

COMPUESTOS INHIBIDORES DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA DE NOTCH

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

El epitelio sensorial coclear contiene células ciliadas adaptadas para la detección de las vibraciones de sonido, que se transduce por estereocilias en las superficies apicales de las células ciliadas en impulsos eléctricos y se transmite al cerebro a través del nervio craneano VIII. Las células ciliadas auditivas producidas durante el desarrollo son postmitóticas y no son reemplazadas después de la pérdida o como parte del recambio celular normal de las células de los 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 que las células epiteliales prosensoriales adquieren diferentes destinos, ya sea la células ciliadas o células de soporte, a través de un proceso 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 Notch activa estimulada por ligandos en las células ciliadas adyacentes. Estas células se convierten en células de soporte.

La señalización Notch es una vía conservada evolutiva que desempeña un papel integral en el desarrollo y la homeostasis de los tejidos de los mamíferos. Los receptores Notch y ligandos que contienen dominios transmembrana de un solo paso, se expresan en la superficie celular y, por esa razón, la señalización Notch es

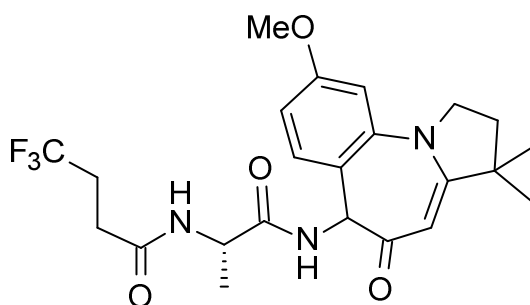
particularmente importante en la mediación de la comunicación entre las células adyacentes que expresan los receptores y ligandos. Hay cuatro receptores Notch conocidos que se encuentran en roedores y seres humanos, llamados Notch 1 a Notch 4. Los receptores Notch son proteínas heterodiméricas compuestas de dominios extracelulares e intracelulares que se sintetizan inicialmente como un polipéptido único. La interacción receptor-ligando desencadena una serie de escisiones proteolíticas del polipéptido receptor Notch en la que está involucrada la actividad de γ -secretasa. La actividad de γ -secretasa escinde el dominio intracelular de Notch desde el lado interno de la membrana plasmática que se transloca al núcleo para formar un complejo del factor de transcripción. El dominio intracelular de Notch (NICD) es la forma activa de la proteína. Varias funciones de señalización Notch incluyen la proliferación, diferenciación, apoptosis, angiogénesis, migración y auto-renovación. Estas diversas funciones de señalización de Notch durante el desarrollo y mantenimiento de los tejidos normales pueden ser activadas de manera aberrante 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 cumple un papel fundamental en la cascada de activación Notch. Como resultado, se han investigado activamente los inhibidores de γ -secretasa por su potencial para bloquear la activación del receptor Notch para el tratamiento de cáncer. No han surgido fármacos quimioterapéuticos inhibidores de Notch comerciales aunque los ensayos clínicos continúan.

La γ -secretasa, a través de la vía de señalización Notch, también cumple un papel fundamental en la diferenciación de las células prosensoriales. Como resultado, los inhibidores de γ -secretasa se han investigado activamente por su potencial para bloquear la activación del receptor Notch para el tratamiento de SNHL. En lugar de la administración de un agente inhibidor de Notch por varias metodologías para la entrada en la circulación sistémica para inducir la expresión del homólogo atonal 1 (Atoh1 o Math1) en niveles anormalmente elevados y durante períodos de tiempo extendidos, sería útil y deseable inducir la expresión de Atoh1, en el ambiente coclear, a un nivel de expresión y período de tiempo más específicos. La incapacidad para modular Atoh1 es aún un obstáculo para la investigación en las células ciliadas auditivas y el desarrollo de terapias para la regeneración de las células ciliares auditivas. Aunque la investigación continúa, tal como WO 2014/039781, no ha surgido un inhibidor de Notch comercial para tratar la pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida de células ciliadas auditivas.

Se necesita hallar compuestos que tengan actividad inhibidora de la señalización de la vía Notch. Hay una necesidad adicional de hallar compuestos que inhiban la vía de señalización de Notch por actividad inhibidora de γ -secretasa. También hay una necesidad de encontrar compuestos que posean características estructurales distintas que puedan contribuir a la vía de señalización Notch y la actividad inhibidora de la γ -secretasa. Una necesidad adicional es encontrar compuestos que induzcan la expresión de Atoh1 mediante la inhibición de la vía de señalización de Notch. Hay una necesidad adicional para encontrar compuestos que demuestren propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción convenientes.

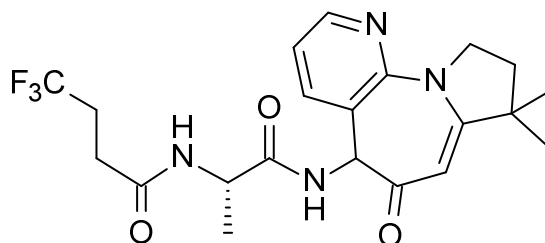
Un aspecto de la invención es proporcionar un compuesto de la estructura:



Compuesto 1

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 isómero de este puro en forma sustancialmente diastereomérica, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores .

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



Compuesto 2

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 puro en forma sustancialmente diastereomérica de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1, o a un diastereómero sustancialmente puro de este; o Compuesto 2, o un diastereómero sustancialmente puro de este; o una sal farmacéuticamente aceptable de cualquiera de los anteriores, y un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método de tratar un cáncer que es leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovario, 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 uterino, 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 y extrahepático, y carcinoma quístico adenoide en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método de tratar cáncer de pulmón en un paciente que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

Otro aspecto de la presente invención proporciona a método de tratar pérdida de audición neurosensorial causado por la pérdida de células ciliadas auditivas en un paciente que lo necesita que comprende administrar a una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero

sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a dicho paciente.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un método de inducir la generación de células ciliadas auditivas en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a dicho paciente.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en terapia.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovario, 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 uterino, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma oral de células escamosas, cáncer de piel, meduloblastoma, angiosarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, histiocitoma fibroso maligno, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma intrahepático y extrahepático, y carcinoma quístico adenoide.

Un aspecto adicional más de la presente invención proporciona el Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en el tratamiento de cáncer de pulmón.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este para usar en el tratamiento de la pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida de células ciliadas auditivas.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para usar en la inducción de la generación de células ciliadas auditivas.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de leucemia linfoblástica aguda de células T, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, eritroleucemia, cáncer de mama triple negativo, cáncer de mama, cáncer de ovario, 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 uterino, 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 y extrahepático, y carcinoma quístico adenoide.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de pulmón.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pérdida de audición neurosensorial causado por la pérdida de células ciliadas auditivas.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona el uso del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para la fabricación de un medicamento para inducir la generación de células ciliadas auditivas.

Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de tratar la

pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida de células ciliadas auditivas en un animal de compañía canino que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a dicho animal de compañía canino.

Otro aspecto de la invención proporciona un método de inducir la generación de células ciliadas auditivas en un animal de compañía canino que lo necesita, que comprende administrar a una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, a dicho animal de compañía canino.

La frase "Compuesto 1, un diastereómero de este" 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 modo similar, la frase "Compuesto 2, un diastereómero de este" 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.

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

"Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" significa la dosis del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, que es el Isómero 1 o Isómero 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, que es el Isómero 1 o Isómero 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o composición farmacéutica que contiene cualquiera de los anteriores, necesario para inhibir la señalización de Notch en un

paciente con cáncer y destruir las células cancerosas diana o lentificar o detener la progresión del cáncer en un paciente. De modo similar, “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” significa la dosis del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, que es el Isómero 1 o Isómero 2, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, que es el Isómero 1 o Isómero 2, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, o una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los anteriores, necesaria para inhibir la señalización de Notch en un paciente con pérdida de audición neurosensorial causado por la pérdida o daño de las células ciliadas auditivas o inducir la generación de células ciliadas auditivas.

Un “diastereómero sustancialmente puro del Compuesto 1 o Compuesto 2” significa el Isómero 1 o Isómero 2 sustancialmente libre del otro Isómero. El Compuesto 1 o Compuesto 2 es “puro en forma sustancialmente diastereomérica” cuando la pureza isomérica en la posición 6 del Compuesto 1 o la posición 5 del Compuesto 2 es mayor de 90% de exceso enantiomérico. En otra forma de realización, la pureza isomérica es mayor de 95% de exceso enantiomérico en la posición 6 del Compuesto 1 o la posición 5 del Compuesto 2. En aún otra forma de realización, la pureza isomérica es mayor de 98% de exceso enantiomérico en la posición 6 del Compuesto 1 o la posición 5 del Compuesto 2. En aún otra forma de realización, la pureza isomérica es mayor de 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 Compuesto 2, están contempladas dentro de la presente invención.

Las dosis previstas del Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este para tratar el cáncer están en el rango de 0,1 a 100 mg/paciente/día. Se prevé que las dosis preferidas estén en el rango de 1,0 a 75 mg/paciente/día. Se prevé que las dosis más preferidas estén en el rango de 2,0 a 50 mg/paciente/día. Las dosis previstas del Compuesto 1, un diastereómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, para tratar la pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida o daño de las células ciliadas auditivas, o inducir la generación de células ciliadas auditivas están en el rango de 0,01 a 100 mg/paciente/día. Se prevé que las dosis preferidas estén en el rango de 0,1 a 10

mg/paciente/día. Se prevé que las dosis más preferidas estén en el rango de 0,2 a 1,0 mg/paciente/día.

Para el cáncer, la pérdida de audición neurosensorial, o la inducción de la generación de células ciliadas auditivas, la dosis exacta requerida para tratar un paciente y la duración del tiempo de tratamiento será determinada por un médico en vista de la etapa y gravedad de la enfermedad, así como las necesidades específicas y la respuesta del paciente individual. Aunque se expresa como la dosis por día, el régimen de administración se puede ajustar para proporcionar un beneficio terapéutico más óptimo a un paciente y para manejar y mejorar cualquier toxicidad relacionada con el fármaco. Además de la administración diaria, la administración cada día por medio (Q2D); día por medio durante un período de cinco días, seguido de dos días sin dosificación (T.I.W.); cada tres días (Q3D); o una vez por semana (Q.I.W.) durante un ciclo de dosificación de 21 días; u otros regímenes de administración pueden ser apropiados.

