de Estados Unidos N° 7.160.875, concedida el 9 de enero de 2007, y el procedimiento sintético divulgado en la misma, cuando se sigue, produce el Compuesto II como un material amorfo. El Compuesto II amorfo (432 mg) se pesó en un vial de 20 ml y se disolvió en EtOH (2,15 ml, 5 volúmenes). La solución transparente resultante se verificó después de 30 minutos y se observó que se había formado un polvo blanco. Esta suspensión se agitó durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente y el sólido se aisló por filtración y se secó durante 16 horas a 40° C/3 mbar para dar un sólido blanco en polvo (315 mg, 73% de rendimiento) que se determinó que era cristalino, y se caracteriza por los picos de XRPD en la Tabla 2 y el patrón mostrado en la Fig. 3. El inicio de la endotermia DSC comienza a 173° C (fundido) como se muestra en la Fig. 4.

TABLA 2-Localizaciones de picos de XRPD para Compuesto II cristalino

Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa	Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa
1	6.5	711	33.7	26	25.8	84	4.0
2	8.4	737	35.0	27	26.1	155	7.4
3	10.1	85	4.0	28	26.7	141	6.7
4	13.1	277	13.1	29	26.8	158	7.5
5	14.6	101	4.8	30	27.5	231	11.0
6	15.0	353	16.7	31	27.8	79	3.7
7	15.2	2108	100.0	32	29.6	171	8.1
8	16.0	912	43.3	33	30.6	498	23.6
9	17.6	170	8.1	34	31.2	119	5.6
10	18.0	129	6.1	35	32.3	79	3.7
11	18.4	286	13.6	36	32.9	100	4.7
12	19.6	168	8.0	37	33.2	191	9.1
13	19.9	592	28.1	38	33.9	219	10.4
14	20.1	202	9.6	39	34.4	77	3.7
15	20.6	1146	54.4	40	35.4	293	13.9
16	20.9	179	8.5	41	36.3	193	9.2
17	21.2	126	6.0	42	36.7	178	8.4
18	22.2	245	11.6	43	37.3	234	11.1

(continuación)

Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa	Pico	Angulo (°2θ)	Intensidad (recuentos)	Intensidad Relativa
19	22.6	987	46.8	44	37.7	103	4.9
20	23.3	342	16.2	45	38.0	122	5.8
21	23.5	162	7.7	46	38.9	96	4.6
22	23.8	253	12.0	47	40.0	114	5.4
23	24.5	476	22.6	48	40.2	100	4.7
24	24.9	210	10.0	49	40.8	210	10.0
25	25.1	540	25.6	50	41.6	139	6.6

Ejemplos 3(a) y 3(b) Preparación de la formulación A-1

Ejemplo 3(a) - A 128 ml de agua filtrada estéril se le añadieron 0,9 g de cloruro de sodio, 0,59 g de fosfato de sodio dibásico y 0,17 g de fosfato de sodio monobásico. La solución se agitó a temperatura ambiente y se añadieron 27,2 g de poloxámero 407 y se agitó durante la noche para producir una solución transparente. Se añadieron 2 ml de la solución descrita anteriormente a 40 mg del Compuesto I cristalino y la suspensión se agitó en un baño de hielo durante 20 minutos para producir una suspensión homogénea.

Ejemplo 3(b) – Se preparó una suspensión homogénea que contenía el 2% p/v del Compuesto II cristalino de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Ejemplos 3(c) y (d) de la formulación A-2

Ejemplo 3(c) - A 129 ml de agua estéril se le añadieron 0,96 g de cloruro de sodio, 0,59 g de fosfato de sodio dibásico y 0,14 g de fosfato de sodio monobásico. La solución se agitó a temperatura ambiente y se añadieron 25,6 g de poloxámero 407 y se agitó durante la noche para producir una solución transparente. La solución se filtró estéril y se añadió 1 ml de la solución descrita anteriormente a 20 mg de Compuesto I cristalino y la suspensión se agitó en vórtice durante 60 minutos para producir una suspensión homogénea.

Ejemplo 3(d) - Se preparó una suspensión homogénea que contenía el 2% p/v del Compuesto II cristalino de la misma manera que se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4. Preparación de la formulación B

A 3 ml de tampón TRIS 0.1 M pH7 filtrado estéril se añadieron 0.6 g de poloxámero 407 y se agitó durante la noche a 4° C para formar una solución transparente homogénea. A esta solución se le añadieron 60 mg de Compuesto I cristalino y 3 mg de metilparabeno. La suspensión resultante se agitó a 4° C durante 16 horas y se almacenó a 4° C hasta la dosificación.

