

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 064**

51 Int. Cl.:

**C07D 333/24** (2006.01)

**A61K 31/381** (2006.01)

**A61P 27/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2018 PCT/EP2018/054820**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2018 WO18158256**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2018 E 18707374 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3484863**

54 Título: **Amidas cíclicas como abridores de canales de potasio**

30 Prioridad:

**28.02.2017 EP 17158326**

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

**22.03.2021**

73 Titular/es:

**ACOUSIA THERAPEUTICS GMBH (100.0%)  
Sindelfinger Strasse 3  
72070 Tübingen, DE**

72 Inventor/es:

**BÖS, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 813 064 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Amidas cíclicas como abridores de canales de potasio

5 [0001] La presente invención se refiere a compuestos novedosos que son útiles como abridores de canales de potasio, en particular como abridores del canal de potasio Kv7.4. La presente invención también se refiere a medicamentos y composiciones farmacéuticas que comprenden estos compuestos y a su uso en medicina humana y medicina veterinaria.

10 [0002] Se estima que aproximadamente un 10% de la población de las naciones industrializadas está afectada por problemas de audición. La gran mayoría de estos casos se puede atribuir a una denominada pérdida de audición neurosensorial que está caracterizada inicialmente por una pérdida de audición de altas frecuencias que afecta a la capacidad para oír y entender el habla. Esta pérdida de audición neurosensorial o sordera neurosensorial resulta principalmente del daño de las células del oído interno conocidas como células "ciliadas". Estas células sensoriales altamente complejas detectan las vibraciones sonoras que pasan desde el exterior, a través del tímpano y los huesos del oído medio, hasta la cóclea. Estas células ciliadas sensoriales están localizadas en el denominado órgano de Corti.

15 [0003] Los mamíferos están provistos de dos tipos bastante diferentes de células ciliadas, en concreto, las células ciliadas internas (CCI) y las células ciliadas externas (CCE). Las CCI son las verdaderas células receptoras de la audición, conectadas a los nervios aferentes, mientras que las CCE sirven para preamplificar mecánicamente las vibraciones sonoras que alcanzan el oído interno. Este proceso, la "amplificación coclear", es crucial para la sensibilidad y la resolución de altas frecuencias de la audición de los mamíferos. Como consecuencia, muchos casos de pérdida de audición tienen su origen en una disfunción o una pérdida de CCE.

20 [0004] En este contexto, se sabe que, como en otras partes del cuerpo de los mamíferos, los canales de potasio juegan un papel importante para la función normal de las células, aquí de las CCE. Una vía principal para la salida de K<sup>+</sup> de las células ciliadas externas está representada por el canal de potasio Kv7.4. Este canal está muy expresado en las células ciliadas externas (CCE) sensoriales en el órgano de Corti. Este hecho, junto con otros resultados de investigación, sugiere que los canales de potasio, y en particular el Kv7.4, es una diana prometedora para la profilaxis y el tratamiento de la pérdida de audición.

25

[0005] En la actualidad, normalmente la pérdida de audición tiene que tratarse con audífonos, que amplifican el sonido a frecuencias predeterminadas para superar una pérdida de audición en ese rango. En otro enfoque, la pérdida de audición tiene que tratarse con implantes cocleares que estimulan los nervios cocleares directamente.

30 [0006] Como se ha mencionado anteriormente, los canales de potasio se encuentran en la mayoría de los tipos celulares y controlan una amplia variedad de funciones celulares. Por lo tanto, los compuestos que son abridores de canales de potasio pueden ser importantes para la profilaxis o el tratamiento de una amplia variedad de trastornos. En este contexto, se considera que el canal de potasio Kv7.4, como se ha mencionado anteriormente, juega un papel crítico en la regulación de la excitabilidad neuronal.

35 [0007] Se considera que los trastornos asociados a una actividad aberrante de los canales de potasio son trastornos neurodegenerativos con varios orígenes, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y otros. Son trastornos adicionales las condiciones neurológicas tales como la epilepsia o los trastornos cognitivos y psiquiátricos como la depresión, la manía y la esquizofrenia.