Los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata" significa que incluyen el espectro completo de la intervención para el cáncer, pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida o daño de las células ciliadas auditivas, o inducción de la generación de células ciliadas auditivas, tales como administración del compuesto activo para aliviar, lentificar o revertir uno o más de los síntomas y retrasar la progresión del cáncer o pérdida o daño de células ciliadas auditiva que está sufriendo el paciente, o inducir la generación de células ciliadas auditivas en el paciente.

"Animales de compañía caninos" significa caninos domesticados y caninos de raza doméstica, que incluyen, pero no se limitan a, mascotas, perros de servicio, perros de rescate, perros pastores y perros guardianes de ganado.

"Pérdida auditiva", "pérdida de audición neurosensorial" o "pérdida de la audición" en un ser humano significa que el umbral de audición (sonido más suave oído (intensidad) a una frecuencia específica) en un paciente es de 21 a 40 dB para el caso leve; 41 a 55 dB para moderada; 56 a 70 dB para moderadamente grave: 71 a 90 dB para grave; y 91 dB y por encima para profunda. Las intensidades analizadas varían de 0 dB hasta 120 dB. Las frecuencias analizadas son típicamente 250, 500, 1.000, 2.000, 4.000 y 8.000 Hz. Las evaluaciones de audición de diagnóstico se llevan a cabo mediante pruebas de rutina conocidas y usadas por los expertos en la técnica, que incluyen audiometría de tonos puros incluyendo promedio de tonos puros, audiometría vocal que incluye el umbral de recepción del habla, evaluaciones de

respuestas auditivas del tronco cerebral (ABR o BAER), electrococleografía transtimpánica (ECOG), y las pruebas de emisiones otoacústicas (OAE). Las evaluaciones pediátricas y neonatales también se llevan a cabo mediante ensayos de rutina conocidos y usados por los expertos en la técnica, que incluyen audiometría de refuerzo visual, audiometría de juego, emisiones otoacústicas (OAE), y evaluaciones de respuesta auditiva del tronco cerebral.

Un compuesto de la presente invención con preferencia se formula como una composición farmacéutica con un portador farmacéuticamente aceptable y se administra mediante una variedad de vías. Con preferencia, para tratar cáncer, tales composiciones son para la administración oral.

Para el tratamiento de la pérdida de audición neurosensorial causada por la pérdida o daños de células ciliadas auditivas, o para inducir la generación de células ciliadas auditivas se puede formular y administrar una composición farmacéutica adecuada para administración oral o parenteral para proporcionar la terapia local o sistémica. Las composiciones orales incluyen comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina duras o blandas, soluciones, emulsiones o suspensiones. Las composiciones parenterales se pueden formular para permitir la administración que incluyen inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrapleural, intraesternal, transtimpánica, intralaberíntica o inyecciones intracocleares o infusión. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para permitir que un compuesto de la invención esté biodisponible después de la administración de la composición a un paciente, o formularse para proporcionar liberación controlada o sostenida del ingrediente farmacéutico activo. Se prefiere una composición farmacéutica adecuada para la administración transtimpánica a la cavidad del oído medio, y también se prefiere la administración al nicho de 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 las composiciones farmacéuticas adecuadas para vías alternativas de administración para proporcionar la administración sistémica y puede incluir composiciones y regímenes de dosificación alternativos o adicionales a la administración transtimpánica local. También se prefiere una composición de liberación sostenida de administración local en el que el intervalo de liberación puede variar de tres (3) días a noventa (90) días, de acuerdo con el vehículo de administración o la mezcla de agentes del vehículos de administración en que está asociado el Compuesto 1, o un diastereómero sustancialmente puro, o una

sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las composiciones farmacéuticas, procesos de preparación y sistemas de administración para la administración específica de fármacos son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (A. Gennaro, *et al.*, eds., 19th ed., Mack Publishing Co., 1995); Salt y Plontke, "Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear", *Audiol Neurotol*, 2009, (14); 350-360; Rhee, *et al.*, "Sustained-Release Injectable Drug Delivery," *Pharmaceutical Technology*, Special Issue Drug Delivery, 01 Nov. 2010. Las composiciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, amortiguadores, agentes de enmascaramiento o antioxidantes.

Un compuesto de la presente invención es capaz de reacción con numerosos ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables. Tales sales farmacéuticamente aceptables y la metodología general para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo., P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, January 1977.

El Compuesto 1, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero sustancialmente puro de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, se puede preparar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, así como los que se describen a continuación. Las etapas específicas se pueden combinar de diferentes maneras para preparar el Compuesto 1, un diastereómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, o Compuesto 2, un diastereómero de este, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

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 se puede denominar 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; también se puede denominar: 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]etilo]-; y otros nombres se pueden usar para identificar inequívocamente 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. Se pueden usar otros nombres para identificar inequívocamente 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 se puede denominar 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; también se puede denominar: 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)etilo)-; y se pueden usar otros nombres para para identificar inequívocamente 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. También se pueden usar otros nombres para identificar inequívocamente cada uno de los diastereómeros.

Se entenderá que el Compuesto 1 y el Compuesto 2 se representan con uno de los dos centros quirales fijos. En la presente, las denominaciones de Cahn-Ingold-Prelog de (R) - y (S) - se utilizan para referirse a los isómeros específicos. Los estereoisómeros específicos se pueden preparar por síntesis estereoespecífica usando materiales de partida enantioméricamente puros o enriquecidos. Los estereoisómeros específicos de cualquiera de los materiales de partida, productos intermedios, o mezclas racémicas que incluyen el Compuesto 1 o Compuesto 2 se pueden resolver mediante técnicas bien conocidas en la materia, tales como las que se hallan en Stereochemistry of Organic Compuestos, 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 la cromatografía sobre fases estacionarias quirales, las resoluciones enzimáticas, o la cristalización fraccionada o la cromatografía de diastereómeros formados para tal fin, tales como sales diastereoméricas. Cuando se aísla un compuesto quiral o se resuelve en sus isómeros, pero las configuraciones absolutas o rotaciones ópticas no están determinadas, los isómeros se denominan arbitrariamente como Isómero 1 e Isómero 2 correspondiente al orden en que cada uno eluye en la cromatografía quiral y si la cromatografía quiral se inicia a principios de

la síntesis, se aplica la misma denominación a los compuestos intermedios y ejemplos siguientes. Si bien se contemplan todas las mezclas que contienen los compuestos de la presente invención dentro de la presente invención, la forma de 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 que no estén disponibles comercialmente, se sintetizan fácilmente usando las referencias específicas proporcionadas, por procedimientos estándar empleados comúnmente por los expertos en la técnica o que se encuentran en textos de referencia generales.

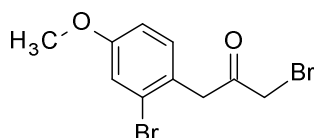
Los ejemplos de procedimientos y métodos conocidos incluyen los descritos en textos de referencia generales, tales como Comprehensive Organic Transformations, VCH Publishers Inc, 1989; Compendium of Organic Synthetic Methods, Volumes 1-10, 1974-2002, Wiley Interscience; Advanced Organic Chemistry, Reactions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

Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados indicados: "mAtoh1" se refiere a proteína del homólogo atonal 1 murino; "hAtoh 1 se refiere a la proteína del homólogo atonal 1 humana; "Atoh1" se refiere al gen humano del homólogo atonal 1; "Medio básico" se refiere a 500 ml de medio DMEM/F12 + 5 ml de patrón N2 100X y 10 ml de patrón B27 50X más 500 µl de patrón de Ampicilina (1000X, 50 mg/ml) y 1667 µl de Fungizone (300X); "BFGF" se refiere al factor de crecimiento de fibroblastos básico; "DMEM" se refiere a la Medio Eagle modificado por Dulbecco; "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "EGF" se refiere al factor de crecimiento epidérmico; "EGTA" se refiere a ácido etilenglicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N',N'-tetraacético; ES/MS se refiere a espectrometría de masas por electroaspersión; "FBS" se refiere a suero bovino fetal; "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; "IC₅₀" se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; "IgG" se refiere a la inmunoglobulina G; "Math1" se refiere al gen humano del homólogo atonal 1; "Medio A" se refiere a 200 ml medio básico + EGF bFGF + IGF-1 + sulfato de heparano en 20, 10, 50, y 50 ng/ml, respectivamente; "MEM" se refiere a un medio

esencial mínimo; "min" se refiere a minutos; "MS" se refiere a espectrometría de masas; "N1ICD" se refiere al dominio intracelular Notch1; "nGFP" se refiere a la proteína fluorescente verde nuclear; "OC" se refiere al órgano de Corti; "PBS" se refiere a amortiguador fosfato salino; "PBST" se refiere a solución salina amortiguada con fosfato + Tween®; "qPCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; "qRT-PCR" se refiere a la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa; "rpm" se refiere a revoluciones por minuto; "amortiguador RLT" se refiere a un amortiguador RNeasyLysis; "RT" se refiere a temperatura ambiente; "Tbp" se refiere a la proteína de unión a TATA;

Preparación 1

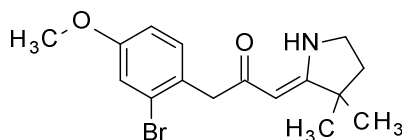
1-Bromo-3-(2-bromo-4-metoxi-fenil)propan-2-ona



Se añade trimetilsilildiazometano (118,4 mL, 236,80 mmol, 2 M en hexanos) gota a gota a una solución agitada 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) bajo nitrógeno. Después de 15 minutos se deja calentar a RT y se agita durante 2 h bajo nitrógeno. Se concentra para obtener un aceite rojo espeso (61 g). Se añade bromuro de hidrógeno (36 mL, 197 mmol, 33% en ácido acético) gota a gota a una solución agitada a 5 °C de 2-(2-bromo-4-metoxi-fenil)acetil azida de la etapa previa en ácido acético (265 mL). Después de la adición, se deja calentar a RT bajo nitrógeno. Después de 45 minutos, se inactiva con hielo/agua, (500 mL) lo que produce un precipitado marrón. Se filtran los sólidos y se lava con agua (100 mL) y hexanos (100 mL) y se seca bajo vacío a 45 °C durante 2 h para producir el compuesto del título como un aceite anaranjado (63,0 g, 99%). ¹H NMR (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).