Ejemplos 5(a), 5(b), 5(c) y 5(d). Preparación de la formulación C

Ejemplo 5(a) - A 10 ml de tampón TRIS 0.1 M pH 7 filtrado estéril se añadieron 1.8 g de poloxámero 407 y se agitó durante la noche a 4°C para formar una solución transparente homogénea. A 3 ml de esta solución se le añadieron 60 mg del Compuesto I cristalino, y la suspensión se agitó durante la noche a 4°C para formar una suspensión distribuida homogéneamente. Finalmente, se añadieron 90 mg de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) (40-60 cp) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 3 mg de metilparabeno y la suspensión se agitó a 4° C durante 16 horas y se almacenó a 4°C.° C hasta la dosificación.

Ejemplo 5(b) – Se preparó una suspensión homogénea que contenía un 2% de Compuesto I amorfo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Ejemplo 5(c) – Se preparó una suspensión homogénea que contenía un 2% de Compuesto II cristalino siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Ejemplo 5(d) – Se preparó una suspensión homogénea que contenía un 2% de Compuesto II amorfo siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Ejemplo 6. Preparación de la formulación D

A 3 ml de tampón TRIS 0.1 M pH 7 filtrado estéril se le añadieron 0,54 g de poloxámero 407 y esto se agitó durante la noche a 4° C para formar una solución transparente homogénea. A esta solución se le añadieron luego 60 mg de Compuesto I cristalino y la suspensión se agitó durante la noche a 4° C para formar una suspensión distribuida homogéneamente. Finalmente, se añadieron 90 mg de HPMC (40-60 cp), 3 mg de metilparabeno y 6 mg de Carbopol® 974P (Lubrizol Advanced Materials, Cleveland, OH) y la suspensión se agitó a 4° C durante 16 h y se almacenó a 4° C hasta la dosificación.

Ejemplo 7. Preparación de la formulación E

A 3 ml de tampón TRIS 0.1 M pH 7 filtrado estéril se le añadieron 0,54 g de poloxámero 407 y esto se agitó durante la noche a 4° C para formar una solución transparente homogénea. A esta solución se le añadieron luego 60 mg de Compuesto I cristalino y la suspensión se agitó durante la noche a 4° C para formar una suspensión distribuida homogéneamente y se almacenó a 4° C hasta la dosificación.

Ejemplo 8. Preparación de la formulación F

A 10 ml de solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril se le añadieron 100 mg de ácido hialurónico y esto se agitó a temperatura ambiente durante la noche para formar una solución transparente homogénea. A 60 mg de Compuesto I cristalino se añadieron 0,6 ml de PEG400 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La suspensión se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de la solución de ácido hialurónico descrita anteriormente a la suspensión del Compuesto I y PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente para formar una suspensión distribuida homogéneamente.

Ejemplo 9. Preparación de la formulación G

A 10 ml de solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril se le añadieron 200 mg de ácido hialurónico y se agitó a temperatura ambiente durante la noche para formar una solución transparente homogénea. A 60 mg de Compuesto I cristalino se añadieron 0,15 ml de PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de la solución de ácido hialurónico descrita anteriormente a la suspensión del Compuesto I y PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente para formar una suspensión distribuida homogéneamente.

Ejemplos 10(a) y 10(b). Preparación de la formulación H

Ejemplo 10(a) - A 10 ml de solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril se añadieron 150 mg de ácido hialurónico y se agitó a temperatura ambiente durante la noche para formar una solución transparente homogénea. A 60 mg del Compuesto I cristalino se añadieron 0,3 ml de PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de la solución de ácido hialurónico descrita anteriormente a la suspensión del Compuesto I y PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente para formar una suspensión distribuida homogéneamente.

Ejemplo 10 (b) - Una suspensión homogénea que contenía 2% Compuesto II cristalino se preparó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

Ejemplo 11. Preparación de la formulación I

A 5 ml de solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril se añadieron 50 mg de Oligopéptido (Péptido de hidrogel Corning® PuraMatrix™, Corning, NY) y esto se agitó a la temperatura ambiente durante 2 horas para formar una solución transparente homogénea. A 60 mg de Compuesto I cristalino se añadieron 0,3 ml de PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de la solución de oligopéptido descrita anteriormente a la suspensión de Compuesto I y PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente para formar una suspensión distribuida homogéneamente.

Ejemplo 12. Preparación de la formulación J

A 5 ml de solución salina tamponada con fosfato filtrada estéril se le añadieron 500 mg de HPMC (40-60 cp) y esto se agitó a temperatura ambiente durante la noche para formar una solución transparente homogénea. A 60 mg de Compuesto I cristalino se añadieron 0,3 ml de PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 3 ml de la solución HPMC descrita anteriormente a la suspensión del Compuesto I y PEG400. La suspensión se agitó a temperatura ambiente para formar una suspensión distribuida homogéneamente.

Ejemplo 13. PK de cobayas

Las composiciones líquidas descritas en la presente se evaluaron usando el método descrito en la Parte E de la sección Función biológica proporcionada anteriormente. Las composiciones líquidas preparadas como se describe en el Ejemplo 5(a)-5(d) se extrajeron cada una en una jeringuilla de 1 ml. Usando la jeringuilla de 1 ml llena, la composición líquida se volvió a llenar a 5°C en una jeringuilla Hamilton de 100 µl adaptada con aguja de calibre 28. La jeringuilla Hamilton se dejó calentar a temperatura ambiente.