[0008] Otros trastornos importantes son varios tipos de dolor, en concreto, el dolor neuropático, el dolor crónico, el dolor agudo, y las cefaleas tales como la migraña y similares.

40 [0009] Hay también indicaciones de que otros trastornos pueden ser una diana de compuestos que tienen la función de un abridor de canales de potasio. Por ejemplo, se especula que una activación del canal de potasio Kv7.4 puede ser útil en la cardioprotección.

45 [0010] El documento Calderone V. et al., "Heterocyclic analogs of benzanilide derivatives as potassium channel activators. IX", Eur. J. Med. Chem. 2006, 41, 6, 761-767, divulga amidas tales como anilidas y benzamidas como compuestos que abren canales de potasio BK, que juegan un papel en la regulación del tono de las células de los músculos lisos.

[0011] El documento Haibu Yu et al., "Discovery, Synthesis, and Structure Activity Relationship of a Series of N-Aryl-bicyclo[2.2.1]heptane-2-carboxamides: Characterization of ML213 as a Novel KCNQ2 and KCNQ4 Potassium Channel Opener", ACS Chem. Neurosci. 2011, 2, 572-577, se refiere a N-fenil carboxamidas como abridores de los canales de potasio Kv7.4 (KCNQ4) y Kv7.2 (KCNQ2).

5 [0012] La WO 02/48131 A1 divulga amidas de ácido carboxílico de tiofeno que muestran efectos de bloqueo de canales de potasio. Se ha descrito el uso de ácidos carboxílicos de tiofeno como medicamentos para el tratamiento o la profilaxis de la arritmia auricular.

10 [0013] Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un grupo novedoso de compuestos que son capaces de tratar trastornos asociados a una actividad aberrante de los canales de potasio en mamíferos, en concreto, en la profilaxis o la terapia. Preferiblemente, pero no necesariamente, dicho trastorno que se va a tratar es una pérdida de audición del oído interno después del daño o la pérdida de células ciliadas sensoriales en un órgano de Corti.

[0014] Según la invención, se pone a disposición un primer grupo de compuestos novedosos, en concreto:

(1R,2R,4S)-rel-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

(1S,2S,4R)-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

15 (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(trifluorometil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

(1R,2R,4S)-rel-N-(3-(trifluorometoxi)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

(1S,2S,4R)-N-(3-(trifluorometil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

(1S,2S,4R)-N-(3-(trifluorometoxi)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

donde se prefieren los compuestos siguientes:

20 - (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

- (1S,2S,4R)-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida

[0015] Según la invención, también se pone a disposición un segundo grupo de compuestos novedosos, en concreto:

5-cloro-N-(4-trifluorometoxi)bencil)tiofeno-2-carboxamida

5-fluoro-N-(4-trifluorometoxi)bencil)tiofeno-2-carboxamida

25 5-cloro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

5-fluoro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

5-fluoro-N-(4-(trifluorometil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

5-cloro-N-(4-(trifluorometil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

donde se prefieren los compuestos siguientes:

30 - 5-cloro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

- 5-fluoro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida

[0016] Es posible el uso de los compuestos de la invención para la terapia o la profilaxis de un trastorno asociado a una actividad aberrante de los canales de potasio en mamíferos. Según la presente invención, dicho trastorno que se va a tratar es una pérdida de audición del oído interno después del daño o la pérdida de células ciliadas sensoriales en un órgano de Corti.

5 [0017] Como consecuencia, la invención proporciona además una composición farmacéutica o medicamento que comprende:

- al menos un compuesto de la invención como se reivindica y se ha definido anteriormente y
- un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 [0018] Finalmente, los compuestos de la invención son útiles en un método para tratar un trastorno en un mamífero que necesita tal tratamiento, donde

- el trastorno comprende un trastorno asociado a la actividad aberrante de los canales de potasio, en particular una pérdida de audición del oído interno después del daño o la pérdida de células ciliadas sensoriales en un órgano de Corti, y
- el método comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto como se reivindica y tal como se ha definido anteriormente.

15

[0019] En particular, el mamífero anteriormente mencionado es un humano.