Preparación 2

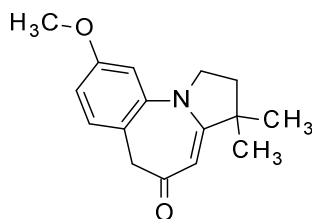
(3Z)-1-(2-Bromo-4-metoxi-fenil)-3-(3,3-dimetilpirrolidin-2-iliden)propan-2-ona



Se añade 3,3-dimetilpirrolidin-2-tiona (26,5 g, 205 mmol) a una suspensión del intermediario provisto por la Preparación 1, 1-bromo-3-(2-bromo-4-metoxi-fenil)propan-2-ona (60,00 g, 186 mmol), y yoduro de potasio (31 g, 86 mmol) en tetrahidrofurano (600 mL) a RT en una porción y se agita durante 1h. Se añade metil ter-butil éter (200 mL), se filtran los sólidos y se lava la torta de filtración con metil-ter-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 como un sólido amarillo claro (100 g). A una suspensión del sólido (100 g, 201 mmol) en acetonitrilo (1 L), se añade trietilamina (56 mL, 401 mmoles) y trifenilfosfina (58 g, 221 mmol) y se agita a 65 °C durante 2,5 h. Se añade metil ter-butil éter (200 ml) y se filtran los sólidos. Se evapora el filtrado, se trituran los residuos con metil ter-butil éter (20 mL) y se filtran los sólidos (dos veces). Se evaporan los filtrados combinados para obtener 50 g de material crudo. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 20-50% de acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido blancuzco (41 g, 70%). MS (m/z): 338,0/340,0 (M+/M+2).

Preparación 3

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

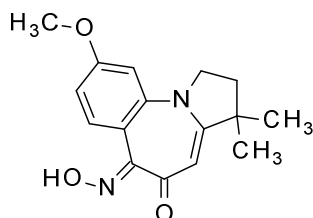


Se desgasifica/lava con nitrógeno (x3) una mezcla del intermediario provisto por la Preparación 2, (3Z)-1-(2-bromo-4-metoxi-fenil)-3-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilidene)propan-2-ona (40,0 g, 118 mmol), acetato de paladio (2,7 g, 12 mmol), carbonato de cesio (77 g, 237 mmol), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (13,7 g, 24 mmol), y N-metil-2-pirrolidona (1,2 L). Se calienta la suspensión a 150 °C durante 4 h. Se enfría a RT, se filtran los sólidos, se lava con acetato de etilo y se descartan los sólidos. Se añade acetato de etilo (1 L) y agua (500 mL) al filtrado, se filtran los sólidos a través de tierras diatomáceas y se descartan. Se separan las capas de filtrado, se extraen de la solución acuosa con acetato de etilo (2 x 20 mL), seguido por diclorometano (3 x 100 mL). Se lavan las capas orgánicas combinadas con solución acuosa de bicarbonato de sodio 5% dos veces, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra para obtener 100 mL de aceite marrón oscuro. Se filtra el material sobre

un lecho de sílice con diclorometano seguido por metanol/diclorometano 1% y se concentra el filtrado. Se divide el residuo entre acetato de etilo y solución acuosa de bicarbonato de sodio 5%, se extrae de nuevo de la solución acuosa con acetato de etilo, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra para obtener el producto bruto como una espuma marrón oscura. Se disuelve la espuma resultante en acetato de etilo (250 mL), se añade SiliaBond Thiol® (80 g) y se agita a RT durante la noche. Se filtran los sólidos, se lava la torta de filtración con acetato de etilo y diclorometano, se concentra el filtrado para obtener el compuesto del título como un sólido marrón claro (19,6 g, 65%). MS (m/z): 258,0 (M+H).

Preparación 4

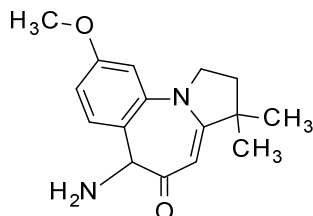
6-Hidroxiimino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona



Se añade ter-butoxido de potasio (11 g, 98 mmol) en varias porciones a una solución agitada a 0 °C del intermediario provisto por la Preparación 3, 9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-A][1]benzazepin-5(6H)-ona (16,8 g, 65 mmol), en tetrahydrofurano (336 mL) y se agita durante 15 minutos. Se añade nitruro de amilo (12,2 mL, 91 mmol) gota a gota y se agita la mezcla durante 30 minutos a 0 °C. Se vierte la mezcla de reacción en hielo/agua (200 mL) y se extrae la mezcla con acetato de etilo (2 x 200 mL). Se filtran los sólidos cristalizados, se extraen del filtrado con diclorometano (2 x 100 mL). Se lavan los extractos orgánicos combinados con salmuera (100 mL), se secan en sulfato de sodio, se filtran y concentran para proporcionar un sólido marrón claro. Se tritura el sólido con 1:1 metil ter-butil éter/hexano, se combina con el sólido previamente combinado para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo claro (16,5 g, 88%). MS (m/z): 287,1 (M+H).

Preparación 5

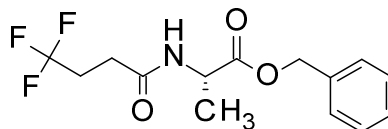
6-Amino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona



Se añade ácido trifluoroacético (17 mL, 231 mmol) gota a gota durante 10 minutos a una suspensión agitada a 5 °C-10 °C del intermediario provisto por la Preparación 4, 6-hidroxiimino-9-metoxi-3,3-dimetil-2,3-dihidro-1H-pirrol[1,2-a][1]benzazepin-5(6H)-ona (16,5 g, 58 mmol), y polvo de zinc (11,3 g, 173 mmol) en diclorometano (248 mL) luego se deja calentar a RT. Se filtra la mezcla a través de un lecho de tierras diatomáceas, se vierte el filtrado sobre una mezcla de hielo y solución acuosa saturada de carbonato de sodio (1:1, 500 mL). Se filtra la suspensión resultante a través de tierra diatomácea y se lava la almohadilla de filtro con diclorometano. Se extrae de la capa acuosa con diclorometano (100 mL), se secan las capas orgánicas combinadas en sulfato de sodio, se filtran y concentran para obtener el compuesto del título como una espuma marrón claro (14,7 g, 94%). MS (m/z): 273,1 (M+H).

Preparación 6

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

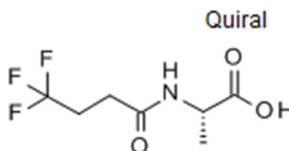


Se añade éster de L-alanina bencilo clorhidrato (7 g, 32,5 mmol), diisopropiletilamina (28 mL, 162 mmol), hidrato de hidroxibenzotriazol (7,5 g, 49 mmol), y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (9,3 g, 49 mmol) a una solución agitada de ácido 4,4,4-trifluorobutírico (7,1 g, 49 mmol) en diclorometano (162 mL) y se agita a RT bajo N₂ durante 20 h. Se inactiva con solución acuosa de ácido cítrico 20% (150 mL), se agita la mezcla durante 5 minutos, se separan las capas y se extraen de la fase acuosa con diclorometano (100 mL). Se lavan las capas orgánicas combinadas con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (150 mL), se secan en sulfato de magnesio, se filtran y se concentran para obtener 10,6 g de sólido amarillo claro. Se purificar el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente 25-50% de acetato de etilo en hexanos para obtener

el compuesto del título como un sólido blanco (9,2 g, 94%). MS (m/z): 304,2 (M+H).

Preparación 7

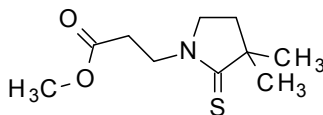
Ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoico



Se añade paladio (1,8 g, 0,8 mmol, 5% en C) a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 6, (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoato de bencilo (8,8 g, 29 mmol), en metanol (88 mL) a RT. Se desgasifica la mezcla y se agita bajo hidrógeno (atmósfera de balón) durante 5 h. Se filtra la mezcla sobre tierra diatomácea, se lava el lecho con metanol y se concentra el filtrado para obtener un sólido blanco. Se trituran los sólidos con diclorometano y se secan bajo vacío durante la noche a temperatura ambiente para producir el compuesto del título como un sólido blanco (6,11 g, 99% de rendimiento). MS (m/z): 214,1 (M+H).

Preparación 8

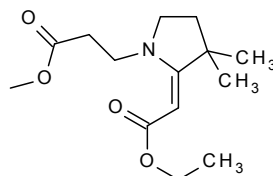
3-(3,3-dimetil-2-tioxopirrolidin-1-il)propanoato de metilo



Se disuelve 3,3-dimetilpirrolidin-2-tiona (15,7 g, 122 mmol) y acrilato de metilo (12 mL, 134 mmol) en tetrahidrofurano (100 mL) y se agita a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añade hidróxido de sodio (0,8 g, 20 mmol) y se agita durante la noche a RT bajo nitrógeno. Se diluye con salmuera, se extrae con acetato de etilo, se separan las capas, se lava la capa orgánica con salmuera, se seca en sulfato de sodio, se filtra y concentra para producir 27,5 g de sólidos brutos. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente 20-50% del acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido blanco (25,9 g, 99%). MS (m/z): 216,2 (M+H).

Preparación 9

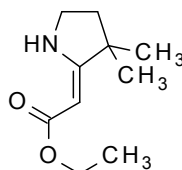
3-[(2Z)-2-(2-etoxi-2-oxo-etiliden)-3,3-dimetil-pirrolidin-1-il]propanoato de metilo



Se añade tetrakis(acetato)diodio(II) (3,74 g, 8,5 mmol) a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 8, 3-(3,3-dimetil-2-tioxopirrolidin-1-il)propanoato de metilo (41,4 g, 192 mmol), en tolueno (156 mL) y se calienta a 110 °C bajo nitrógeno. Se añade etildiazoacetato (89 mL, 844 mmol) gota a gota durante aproximadamente 18 horas, luego se calienta durante la noche a 110 °C. Se concentra y purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con acetato de etilo 30% en hexanos para obtener el compuesto del título como un aceite amarillo (34,5 g, 67%). MS (m/z): 270,2 (M+H).

Preparación 10

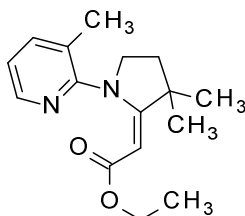
(2Z)-2-(3,3-dimetilpirrolidin-2-ilidene)acetato de etilo



Se añade hexametildisilazida de potasio (301 mL, 0,5 M en tolueno, 151 mmol) gota a gota durante 45 minutos a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 9, 3-[(2Z)-2-(2-etoxi-2-oxo-etiliden)-3,3-dimetil-pirrolidin-1-il]propanoato de metilo (33,8 g, 126 mmol), en tetrahidrofurano (430 mL) bajo nitrógeno usando un baño de hielo/agua para mantener la temperatura <30 °C. Se agita durante 40 minutos después de la terminación de la adición. Se inactiva con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (250 mL) luego se concentra. Se divide entre dietiléter y solución salmuera, se extrae de la fase acuosa con acetato de etilo (x 4), se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra para obtener 37 g de material. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con 10% acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título (9,1 g, 40%). MS (m/z): 184,2 (M+H).