Se anestesiaron cobayas Hartley macho (300-350 g) con ketamina y xilazina. Se administraron treinta microlitros de la composición líquida anterior transtimpánicamente para depositar el fármaco en la membrana de la ventana redonda. La administración fue unilateral. Los animales se colocaron en una cámara templada en una posición reclinada lateral manteniendo la oreja dosificada hacia arriba hasta que se recuperaron de la anestesia.

En varios puntos temporales después de la administración, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Se recogieron la sangre y el líquido cefalorraquídeo y se almacenaron a -80° C. Se decapitaron los animales, se extrajeron los huesos temporales y se abrió la ampolla para exponer la cápsula ótica. Se recogieron perilinfas ipsilaterales y contralaterales del ápice usando un tubo microcapilar. La cóclea ipsilateral se retiró de la cápsula ótica y se almacenó a -80° C. Todos los tejidos recogidos se analizaron usando LC/MS/MS como se describe en la Parte E de la sección Función Biológica anterior.

Se midieron las concentraciones de Compuesto I y Compuesto II usando LC/MS/MS tanto en el fluido de la perilinfa como en el tejido de la cóclea después de una inyección transtimpánica de una formulación presente de la forma cristalina o la forma amorfa en varios puntos temporales. Cuando se dosificó como la forma amorfa, la concentración del Compuesto I en la perilinfa y la cóclea fue superior a la EC₅₀ de NSC humana para Atoh1 al de 1 día y 7 días. La concentración del Compuesto 1 cuando se dosificó como la forma cristalina estuvo por encima de la EC₅₀ de NSC desde el día 1 hasta el día 28. Cuando se dosificó como la forma amorfa, la concentración del Compuesto II en la perilinfa y la cóclea fue superior a la EC₅₀ de NSC humana para Atoh1 al de 1 día y 7 días. La concentración del Compuesto II cuando se dosificó como forma cristalina estaba por encima de la EC₅₀ de NSC humana para Atoh1 desde el día 1 hasta el día 42. La concentración de los presentes compuestos en la perilinfa y/o el tejido de la cóclea estaba por encima de la EC₅₀ de NSC humana. para Atoh1, un indicador de que los presentes compuestos pueden ser eficaces en la regeneración de las células pilosas y la restauración de la audición en humanos. Sorprendentemente, los resultados de pK muestran que las formulaciones que contienen el Compuesto I cristalino y el Compuesto II cristalino proporcionan una exposición más prolongada del Compuesto I y el Compuesto II al oído interno que las formulaciones que contienen las formas amorfas respectivas. La Tabla 3 siguiente enumera los resultados para los estudios que usan formulaciones acuosas del Compuesto I cristalino, mientras que la Tabla 4 siguiente enumera los de las formulaciones acuosas del Compuesto II cristalino. Los resultados para las formulaciones acuosas del Compuesto I cristalino también se muestran gráficamente en la Fig. 5A y la Fig. 5B, mientras que los resultados para las formulaciones acuosas del Compuesto II cristalino se muestran gráficamente en la Fig. 6A y la Fig. 6B.

TABLA 3

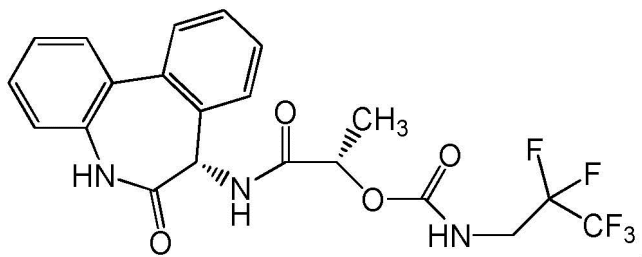
Día	Cristalina		Amorfa	
	Perilinfia	Cóclea	Perilinfia	Cóclea
	Media (µM) (n = 6)	Media (µM)	Media (µM) (n = 3)	Media (µM) (n = 3)
1	394.7	69.0 (n = 3)	33.3	211.2
3	568.5	25.6 (n = 3)		
7	18.9	4.1 (n = 6)	14.0	28.4
14	116.0	9.0 (n = 6)	0.0	0.04
21	18.2	6.2 (n = 6)		
28	10.4	12.8 (n = 6)		
LLOQ=0.08 µM				

TABLA 4

	Cristalina		Amorfa	
	Perilinfia	Cóclea	Perilinfia	Cóclea
Day	Media (µM) (n = 3)	Media (µM) (n=3)	Media (µM) (n = 3)	Media (µM) (n = 3)
1	501.6	5282.0	159.4	829.2
7	26.0	46.1	178.4	18.1
14	26.0	221.7	0.0	0.0
28	2.2	7.6	0.0	0.0
42	0.3	0.6		
56	0.0	0.0		
LLOQ=0.08 µM				