Preparación 11

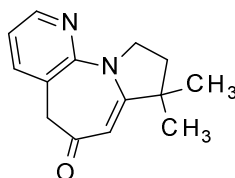
(2Z)-2-[3,3-dimetil-1-(3-metil-2-piridil)pirrolidin-2-iliden]acetato de etilo



Se combinan 2-bromo-3-metilpiridina (1,5 g, 8,7 mmol), el intermediario provisto por la Preparación 10, (2Z)-2-(3,3-dimetilpirrolidin-2-iliden)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 recipiente de reacción. Se burbujea nitrógeno a través de la solución durante 10 minutos. Se añade carbonato de potasio (3,6 g, 26 mmol) y yoduro de cobre (I) (0,83 g, 4,4 mmol) todo de una vez, se sella y calienta la mezcla agitada a 120 °C durante 2 días. Se diluye con diclorometano, se filtra a través de tierra diatomácea y se concentra el filtrado. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 5-100% acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título como un aceite amarillo pálido (1,58 g, 66%). MS (m/z): 275,0 (M+H).

Preparación 12

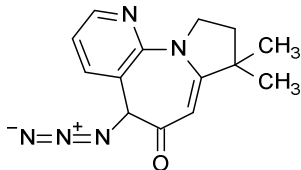
8,8-Dimetil-9,10-dihidro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-6(8H)-ona



Se añade bis(trimetilsilil)amida de sodio (22 mL, 1 M en tetrahidrofurano, 22 mmol) por medio de jeringa a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 11, (2Z)-2-[3,3-dimetil-1-(3-metil-2-piridil)pirrolidin-2-iliden]acetato de etilo (2,88 g, 10,5 mmol), y tetrahidrofurano (60 mL) en un recipiente de reacción. Se sella el recipiente y se calienta a 70 °C con agitación durante 3 días. Se enfría a RT, se inactiva con salmuera, se extrae con acetato de etilo, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra para obtener un aceite marrón. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 50-100% acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (1,70 g, 71%). MS (m/z): 229,2 (M+H).

Preparación 13

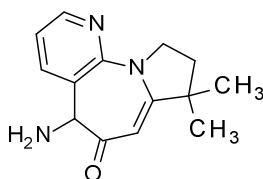
6-Azido-10-aza-3,3-dimetil-2,6-dihidro-1H-pirrol[1,2-a][1]benzazepin-5-ona



Se añade diisopropilamida de litio (7,0 mL, 10,5 mmol, 1,5 M en hexanos) durante 10 minutos a una solución agitada a -78 °C del intermediario provisto 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) bajo nitrógeno. Después de 30 minutos se añade ácido acético (2,3 mL, 41 mmol) por medio de jeringa luego se deja calentar a RT bajo nitrógeno. Se inactiva con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. Se divide la mezcla entre salmuera y acetato de etilo, se separan las capas, la capa de acetato de etilo se lava con salmuera, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra para obtener un sólido marrón. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 5-60% acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título (1,2 g, 55%). MS (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

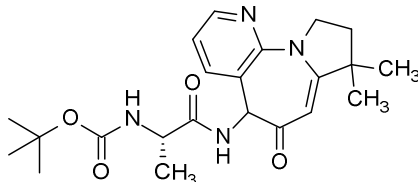


Se añade polvo de cinc (1,2 g, 18 mmol) seguido por cloruro de amonio (5 g, 66 mmol) a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 13, 6-azido-10-aza-3,3-dimetil-2,6-dihidro-1H-pirrol[1,2-a][1]benzazepin-5-ona (1,2 g, 4,5 mmol), en etanol (50 mL) y agua (15 mL) a RT. Después de 1 hora se diluye con acetato de etilo, se filtran los sólidos y se concentra el filtrado. Se suspende el residuo entre acetato de etilo y salmuera, se separan las capas, se secan en sulfato de sodio, se filtran y concentran. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 5-40% [10% de amoníaco 2 M en metanol/diclorometano] en diclorometano para obtener el compuesto del título como

un sólido amarillo (0,72 g, 67%). MS (m/z): 244,2 (M+H).

Preparación 15

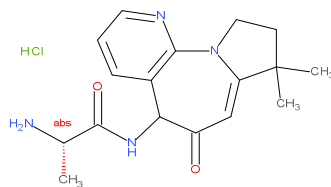
N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de ter-butilo



Se añade ácido (2S)-2-(ter-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 agitada a 0 °C del intermediario provisto 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) bajo nitrógeno. Se añade clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,68 g, 3,6 mmol) y se deja calentar a RT bajo nitrógeno. Después de 2 h, se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. Se lava la capa orgánica con salmuera, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de acetato de etilo 50-100% en hexanos para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (1,04 g, 84%). MS (m/z): 415,0 (M+H).

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



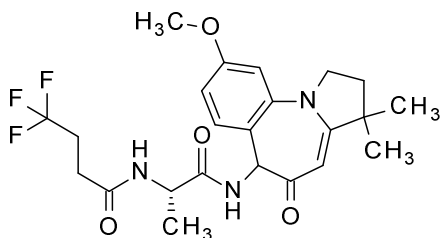
Se añade cloruro de hidrógeno (12,5 mL, 50 mmol, 4 M en dioxano) a una solución agitada del intermediario provisto por la Preparación 15 N-[(1S)-2-[(10-aza-3,3-dimetil-5-oxo-2,6-dihidro-1H-pirrolo[1,2-a][1]benzazepin-6-il)amino]-1-metil-2-oxo-etil]carbamato de ter-butilo (1,04 g, 2,5 mmol), en 1,4-dioxano (40 mL) y se calienta a 45 °C con agitación. Cuando LC/MS indica la reacción completa, se concentra para obtener el compuesto del título como un sólido amarillo (0,93 g, bruto). MS (m/z):

X-20729

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-benzo[f]pirrolo[1,2-a]azepin-6-il)amino)-1-oxopropan-2-il)butanamida



Parte 1

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 diastereomérica

Se añade clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (12,4 g, 65 mmol) a una solución agitada del intermediario provisto 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 intermediario provisto por la Preparación 7, ácido (2S)-2-(4,4,4-trifluorobutanoilamino)propanoico (10,9 g, 51 mmol), en diclorometano (294 mL) a RT. Se enfria la mezcla a 5 °C, se añade 1-hidroxibenzotriazol (8,75 g, 65 mmol) y se continua agitación a RT durante 10 minutos. Se lava la mezcla con agua (3 x 100 mL), se seca con sulfato de sodio, se filtra y concentra para proporcionar un sólido marrón. Se tritura con metil ter-butil éter para proporcionar el compuesto del título (mezcla de diastereómeros) como un sólido blancuzco (22,0 g, 87%). MS (m/z): 468,1 (M+H).

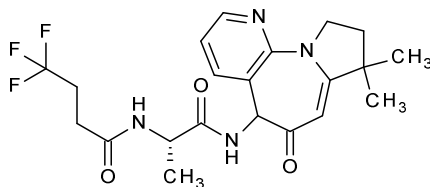
Parte 2

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 Isómeros 1 y 2

Se separa una mezcla de diastereómeros del Ejemplo 1, Parte 1 en una columna Chiralpak AD que eluye con acetonitrilo/etanol 10% (dimetiletilamina 0,2%) para obtener el compuesto Isómero 1 (R_t =3,20 min) como un sólido blanco (9,8 g, 38%) y el compuesto Isómero 2 (R_t =7,37 min) como un sólido blanco (9,0 g, 36%). MS (m/z): 468,2 (M+H) para ambos isómeros.

Ejemplo 2

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-tetrahydro-5H-pirido[3,2-f]pirrolo[1,2-a]azepin-5-il)amino)-1-metil-2-oxoetil)-4,4,4-trifluorobutanamida diastereomérica

Se añade ácido 4,4,4-trifluorobutanoico (0,45 g, 3,2 mmol), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,49 g, 3,2 mmol) y diisopropiletilamina (2,3 mL, 13,2 mmol) a una solución agitada a 0 °C del intermediario provisto 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) bajo nitrógeno. Se añade clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (0,61 g, 3,2 mmol) y se deja la mezcla calentar a RT bajo nitrógeno durante 16 h. Se diluye con agua y se extrae con acetato de etilo. La capa orgánica se lava con salmuera, se seca en sulfato de sodio, se filtra y se concentra. Se purifica el residuo por medio de cromatografía en columna flash en sílice que eluye con un gradiente de 75-100% de acetato de etilo en hexanos para obtener el compuesto del título (mezcla de diastereómeros) como un sólido blancuzco (0,82 g, 71%). MS (m/z): 439,2 (M+1).

Parte 2

N-((2S)-1-((8,8-dimetil-6-oxo-6,8,9,10-tetrahydro-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

Se separa una mezcla de diastereómeros del Ejemplo 2, Parte 1 en una columna Chiralpak AD-H que eluye con MeOH/CO_{2(gas)} 15% para obtener el Isómero 1 (R_t=1,60 min) como un sólido blanco (194 mg, 24%, se epimeriza a 32% DE (exceso diastereomérico)) e Isómero 2 (R_t=2,31 min) como un sólido blanco (469 mg, 57%). MS (m/z): 439,0 (M+H) para ambos isómeros.

El cáncer se reconoce cada vez más como una colección heterogénea de enfermedades cuya iniciación y progresión son inducidas por la función aberrante de uno o más genes que regulan la reparación del ADN, estabilidad del genoma, proliferación celular, muerte celular, adhesión, angiogénesis, invasión y metástasis en microambientes de células y tejidos. La función variante o aberrante de los genes "cáncer" pueden resultar del polimorfismo de ADN natural, cambios en el número de copias del genoma (a través de la amplificación, supresión, pérdida de cromosomas, o duplicación), cambios en la estructura del gen y cromosoma (a través de la

translocación cromosómica, inversión, u otro reordenamiento que lleva a la expresión génica desregulada), y mutaciones puntuales. Las neoplasias cancerosas pueden ser inducidas por una función génica aberrante y mantenidas por la misma función aberrante de genes, o el mantenimiento y la progresión pueden ser exacerbados por las funciones de genes aberrantes adicionales.

Más allá de las aberraciones cromosómicas genéticas mencionadas anteriormente, cada uno de los tipos de cáncer también pueden incluir modificaciones epigenéticas del genoma, que incluyen la metilación del ADN, la impronta genómica, y modificación de las histonas por acetilación, metilación o fosforilación. Una modificación epigenética puede cumplir un papel en la inducción y/o mantenimiento de la malignidad.

Extensos catálogos de las aberraciones citogenéticas en el cáncer humano se han compilado y se mantienen y actualizan regularmente en línea (véase 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. El Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Genome Project mantiene un "Censo del gen del cáncer" detallado en línea de todos los genes humanos que han sido vinculados causalmente a la tumorigénesis, así como la base de datos COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) de mutaciones somáticas en el cáncer humano. Otra fuente que contiene abundante información sobre los cambios citogenéticos vinculados causalmente a diversos tipos de cáncer es el Atlas de Genética y Citogenética en Oncología y Hematología.

El diagnóstico de neoplasias cancerosas por biopsia, inmunofenotipificación y otros ensayos son conocidos y utilizados rutinariamente. Además del bandeo cromosómico de alta resolución y tecnologías de imagen cromosómica avanzadas, las aberraciones cromosómicas en los presuntos casos de cáncer se puede determinar mediante el análisis citogenético tal como hibridación in situ fluorescente (FISH), cariotipificación, cariotipificación espectral (SKY), FISH múltiplex (M-FISH), hibridación genómica comparada (CGH), matrices de polimorfismo de nucleótido único (chips SNP) y otras pruebas de diagnóstico y análisis conocidas y usadas por los expertos en la técnica.

El papel oncogénico de Notch se informó primero en la leucemia de células T humanas que implica una translocación del dominio intracelular Notch1 a la región promotora del receptor- β de las células T, lo que produce la sobreexpresión del

dominio intracelular Notch1 (Grabher et al. Nature Review Cancer, 2006(6):347-359; Weng et al. Science, 2004(306):269-271). La sobre expresión del dominio intracelular de Notch1 en las células progenitoras hematopoyéticas de ratones provocó que los ratones exhiban leucemia linfoblástica aguda de células T similares a la humana. Además de la leucemia linfoblástica aguda de células T, existe una creciente evidencia de que las señales de Notch son oncogénicas en otros tipos de cáncer a través de múltiples mecanismos, que incluyen la amplificación del receptor y la sobreexpresión de ligandos y/o receptores, que incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica crónica (Rosati et al, Blood, 2009(113): 856-865), leucemia mielógena aguda (Sliwa et al. Int J Clin Exp Pathol, 2014(7(3)): 882-889), leucemia mielógena crónica (Nakahara et al Blood, 2010(115(14)): 2872-2881), y eritroleucemia (Robert-Moreno et al, Leukemia, 2007(21): 1496-1503). La señalización Notch constitutiva aberrante debido a la mutación o sobreexpresión de ligandos y/o receptores también está implicada en numerosas neoplasias de tumores sólidos que incluyen cáncer de mama negativo triple Cancer Discovery, 2014(4): 1154-1167), cáncer de mama, cáncer de ovario (Park et al. Cancer Research, 2006(66):6312-6318), melanoma (Gast et al. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745), cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas (Westhoff et al PNAS, 2009 (106):. 22293-22.298), cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de hígado, carcinoma de células escamosas (oral), cáncer de piel y meduloblastoma (Rangathan et al., Nature Review Cancer, 2011(11):338- e información complementaria S1 (tabla)). La señalización de Notch constitutiva aberrante debido a la mutación o sobreexpresión de ligandos y/o receptores también está implicada en angiosarcoma (Ravi et al, J Clin Oncol, 2007, (25 (18S, 20 de junio Suplemento)): Abstract 10030), rabdomiosarcoma (Belyea et al, Clin Cancer Res, 2011(17(23)): 7324-7336; Roma et al, Clin Cancer Res, 2011(17(3)): 505-513), liposarcoma (J Clin Oncol, 2009, (27(15S, Suplement)): Abstract 10526), histiocitoma fibroso maligno (Wang et al, Cancer Res, 2012, (72): 1013-1022), carcinoma hepatocelular (Villanueva et al, Gastroenterology, 2012, (143): 1660-1669), colangiocarcinoma intrahepático y extrahepático (Wu et al, Int J Exp Pathol, 2014, (7(6)): 3272-3279; Sekiya et al, J Clin Invest, 2012, (122(11)): 3914-3918; Yoon et al, World J Gastroenterol, 2011, (17(35)): 4023-4030), y carcinoma quístico adenoide (Bell et al, Annals of Diagnostic Pathology, 2014, (18): 10-13; Stoeck et al, Cancer Discov, 2014, (4): 1154-1167). La inhibición de la señalización Notch presenta un objetivo atractivo para proporcionar beneficios terapéuticos a pacientes con cáncer cuya

enfermedad se indujo por la activación aberrante de la vía de señalización Notch constitutiva. Shih et al. Cancer Research, 2007(67)1879-1882.

Uno de los genes definitivos para el desarrollo de células ciliadas del oído interno es el homólogo de mamífero del factor de transcripción atonal-1 hélice-bucle-hélice básico (Atoh1). Se requiere la expresión de Atoh1 en células cocleares para la génesis de células ciliadas auditivas. Las células epiteliales prosensoriales dentro del órgano de Corti en desarrollo que expresan Atoh1 se diferenciarán en células ciliadas auditivas (Helms et al, Development 2000, (127(6)): 1185-1196), y Atoh1 es uno de los primeros marcadores de diferenciación de las células auditivas ciliadas. Las células de soporte del órgano de Corti mantienen el potencial para desarrollar las características de las células ciliadas, que incluyen la formación de cilias (Zheng et al, Nature Neuroscience, 2000, (3 (6)): 580-586; Kawamoto et al, J Neurosci, 2003, (23 (11)): 4.395-4.400; Izumikawa et al, Nat Med, 2005, (11 (3)): 271-276; y función de las células ciliadas apropiadas (Kawamoto et al, 2003).

Cada célula ciliada en la cóclea está rodeada por células de soporte no sensoriales que proporcionan soporte trófico y estructural para las células ciliadas y ganglionares y son esenciales en el mantenimiento de concentraciones iónicas adecuadas en el órgano de Corti a través de una comunicación intercelular de unión a la brecha. Existen dos tipos de células ciliadas: células ciliadas internas y externas. Las células ciliadas de la cóclea de los mamíferos, incluidos los seres humanos, se componen de una fila de células ciliadas internas y tres filas de células ciliadas externas. Las células ciliadas internas son los receptores sensoriales reales, y 95% de las fibras del nervio auditivo que se proyectan hacia el cerebro surgen de esta subpoblación. Las terminaciones de las células ciliadas externas son casi todos de los axones eferentes que se derivan de las células cerebrales y estas células funcionan como pre-amplificadores acústicos. Las células de soporte cumplen 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 ciliadas y de soporte se desarrollan a partir de un progenitor común y la aparición de una célula ciliada señala las células circundantes para convertirse en células de soporte a través de la inhibición del contacto mediado por la vía de señalización Notch (Kelley, Nat Rev Neurosci, 2006, (11): 837-849.

Sobre la base de la capacidad de las células de soporte de transdiferenciarse en células ciliadas auditivas, junto con su vía de desarrollo compartida, se ha postulado que las células de soporte pueden funcionar como progenitores de las

células ciliadas (Parker et al, Audiology and Neurootology, 2004, (9(2)): 72-80). Varios estudios han demostrado que evitar la inhibición del ciclo celular en las células de soporte puede producir la generación de células ciliadas auditivas en los mamíferos (Lowenheim et al, Proc Natl Acad Sci USA, 1999, (96): 4084-4088; Torchinsky et al, J Neurocytol, 1999, (28(10-11)): 913-924; Minoda et al, Hear Res, 2007, (232): 44-51). Por lo tanto las células de soporte de los mamíferos adultos mantienen la capacidad de transdiferenciarse en las células ciliadas auditivas una vez que están libres para entrar en el ciclo celular.

La terapia con medicamentos para la restauración de las células ciliadas auditivas es un nuevo enfoque y la administración intratimpánica en el fluido del oído medio, con preferencia en el nicho de la ventana redonda, sin inyección real en la cóclea puede inducir eficazmente la expresión Atoh1 a una dosis terapéutica y durante un periodo de tiempo adecuado para causar la transdiferenciación de células ciliadas auditivas de las células de soporte de la cóclea. Mizutari et al, Neuron, 2013, (77(1)): 58-69 mostraron que la administración en el oído medio de un inhibidor de gamma secretasa (LY411575) se puede emplear para regenerar las células ciliadas auditivas perdidas en el trauma acústico en ratones y que esta generación de nuevas células ciliadas a partir de las células de soporte constituye una notable y medible recuperación de la audición. Este trabajo proporciona evidencia conceptual de un efecto terapéutico de la inhibición de la vía de señalización 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 apoya la diferenciación celular a las células ciliadas auditivas) para el efecto fisiológico. La toxicidad limitante de dosis se demostró durante la administración sistémica de LY411575.

Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran la actividad inhibidora de la vía de señalización Notch y la eficacia de los Compuestos 1 y 2, o un diastereómero sustancialmente puro de estos, contra una línea celular de cáncer específico. Estos ensayos son reconocidos generalmente por los expertos en la técnica como indicativos de actividad quimioterapéutica clínica en humanos. Se considera que la inhibición de la escisión de Notch dominio intracelular por γ -secretasa es eficaz contra cada uno de receptores Notch 1, Notch 2, Notch 3 y Notch 4. Los ensayos que evidencian la actividad y la eficacia inhibidora de la vía de señalización de Notch pueden llevarse a cabo sustancialmente de la siguiente manera o por ensayos similares que proporcionen datos similares.