REIVINDICACIONES

1. El Compuesto I cristalino que tiene la fórmula:



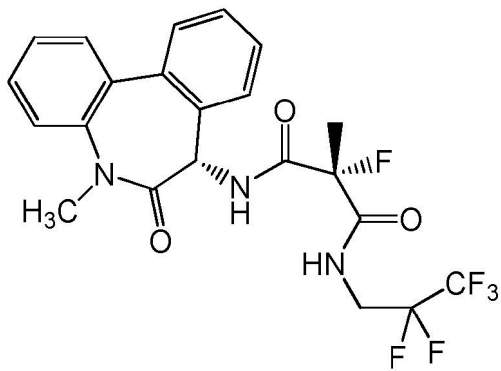
Compuesto I

caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 8,2, 13,8, 14,0, 18,4 y 20,9 $\pm$ 0,5 grados dos-theta.

2. El Compuesto I cristalino, de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 4,6, 8,2, 9,2, 13,8, 14,0, 18,2, 18,4, 20,9, 23,8 y 27,7 $\pm$ 0,15 grados dos-theta; o **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 3,0, 4,6, 8,2, 9,2, 10,4, 13,8, 14,0, 16,4, 18,2, 18,4, 18,8, 19,1, 20,9, 21,5, 22,2, 22,7, 23,0, 23,8, 24,3, 24,7, 25,2, 26,5, 26,6, 27,1, 27,7, 28,1, 28,3, 28,6, 29,0, 30,0, 31,2, 31,5, 31,8, 32,1, 32,4, 35,1, 35,6, 35,8, 36,4, 36,7, 38,4, 38,8, 39,8, 40,5, y 40,8 $\pm$ 0,15 grados dos-theta.

3. El Compuesto I cristalino, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado además por tener un inicio endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a 238,5° C.

4. El Compuesto II cristalino que tiene la fórmula:



Compuesto II

caracterizado por un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 8,4, 15,2, 16,0, 20,6 y 22,6 $\pm$ 0,15 grados dos-theta.

5. El Compuesto II cristalino, de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 6,5, 8,4, 15,2, 16,0, 19,9, 20,6, 22,6, 24,5, 25,1 y 30,6 $\pm$ 0,15 grados dos-theta; o **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X en polvo con picos a 6,5, 8,4, 10,1, 13,1, 14,6, 15,0, 15,2, 16,0, 17,6, 18,0, 18,4, 19,6, 19,9, 20,1, 20,6, 20,9, 21,2, 22,2, 22,6, 23,3, 23,5, 23,8, 24,5, 24,9, 25,1, 25,8, 26,1, 26,7, 26,8, 27,5, 27,8, 29,6, 30,6, 31,2, 32,3, 32,9, 33,2, 33,9, 34,4, 35,4, 36,3, 36,7, 37,3, 37,7, 38,0, 38,9, 40,0, 40,2, 40,8, y 41,6 $\pm$ 0,15 grados dos-theta.

6. El Compuesto II cristalino, de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado además por tener un inicio endotérmico de calorimetría diferencial de barrido a 173° C.

7. Una composición farmacéutica acuosa para administración intratimpánica que comprende:

(A) del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407; o

(B)

- (i) del 15% al 25% en peso (p/p) de poloxámero 407 y
- (ii) del 0,5% al 4% en peso (p/p) de hidroxipropilmetilcelulosa que tiene una viscosidad nominal de 40-60 cP o grado 80-120 cP; o

(C)

- (i) el 10%-20% en peso (p/p) de poloxámero 407, y
- (ii) el 0,1%-0,3% en peso (p/p) de Carbopol® 974P; o

(D)

- (i) del 0,5% al 8% en peso (p/p) de un ácido hialurónico; o

(E)

- (i) del 0,5% al 4% en peso (p/p) de un ácido hialurónico, y
- (ii) del 5% al 20% en volumen de polietilenglicol 400;

en donde dicho agente activo está presente en del 0,01% al 20% p/v de dicha solución acuosa.

8. La composición farmacéutica acuosa de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además un agente tampón, en donde dicho agente tampón es fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico o una combinación de los mismos.

9. La composición farmacéutica acuosa de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en la que dicho agente activo está presente en del 0,1% al 5% p/v.

10. La composición farmacéutica acuosa de acuerdo con la reivindicación 7 a 9, en donde dicha solución acuosa comprende del 15% al 18% en peso de poloxámero 407.

11. Un compuesto cristalino de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en el tratamiento de trastornos óticos.

12. Una composición farmacéutica acuosa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, para su uso en el tratamiento de un trastorno ótico.

13. Un compuesto para el uso de la reivindicación 11, o composición para el uso de la reivindicación 12, en donde dicho trastorno ótico es pérdida de audición.