Ensayo de imágenes de acumulación nuclear Notch1 N1ICD

Las células HEK293ΔE12 (células HEK293 se han manipulado genéticamente para expresar de forma estable el ADNc de Notch1 de ratón que codifica el aminoácido 1703-2183, NP_032740.3, (precursor de proteína Notch 1 de ratón de longitud completa: SEQ ID NO: 1) con la secuencia de péptido señal de 23 aminoácidos, MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR (SEQ ID NO: 2), en su extremo N-terminal) se siembran a razón de 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, incubadas en Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) rico en glucosa con 5% suero bovino fetal (FBS) a 37 °C, 5% de CO₂ durante 24 horas. Las células se tratan con compuesto de ensayo, la dosificación en 10 puntos de diluciones 1: 3 en el rango de 1000 nM a 0,05 nM, y con concentración final de sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 0,2%. Después de 24 horas de tratamiento, las placas de las células se procesan a través siguientes pasos secuenciales: se fijan las células con 100 µl/pocillo de fijador PREFER™ durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT); se permeabilizan las células con 100 µl/pocillo de TRITON® X100 0,1% en solución salina amortizada con fosfato (PBS) durante 20 min a RT; se lavan 3 veces con 100 µl/pocillo de PBS cada uno; se añade 50 µl de anticuerpo anti-N1ICD (dominio intracelular de Notch1) de conejo, a 1: 2000 en PBS con 1% de albúmina sérica bovina e incubar 1,5 horas a 37 ° C; se lava 3 veces con 100 µl/pocillo de PBS cada una; se incuba con 50 µl/pocillo de IgG anti-conejo de cabra (Inmunoglobulina G) Alexa 488 en dilución 1:1000 en PBS con albúmina sérica bovina 1% y se incuban 1 hora a 37 ° C; se lavan 3 veces con 100 µl/pocillo de PBS y se añade 100 µl/pocillo de yoduro de propidio 15 µM con 50 µg/ml de ARNasa durante 30 minutos para teñir los núcleos. Las placas se escanean con citómetro de microplaca de fluorescencia por barrido láser ACUMEN EXPLORER™ (TTP LABTECH LTD) para medir el recuento nuclear/pocillo células total y el área nuclear total/pocillo con fluorescencia a 655 nm-705 nm (emisión de yoduro de propidio unido a ADN) y fluorescencia de unión al anticuerpo en N1ICD en la región nuclear de 505 nm-530 nm. El principal resultado del ensayo es una relación de la fluorescencia total de N1ICD nuclear con el área nuclear total, la señal N1ICD nuclear normalizada. Se recolectó un perfil de citotoxicidad relativa como el % de número de células de las células con control DMSO 0,2%. El anticuerpo que reconoce Notch1 escindido o N1ICD se origina de un péptido humano correspondiente al sitio de escisión de amino terminal de Notch1 humana en Val1744. En las células de control no tratadas, el N1ICD generado a partir de Notch1 se traslocará y acumulará en el núcleo. Cuando las células son tratadas con un compuesto que inhibe la escisión de

Notch 1, la señal de N1ICD nuclear disminuirá. La respuesta de la concentración y la IC_{50} se determinan mediante el ajuste de una curva de cuatro parámetros logísticos para la señal de N1ICD nuclear, mientras que el número de % de célula se representa gráficamente en el mismo gráfico para el perfil de citotoxicidad. Realizando el ensayo esencialmente como se describió anteriormente, la IC_{50} 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). Ningún compuesto afecta el número de células hasta la concentración de 1000 nM. Estos datos evidencian que el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 cada uno 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 en efecto in vivo del Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 en la inhibición de la farmacodinámica de procesamiento de Notch (PD), se llevaron a cabo estudios en ratones Balb/C no portadores de tumor (Charles River). Un total de 5 ratones se usan para cada grupo. Los ratones se alimentan *ad libitum* con dieta normal. El tratamiento se inicia con la administración oral (cebadura) de compuesto o vehículo (Na-CMC 1% en Tween-80 0,25%) en 0,2 ml de volumen. En los puntos de tiempo designados (4 u 8 horas después de la dosis) después del tratamiento, los animales se sacrifican por asfixia con CO_2 y dislocación cervical. Se extraen los tejidos (pulmones) y se usan para el análisis de la respuesta PD medida por N1ICD escindido.

Análisis N1ICD

Para evaluar los niveles de N1ICD en el pulmón, se corta aproximadamente 75 mg de tejido congelado y picado antes de la homogeneización (masa real registrada). Las muestras tumorales congeladas se transfirieron a los tubos de lisis Matrix-D™ y se resuspendieron en amortiguador de lisis XY enfriado en hielo (Tris 25 mM pH 7,5, inhibidor tripsina/quimotripsina 10 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, Beta-glicerol fosfato 60 mM, Triton® X-100 1%, NaF 10 mM, pirofosfato 2.5 mM, NaCl 150 mM, ácido etilendiamina tetraacético 15 mM (EDTA) pH 8,0, ácido etilenglicol-bis (2-aminoetiléter) -N,N, N',N'-tetraacético 5 mM (EGTA) pH 8,0, Na vanadato 1 mM, leupeptina 10 µg/ml, ditiotreitól 1 mM, microcistina LR 10 µM, Np-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona 10 µg/ml (TPCK), clorhidrato de Nα-p-tosil-L-arginina metil éster 2 mM (TAME), sal

di(tris) fosfato de 4-nitrofenilo 15 mM (PNPP), fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo clorhidrato 0,1 mM (AEBSF), benzamidina 5 mM, ácido ocladaico 1 μ M) que contiene el comprimido 1X Completo (Roche Complete™ No. 11697 498 001) y cóctel inhibidor de proteasa 1X (Sigma-Aldrich P8340) a una relación de masa:volumen de amortiguador 75 mg/ml. 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 para un total de 2-3 ciclos hasta que la homogeneización está completa. Los lisados se centrifugan en una centrifuga Eppendorf 4 °C a 30000 rpm durante 15 minutos para eliminar los residuos. Se extraen 400 μ l 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 4 °C a 30000 rpm durante 30 minutos y se recolectan 120 μ l de sobrenadante para el análisis. La concentración total de proteína se determina mediante un kit de ensayo Pierce BCA Protein™ (Thermo Scientific, Rockford, IL) usando un lector de placas Thermomax™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los niveles de N1ICD se determinan utilizando un ELISA N1ICD adaptado. El analito es capturado con un anticuerpo monoclonal de conejo adaptado específico de Notch1 (Val1744) escindido y se detecta con un anticuerpo policlonal de oveja (R & D Systems, Minneapolis, MN) C-terminal Notch1 SULFO-TAG™ (Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Maryland). Los lisados se diluyen a 2 μ g/ μ l en amortiguador de lisis Tris ELISA s enfriado en hielo (R6OTX) (Meso Escala de Discovery, Gaithersburg, Maryland) que contenía comprimido completo 1X (Roche Complete™ mini No. 11 836 153 001) y cóctel inhibidor de la proteasa 1X (Sigma-Aldrich P8340), y se añaden 25 μ l a la placa de ELISA. La incubación de 50 μ g de lisado de proteínas se lleva a cabo a RT durante una hora cada uno para capturar analito y con el anticuerpo de detección. Las placas se leen en un Imager Sector 6000™ (Meso Escala de Discovery, Gaithersburg, Maryland). El N1ICD con sustracción del fondo se normaliza a la proteína total y presenta como % de inhibición con respecto al grupo tratado con vehículo. El % de inhibición N1ICD y la significación estadística (valor p) tal como se mide por el método de Dunett en tumores recolectados 4 horas después de la última dosis para el Compuesto 1, Isómero 2 o Compuesto 2, Isómero 2 se analizan esencialmente como se describió anteriormente y se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1.

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

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

Inducción de la expresión de mAtoh1 en las esferas óticas

En general, el aislamiento de células del órgano de Corti se lleva a cabo en el Día 0, en gran medida por el método en Oshima et al., Methods Mol Biol., 2009; 493: 141–162. El cultivo y la propagación de células se llevan a cabo durante 3-4 días. La siembra celular y el tratamiento con el compuesto de ensayo se llevan a cabo en el día 3 o 4. Se deja que la unión y diferenciación se produzcan durante los siguientes 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 en el Día 12 y los resultados se analizan en los Días 13-15 para la expresión Atoh1 y Tbp1.

Aislamiento de células

El tejido circundante de la porción petrosa del hueso temporal se extrae de los ratones 1 a 4 días después del parto (cepa transgénica: nGFP dirigido por mAtoh1; Lumpkin EA, et al., Gene Expr Patterns, 2003; (36): 389-95 de ambos sexos. La cóclea en forma de caracola se separa del sistema vestibular con unas pinzas. En esta etapa de desarrollo, el laberinto óseo no está completamente calcificado y se disecciona fácilmente usando pinzas. Se abre con cuidado el laberinto óseo de la cóclea y se retira el ligamento espiral y el órgano de Corti unido en espiral juntos a lo largo de la espiral del modiollo desenrollándose en forma apical desde el modiollo. A partir de la base, se separa el ligamento espiral desde el órgano de Corti utilizando pinzas finas.

Se transfiere el órgano de Corti diseccionado (OC) en tubos de individuales de 1,5 ml llenos con 850 µl de HBSS enfriado en hielo. Se transfieren hasta 12 tejidos OC en el mismo tubo. Los tejidos OC se someten a centrifugación rápida y se extraen el HBSS. Se disocian las células mediante la adición de 100 µl de TrypLE™ Select precalentado (LifeTechnologies) y se incuban a 37 °C durante 13 minutos. Los tejidos OC disociados se centrifugan rápido. Se extrae el TrypLE™ Select. Se añaden 100 µl de medio A (DMEM/F12, suplemento N2 (LifeTechnologies), suplemento 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 extraen todos los agregados de células y los desechos; se transfiere la suspensión de células y se lava a través de un filtro de células de 70 µm prehumedecido para mezclar la suspensión de células en un tubo de cultivo fresco único. Se lavan los tubos de disociación y el filtro de células con suficiente medio A y la mezcla con la suspensión celular. Se cuenta la densidad de células con un hemocitómetro o Countess® (LifeTechnologies). Se añade medio fresco A a la suspensión de células para alcanzar una densidad de siembra final de 1,0E5 células/ml y se siembra en recipientes de cultivo de unión ultrabaja, T-75 (Greiner).

Cultivo en la suspensión para propagar las esferas OC

Las células únicas disociadas se cultivan en un recipiente de cultivo de unión ultrabaja, (Greiner) en el Medio A durante 3 a 4 días en una incubadora humidificada de CO₂ 5% a 37°C para obtener las esferas cultivadas clonalmente, denominadas esferas de primera generación, a partir de las células flotantes. Si las células se adhieren a las placas no adherentes durante el período de cultivo se pueden desalojar por mezcla suave.

Cultivo y tratamiento de unión

Después de cultivar las esferas durante 3-4 días, se cuentan visualmente las esferas por microscopio para estandarizar la densidad de siembra de esferas ópticas por ml para este paso. Se recolectan las células por centrifugación y se resuspenden 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 de una placa de 96 pocillos tratada con cultivo celular para obtener aproximadamente 300 esferas por pocillo. Las esferas se tratan con agentes experimentales por cuadruplicado a un

volumen final de 200 μ l en medio básico (DMEM/F12, suplemento N2 (LifeTechnologies) suplemento B27 (LifeTechnologies), ampicilina (50 μ g/ml) y Fungizone (LifeTechnologies). Se cultivan las esferas tratadas durante 7 días en una incubadora de temperatura controlada humidificada a CO₂ 5%, 37 ° C. Se retira el medio y procede a la extracción del ARN.

Extracción de ARN

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

Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realiza usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript® III (LifeTechnologies, catálogo 18080-051) siguiendo el protocolo del fabricante que usa hexámeros aleatorios para la síntesis de ADNc. Se diluye ADNc 50% mediante la adición de 21 μ l de agua ultrapura libre de nucleasa. Se usan 5 μ l de ADNc diluido para la qPCR.

qPCR

Para cuantificar la expresión de los marcadores de células ciliadas de los cultivos de esfera tratados, se lleva a cabo la qPCR con sondas para detectar un gen de interés *mAtoh1* y un gen endógeno de control en una reacción múltiplex de dos colores simple. La mezcla maestra de expresión del gen TaqMan (LifeTechnologies, 4369016) y una sonda de interés (*Atoh1*; Mm00476035_s1 y una sonda de control endógeno (*Tbp1*; Mm00446971_m1, LifeTechnologies) se utiliza 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 método $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas. Los experimentos se realizan por triplicado, como mínimo, y se presenta como una media grande.

Tabla 2

Compuesto	RQ a 10 nM	RQ a 100 nM	RQ a 1 μ M
1, Isómero 2	1,43 $\pm$ 0,17[*]	1,76 $\pm$ 0,17[*]	1,64 $\pm$ 0,13[*]
2, Isómero 2	1,14 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,13	1,57 $\pm$ 0,11[*]

Los datos de la Tabla 2 muestran los valores de cuantificación relativa (RQ) de expresión Atoh1, un marcador de la generación de las células ciliadas, en las esferas óticas tratadas con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 en tres concentraciones (10 nM, 100 nM y 1 μ M). Los datos ($\pm$ error estándar de la media, SEM) representan el nivel de inducción de la expresión génica con relación a las muestras tratadas con control negativo (vehículo DMSO) (*, diferencia significativa del control negativo, $p < 0,05$).

Inducción de la expresión hAtoh1 en líneas celulares tumorales humanas

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

Generalmente, se utilizan técnicas de cultivo celular estándar. La línea celular de adenocarcinoma colorrectal humano de pasaje bajo (ATCC CL-188) mantenido en el medio de cultivo (MEM FBS 10%) se siembra a razón de 10.000 células en 100 μ l de medio de ensayo (MEM FBS 1%) por pocillo en placas tratadas con cultivo de tejidos de 96 pocillos.

El día siguiente, se llevaron a cabo diluciones seriadas semilogarítmicas de compuestos de ensayo patrón 10 mM (diluido en DMSO 100%) para obtener once dosis decrecientes del compuesto del fármaco. Las concentraciones finales abarcan 10 μ M a 0,127 nM. Se utiliza una dilución seriada 3,16 veces, con concentraciones de DMSO en cada pocillo de 100%. Una dilución 1:10 adicional de la dilución de DMSO inicial se lleva a cabo en el medio de ensayo. Nuevamente se realiza otra dilución de 1:100 en el medio de ensayo.

Se añaden 100 μ l de las diluciones del compuesto de ensayo a cada pocillo que contienen células y medio de cultivo y se cultivan durante 72 horas a 37 °C en CO₂ 5%.

Las células se recolectan de las placas en el día 4, y el ARN se extrae y purifica usando RNeasy® Plus 96 ARN (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante.

La síntesis de ADNc se realiza usando el sistema de síntesis de primera cadena Superscript® III (LifeTechnologies, catálogo 18080-051) siguiendo el protocolo del fabricante que usa hexámeros aleatorios para la síntesis de ADNc. El ADNc se

diluye 50% mediante la adición de 21 µl de agua ultrapura libre de nucleasa. Se usan 5 µl de ADNc diluido para la qPCR.

qPCR

Para cuantificar la expresión de los marcadores de células ciliadas de los cultivos de esfera tratados, se lleva a cabo qPCR con sondas para detectar la expresión de hAtoh1 o TBP en una a reacción multiplex de dos colores simple. Para medir la expresión del gen relativa para cada muestra, se usa la mezcla maestra de la expresión del gen TaqMan (LifeTechnologies, 4369016) y una sonda de interés (Atoh1 humana; LifeTechnologies Ensayo Id Hs00944192_s1) más una sonda de control endógeno (Tbp humana; LifeTechnologies Ensayo Id Hs00427620_m1) 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 analizan mediante el método $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas.

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

Tabla 3

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

Los datos de la Tabla 3 muestran los valores de IC_{50} del Compuesto 1, Isómero 2 y Compuesto 2, Isómero 2 calculado por 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 explante del órgano de Corti

En general, el cultivo del explante organotípico del órgano de Corti se lleva a cabo en el día 0 de acuerdo con el método descrito en Parker et al., Journal of Visualized Experiments, 2010, (36), e1685. El cultivo del explante 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 del tejido para inmunohistoquímica.

Aislamiento y cultivo de explante del órgano de Corti

La bulla y el tejido circundante de la porción petrosa del hueso temporal se extraen de ratones 1- 4 días después del parto (cepa transgénica: nGFP dirigida por *Atoh1*; Lumpkin EA, et al., Gene Expr Patterns, 2003; (36): 389-95 de ambos sexos. Los órganos de Corti se diseccionan en solución de Hanks, 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 pocillo único de una placa de 24 pocillos (Falcon) y se cultiva en DMEM (Invitrogen) con suero bovino fetal 5%, suero de caballo 5%, y penicilina-estreptomicina (LifeTechnologies). Los compuestos experimentales se añaden con el medio en el Día 0 y se reemplazan cada 2-3 días. Todos los cultivos se mantienen en una incubadora humidificada CO₂ de 5% a 37 °C.

Análisis de la expresión génica por qRT-PCR

La extracción de ARN se lleva a cabo mediante la lisis del tejido de explante con 350 µl de amortiguador RLT Plus (Qiagen) por pocillo, y el ARN total se purifica por RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen). La síntesis de ADNc se lleva a cabo con el sistema de síntesis de primera cadena SuperScript® III (LifeTechnologies) usando hexámeros aleatorios. Para cuantificar la inducción de la expresión del marcador de células ciliadas, la qPCR se lleva a cabo con la mezcla maestra de la expresión génica TaqMan (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 endógeno de control, *Tbp* (Ensayo ID Mm00446971_m1, LifeTechnologies). La expresión génica relativa entre los grupos de tratamiento se analiza mediante el método $\Delta\Delta C_T$ y se promedian las mediciones repetidas. Los experimentos se realizaron por triplicado, como mínimo, y se presenta como una media grande.

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 de la Tabla 4 muestran los valores de cuantificación relativos (RQ)

de expresión de los marcadores de la generación de células ciliadas, *Atoh1*, *Pou4f3*, y *Myo7a*, en los explantes del órgano de Corti tratados con el Compuesto 1, Isómero 2 y Compuesto 2, Isómero 2 a 1 μM . Los datos ($\pm$ SEM) representan el nivel de inducción en la expresión génica relativa a las muestras tratadas con el control negativo

Inmunotinción de nuevas células ciliadas que expresan New Atoh1

Después del cultivo de explantes, los tejidos se fijan en la placa de 24 pocillos con 200 μl Cytofix/Cytoperm (BD) durante 30 minutos, se lavan con PBS que contiene TritonX100 (PBST), y se tiñen con 200 μl de solución de anticuerpo primario, que consiste en suero de burro normal 4% en PBST con anti-GFP de cabra (1:2500; AbCAM, ab5450) y anti-myosinVIIA de conejo (1:1000; Proteus Bioscience # 25-6790) durante 1 hora. Los tejidos luego se lavan completamente con PBST y se tiñen con una solución de anticuerpo secundario, que consiste en IgG anti-cabra de burro Alexa Fluor 488 (1: 1000; Invitrogen, A-11055) e IgG anti-conejo de burro Alexa Fluor 568 (1: 1000; Invitrogen, A10042) durante 1 hora. Luego se lavan por completo con PBST y se montan en portaobjetos de microscopio. Las células ciliadas individuales se identifican por la expresión del marcador GFP sustituto Atoh1 (verde) y miosina VIIa (rojo), se examinan por imágenes, y luego se cuentan dentro de una longitud 100 μM , en la región media del ápice, con el fin de examinar la formación de las células ciliadas nacientes en muestras experimentales, tratadas con el compuesto en contraste con el número de células ciliadas muestras no tratadas o tratadas con control negativo (compuesto inactivo biológico). Los recuentos de células cegadas se miden en cinco experimentos separados.

Tabla 5

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

Los datos de la Tabla 5 muestran el número de células ciliadas externas en los explantes del órgano de Corti cultivadas durante cuatro días en presencia del Compuesto 1, Isómero 2 (n = 13) o Compuesto 2, Isómero 2 (n = 15) a 1 μM , e inmunoteñidas para GFP (un marcador de Atoh1 sustituto) y miosina VIIa. El porcentaje de aumento en las células ciliadas está en relación con las muestras tratadas con control negativo (n = 18).

Análisis de la expresión génica después del daño ototóxico

Una variación del cultivo de explantes organotípicos del órgano de Corti se utiliza para modelar la regeneración de células ciliadas en respuesta al tratamiento con el compuesto posterior después del daño ototóxicos. Este modelo de daño se lleva a cabo de acuerdo con el método descrito en Korrapati et al., *PLOSOne*, 2013, 8(8), e73276 donde se informó de una reducción del 95% en las células ciliadas de la mitad apical. En el Día 0, para dañar y selectivamente matar las células ciliadas dentro del explante del órgano de Corti, se añade el tratamiento con aminoglucósido (gentamicina (100 μ M)) durante 18-24 horas. En el Día 1, se retira la gentamicina y se comienza el tratamiento con el Compuesto 1, Isómero 2 y el Compuesto 2, Isómero 2 a 5 μ M. El cultivo de explantes continúa durante 4 días totales, momento en el cual se prepara el cultivo para el protocolo de qRT-PCR descrito anteriormente. La confirmación visible de daño inducido por la 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 obtenida por qRT-PCR mide los aumentos en la expresión génica para los marcadores de células ciliadas prosensoriales Atoh1 y Pou4f3 y el marcador de las células ciliadas Myo7A.