14. Una composición farmacéutica acuosa que comprende (1) un agente activo seleccionado de un compuesto cristalino de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; y (2) una solución acuosa que comprende del 15% al 18% en peso (p/p) de poloxámero 407, en donde el pH está entre 7,0 y 8,0 y en donde dicho agente activo está presente en del 0,1% al 5% p/v, para su uso en el tratamiento de la pérdida de audición.

15. Una composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 14 en la que dicho agente activo es Compuesto I cristalino de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o un Compuesto II cristalino de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6.

Difractograma de XRPD de Compuesto I Cristalino

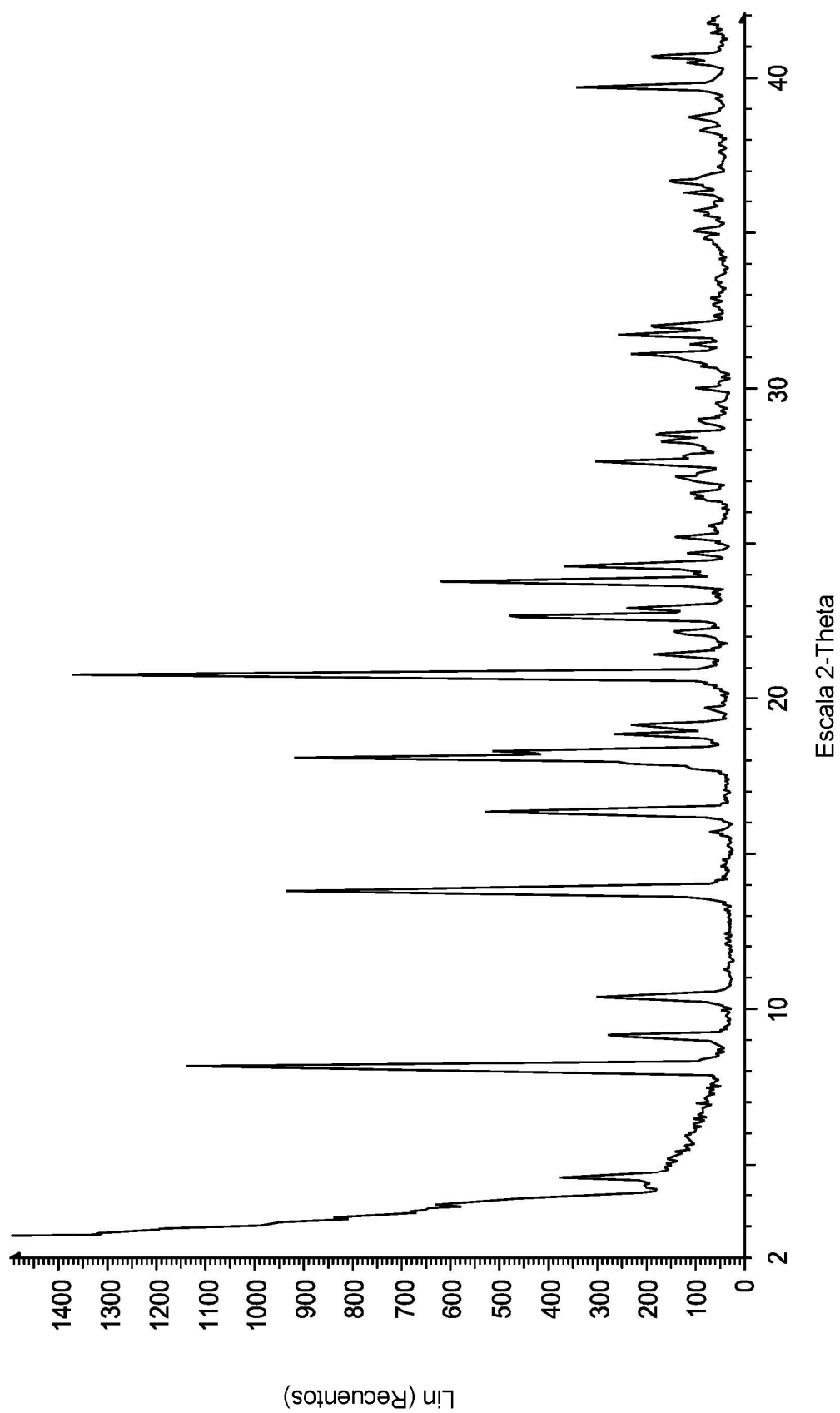


FIG. 1

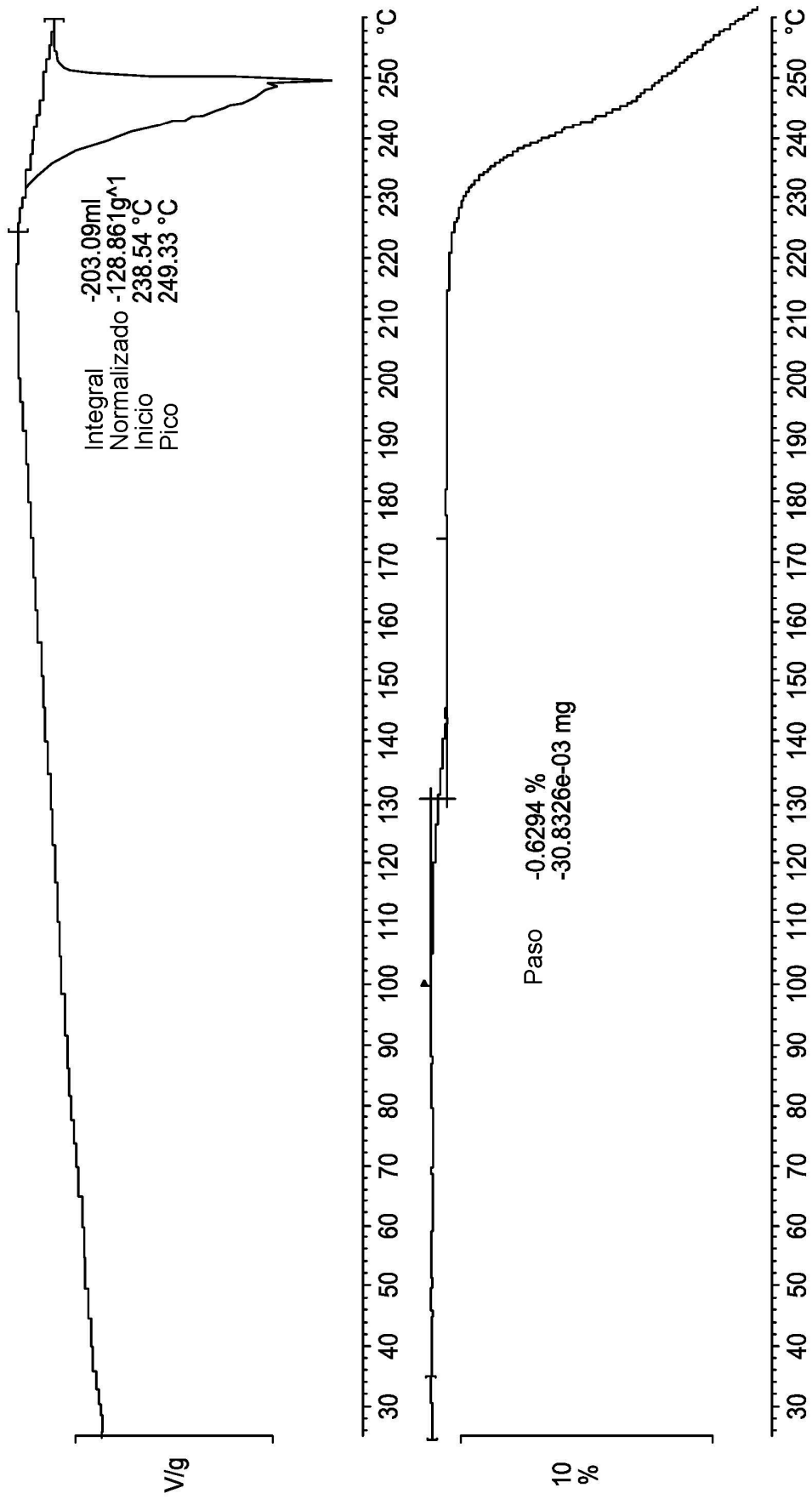


FIG. 2

Difractograma de XRPD de Compuesto II Cristalino

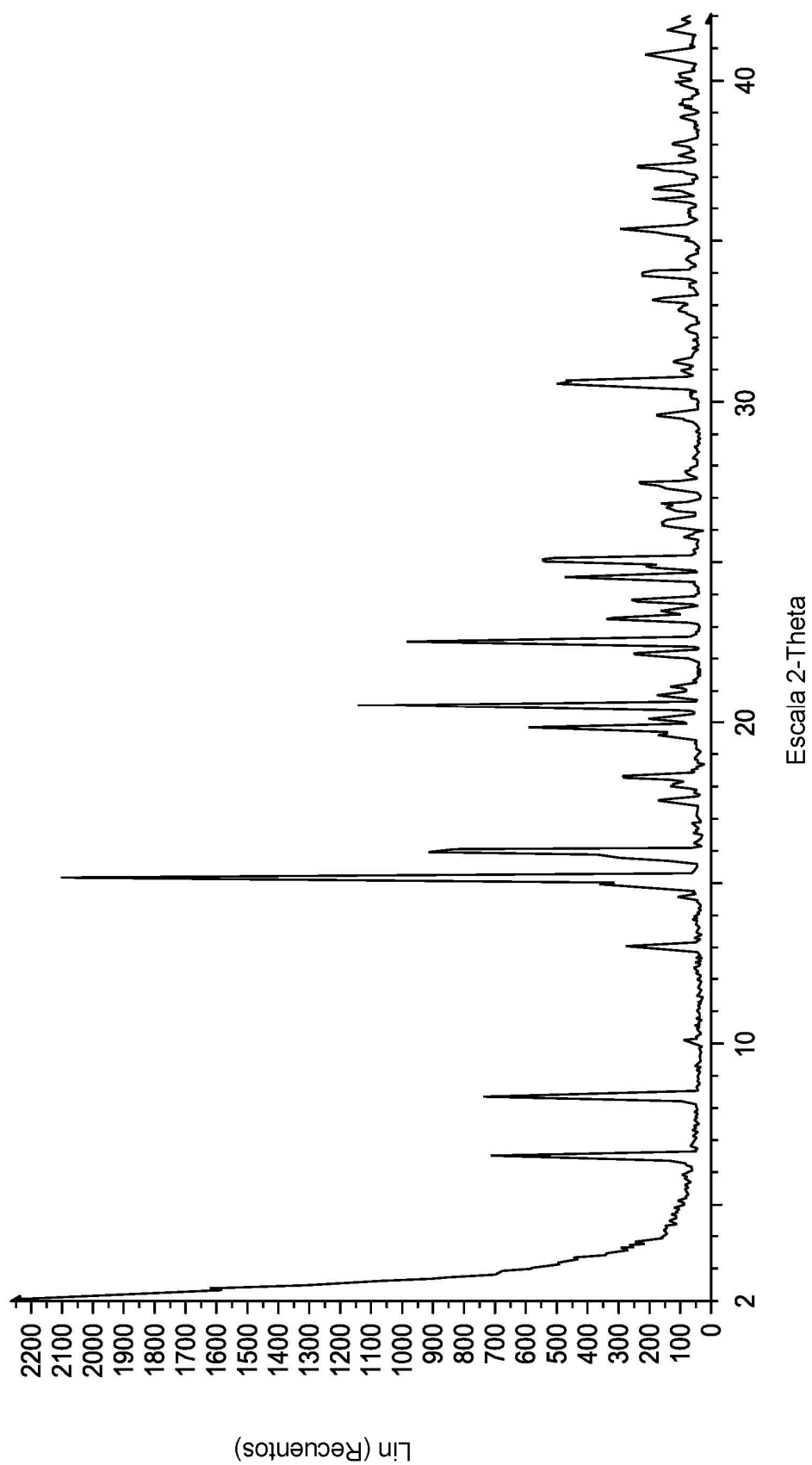


FIG. 3

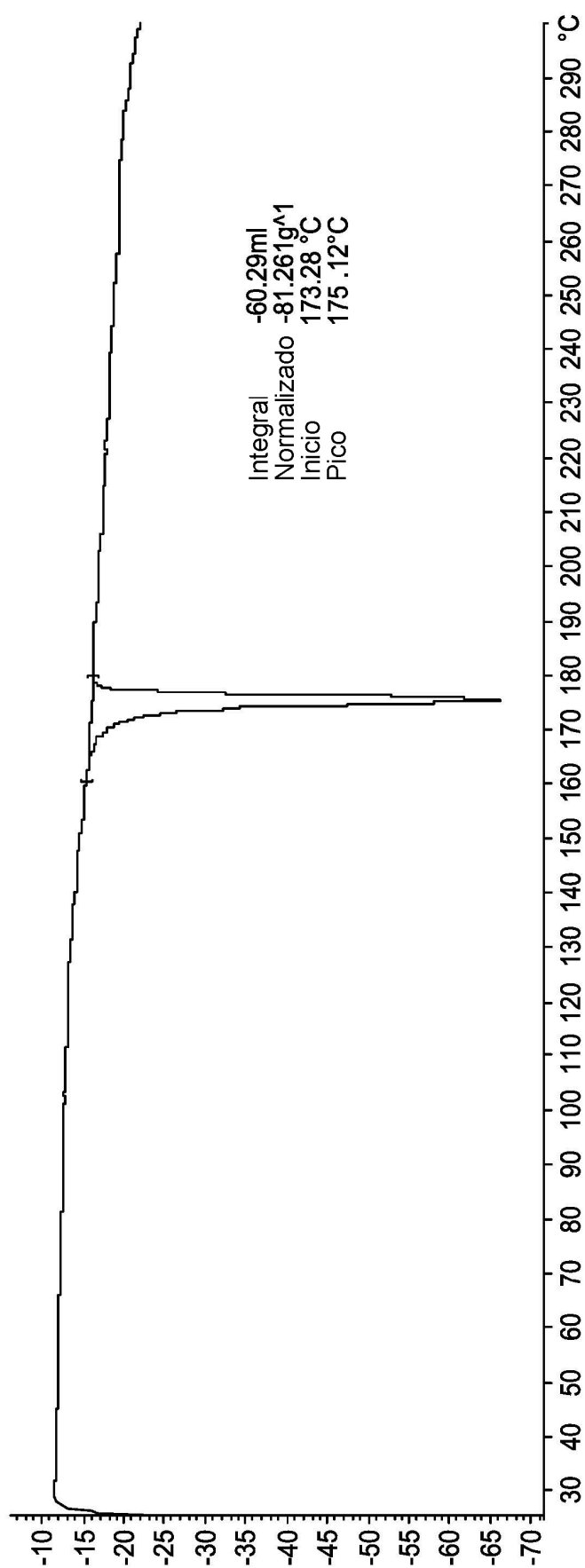


FIG. 4

Fig. 5A

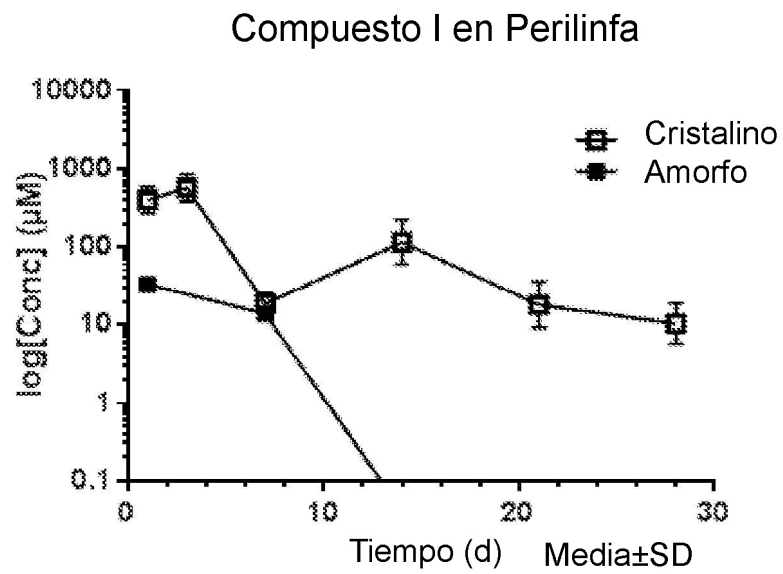


Fig. 5B

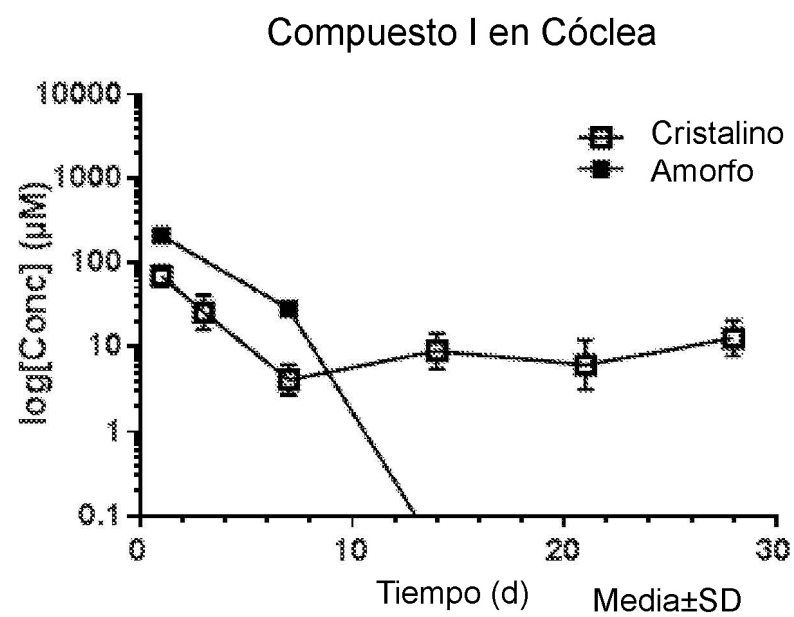


Fig. 6A

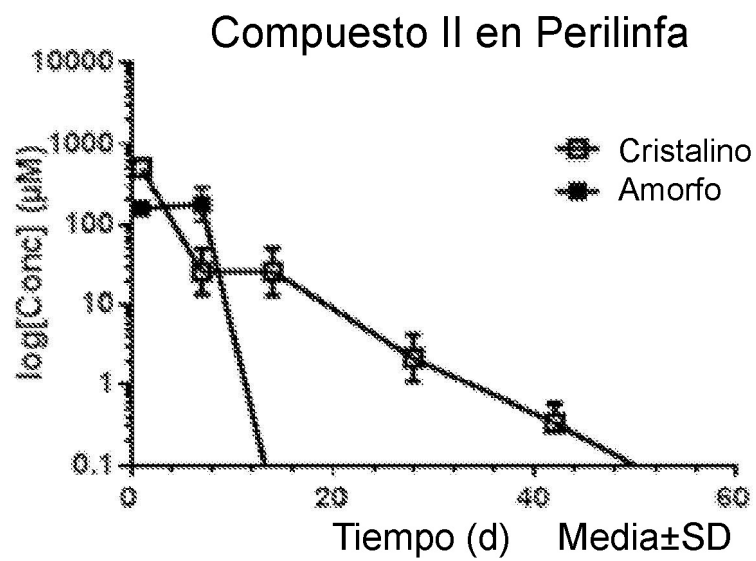


Fig. 6B