Tabla 6

	% Inducción sobre el órgano de Corti dañado tratado con control (Media $\pm$ SEM; valor p) n = 11		
Compuesto (5μM)	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 significativo

Los datos de la Tabla 6 muestran aumentos relativos en la expresión génica mediante qRT-PCR de los marcadores de generación de las 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 de las células ciliadas inducido por gentamicina. (*, diferencia significativa del control negativo, p <0,05)

Inducción del marcador de células ciliadas en cultivo de cápsula ótica entera

La cápsula ótica (explante de la cápsula ótica), compuesta de los sistemas laberínticos y vestibulares óseos cocleares, se disecciona de ratones 1 a 4 días después del parto (cepa transgénica: nGFP dirigido por Atoh 1; Lumpkin EA, et al.,

Gene Expr. Patterns, 2003, 3(4): 389-95) de ambos sexos generalmente de acuerdo con el método descrito en Parker et al., Journal of Visualized Experiments, 2010, (36), e1685. La cápsula ótica entera se aísla del hueso parietal y mantiene *ex-vivo* en un sistema de cultivo de tubos rotativos durante hasta 3 días en medio que contiene DMEM, alta glucosa, FBS 5%, suero de caballo 5%, ampicilina 1 µg/ml.

El explante de la cápsula ótica se utiliza para evaluar el compuesto de ensayo, en varios vehículos de administración, la 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. Volúmenes pequeños (100-200 nl) se aplican directamente en el nicho de ventana redonda de la cóclea. La cóclea se diseca, se trata y se incuba durante 1-2 horas, y luego se coloca en cultivos rotativos. Después de 48 horas, el explante de la cápsula ótica se abre para quitar el órgano de Corti del laberinto óseo de la cóclea y se analiza por RT-PCR.

La composición se deja permanecer durante 1-2 horas, luego se retira por lavado con el medio de cultivo. El explante de la cápsula ótica luego se cultiva durante 48 horas en medio sin tratar. La cóclea se rompe y luego se diseca el órgano de Corti entero y se prepara para RT-PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión del marcador de las células ciliadas *Atoh1* (como se describe en el ensayo del explante del órgano de Corti, anteriormente). La Tabla 7 muestra la inducción de *Atoh1* en el vehículo de administración especificado. La regulación por aumento de *Atoh1* por el Compuesto 1, Isómero 2, en todas las composiciones analizadas (2-3 veces, n de 12-17) se mide en comparación con los explantes de cápsula ótica tratados con control solo vehículo después de 48 horas en cultivo.

Tabla 7: Expresión del gen *Atoh1* (RT-PCR)

	45-70% PEG (Polietilenglicol 400)	10% Polóxamero (Pluronic® F108)	20% Polóxamero (Pluronic® F108)	1-2% Ácido hialurónico
Estado líquido	Líquido viscoso	Líquido viscoso	Gel	Gel
Solubilidad del compuesto de prueba	Solución transparente	Suspensión	Suspensión	Suspensión
Nivel de inducción medio	2,933	2,398	2,612	2,459
SEM	0,3193	0,2653	0,4441	0,2567
Valor P	<0,0001	0,0002	0,0019	0,0001

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

Cobayos Hartley albinos hembra (Charles River, Francia) se anestesian con

una mezcla de ketamina/xilazina antes de 70 μ l del Compuesto 1, Isómero 2, en composiciones como se describió anteriormente para el ensayo de cultivo de la cápsula ótica entera, se inyectan por vía transtimpánica para llenar completamente el oído medio. Las muestras de perilinfa (fluido 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 las concentraciones de compuesto de ensayo. La Tabla 8 muestra que el compuesto de ensayo es captado en el oído interno después de la administración transtimpánica al oído medio con estos vehículos de administración.

Tabla 8: Niveles de perilinfa *IN VIVO*

	70% PEG (Polietilenglicol 400)	10% Polóxamero (Pluronic® F108)	20% Polóxamero (Pluronic® F108)	1-2% Ácido hialurónico
C_{max} (μM) $\pm$ SEM	327,1 $\pm$ 93	753,0 $\pm$ 306	1926,2 $\pm$ 493	187,3 $\pm$ 113
Tiempo C_{max}	1 hr	30 min	30 min	1 hr
% Compuesto de prueba aplicado en perilinfa	1,04	2,39	6,11	0,59
R cuadrado	0,5262	0,7640	0,5600	0,4229
AUC (μmol.hr.L⁻¹)	1451	7002	8634	2711

Secuencias de aminoácidos

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

MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLRCSQPSGTCLNGGRCEVANGTEACVCSGAFVGGQRC
 QDSNPCLSTPCKNAGTCHVVDHGGTVDYACSCPLGFSGPLCLTPLDNACLANPCRN
 GGTCDLLTLTEYKCRCPPGWSGKSCQQADPCASNPCANGGQCLPFESSYICRCPG
 FHGPTCRQDVNECSQNPGLCRHGGTCHNEIGSYRCACRATHTGPHCELPYVPCSPS
 PCQNGGTCRPTGDTTTHEACLPGFAGQNCEENVDDCPGNNCKNGGACVDGVNTY
 NCRCPPEWTGQYCTEDVDECQLMPNACQNGGTCHNTHGGYNCVCVNGWTGEDCS
 ENIDDCASAACFQGATCHDRVASFYCECPHGRTGLLCHLNDACISNPCNEGSNCDTN
 PVNGKAICTCPSGYTGPACSQDVDECALGANPCEHAGKCLNTLGSFECQCLQGYTG
 PRCEIDVNECISNPCQNDATCLDQIGEFQCICMPGYEGVYCEINTDECASSPCLHNGH
 CMDKINEFQCQCPKGFNGHLCQYDVDECASTPCKNGAKCLDGPNTYTCVCTEGYTG
 THCEVDIDECDPDPCHYGSKDGVATFTCLCQPGYTGHHCETNINECHSQPCRHHG
 TCQDRDNSILCLCLKGTTGPNCEINLDDCASNPCDSGTCLDKIDGYECACEPGYTGS
 MCNVNIDECAGSPCHNGGTCEGDIAGFTCRCPEGYHDPTCLSEVNECNSNPCIHGA
 CRDGLNGYKDCAPGWSGTNCDINNECESNPCVNNGGTCKDMTSGYVCTCREGFS
 GPNCQTNINECASNPCLNQGTCIDDVAGYKCNCLPYTGATCEVVLAPCATSPCKNS
 GVCKESEDYESFSCVCPTGWQGGTCEVDINECVKSPCRHGASCQNTNGSYRCLCQ
 AGYTGRNCESDIDDCRPNPCHNGGSCDTGINTAFCDCLPGFQGAFCEEDINECASNP
 CQNGANCTDCVDSYTCTCPVGFNGIHCENNTPDCTESSCFNGGTCVDGINSFTCLCP
 PGFTGSYCQYDVNECDSRPCLHGGTCQDSYGYTKCTCPQGYTGLNCQNLVRWCDS
 APCKNGGRCWQTNTQYHCECRSGWTGVNCDVLSVSCEVAAQKRGIDVTLLCQHGG
 LCVDEGDKHYCHCQAGYTGSYCEDEVDECSPNPCQNGATCTDILGGFSCKCVAGYH
 GSNCSEEINECLSQPCQNGGTCLDLSYKCS CPRGTQGVHCEINVDDCHPPLDPAS
 RSPKCFNNGTCVDQVGGYTCTCPPGFVGERCEGDVNECLSNPCDPRGTQNCVQRV
 NDFHCECRAGHTGRRCESVINGCRGKPCKNGGVCAVASNTARGFICRCPAGFEGAT
 CENDARTCGSLRCLNGGTCISGPRSPTCLCLGSFTGPECQFPASSPCVGSNPCYNQ
 GTCEPTSENPFYRCLCPAKFNGLLCHILDYSFTGGAGRDIPPPQIEEACELPECQVDA
 GNKVCNLQCNNHACGWDGGDCSLNFNDPWKNCTQSLQCWKYFSDGHCDQGCNSAECEWDGLDCAEHVPE
 RLAAGTLVLVLLPPDQLRNNSFHFLRELSHVLHTNVVFKRDAQGGQMIFPYYGHEEE
 LRKHPIKRSTVGWATSSLLPGTSGGRQRRELDPMDIRGSIVILEIDNRQCVQSSSQCF
 QSATDVAAFLGALASLGS LNIPYKIEAVKSEPVEPPLPSQLHLMYAAAAFVLLFFVGC
 GVLLSRKRRRQHGQLWFPEGFKVSEASKKKRREPLGEDSVGLKPLKNASDGALMDD

X-20729

NQNEWGDEDLETKKFRFEPPVLPDLSDQTDHRQWTQQHLDAADLRMSAMAPTPP
QGEVDADCMDVNVVRGPDGFTPLMIASCSGGGLETGNSEEEEDAPAVISDFIYQGASL
HNQTDRTGETALHLAARYSRSDAAKRLLEASADANIQDNMGRTPLHAAVSADAQGVF
QILLRNRATDL DARMHDGTTPLILAAARLAVEGMLEDLINSHADVNAVDDL GKSALHWA
AAVNNVDAAVVLLKNGANKDMQNNKEETPLFLAAREGSYETAKVLLDHFANRDITDH
MDRLPRDIAQERMHHDIVRLLDEYNLVRSPQLHGTALGGTPTLSPTLCSPNGILGNLK
SATQGKKARKPSTKGLACGSKEAKDLKARRKKSQDGKGCLLDSSSMLSPVDSLESP
HGILSDVASPPLLSPFQQSPSMPLSHLPGMPDTHLGISHLNVAAKPEMAALAGGSRL
AFEPPPPRLSHLPVASSASTVLSTNGTGAMNFTVGAPASLNGQCEWLPRLQNGMVP
SQYNPLRPGVTPGTLSTQAAGLQHSMMPHSSSLSTNTLSPIIYQGLPNTRLATQPHL
VQTQQVQPQNLQLQPQNLQPPSQPHLSVSSAANGHLGRSFLSGEPSQADVQPLGPS
SLPVHTILPQESQALPTSLPSSMVPPMTTQFLTPPSQHSYSSSPVDNTPSHQLQVPE
HPFLTPSPESPDQWSSSSPHSNISDWSEGISSPPTTMPSQITHIPEAFK

SEQ ID NO:2 (péptido señal)

MPRLLTPLLCLTLLPALAARGLR