20 [0020] Se prefiere, además, según la invención, que la composición o medicamento de la invención anteriormente mencionado no solo comprenda al menos uno de los compuestos de la invención, sino también al menos un ingrediente farmacéutico activo adicional. Tales composiciones de combinación o medicamentos de combinación se pueden usar en el método anteriormente mencionado para tratar al menos un trastorno simultáneamente o al menos dos trastornos en paralelo. Dichos ingredientes farmacéuticos activos adicionales pueden ser, por ejemplo, compuestos usados como una medicación estándar para un cierto trastorno. En referencia a los trastornos del oído interno, en una composición o medicamento de la invención, los compuestos de la invención se pueden combinar preferiblemente con un fármaco estándar para tratar la sordera súbita (en alemán: Hörsturz), por ejemplo con dexametasona.

25 [0021] La definición de compuestos según la invención incluye todos los posibles "estereoisómeros" y sus mezclas. En particular, se incluyen las formas racémicas y los isómeros ópticos aislados con la actividad especificada. Las formas racémicas se pueden resolver por métodos físicos, tales como, por ejemplo, cristalización fraccional, separación o cristalización de derivados diastereoméricos o separación por cromatografía en columna quiral. Los isómeros ópticos individuales se pueden obtener de los racematos de los métodos convencionales, tal como, por ejemplo, la formación de sales con un ácido ópticamente activo seguido de una cristalización.

30

[0022] El término "tautómeros" se refiere a isómeros constitucionales de los compuestos de la invención que se interconvierten fácilmente mediante una reacción química llamada tautomerización. Esta reacción causa comúnmente la migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañada por un cambio de un enlace simple y un enlace doble adyacente.

35 [0023] Los compuestos de la invención con la fórmula (I) también pueden tener formas de "profármaco". Ya que se sabe que los profármacos mejoran las cualidades de los fármacos (por ejemplo, la solubilidad, la fabricación, etc.), los compuestos de la presente invención pueden administrarse en forma de profármaco. "Profármacos" se destina a incluir cualquier portador unido de manera covalente que libera un fármaco original activo de la presente invención *in vivo* cuando tal profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos incluyen compuestos de la presente invención donde, por ejemplo, un hidroxilo, amino u otro grupo está unido a cualquier grupo que, cuando se administra el profármaco, se escinde para formar un hidroxilo libre, amino libre u otro, respectivamente. Los ejemplos de profármacos incluyen, pero de forma no limitativa, derivados acetato, formiato y benzoato de grupos funcionales alcohol y amina en los compuestos de la presente invención. Varias formas de profármacos son bien conocidas en la técnica. En este contexto, según la invención, se pueden usar ésteres de profármaco o péptidos de profármaco como compuestos de profármaco. En determinados casos, acoplando moléculas que mejoran la penetración celular tales como, por ejemplo, biotina o ácido maleimidopropiónico, opcionalmente a través de moléculas separadoras adecuadas,

45

al grupo amino primario, o por acilación de este grupo amino, es posible mejorar la biodisponibilidad y, así, la eficacia de los compuestos según la invención.

5 [0024] La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto original se modifica produciendo sales ácidas o básicas de los mismos. Los ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, sales de ácidos minerales u orgánicos de grupos básicos tales como las aminas; y sales alcalinas y orgánicas de grupos ácidos tales como los ácidos carboxílicos. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales amónicas cuaternarias formadas, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como el clorhídrico, el bromhídrico, el sulfúrico, el fosfórico y el nítrico; y las sales obtenidas a partir de ácidos orgánicos tales como el acético, el propiónico y otros.

[0025] La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" y la expresión "diluyente farmacéuticamente aceptable" se refieren a medios aceptados generalmente en la técnica para la administración de agentes biológicamente activos a animales, en particular a mamíferos. Tales medios son bien conocidos en la técnica.

15 [0026] La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se destina a incluir una cantidad de un compuesto según la presente invención que sea eficaz cuando se administra solo o en combinación. Esta expresión se destina también a incluir una cantidad de una combinación de los compuestos reivindicados que sea eficaz para estimular la regeneración endógena de las células terminalmente diferenciadas en mamíferos. Preferiblemente, dicha combinación de compuestos es una combinación sinérgica. Tal sinergia ocurre cuando el efecto de los compuestos administrados en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos administrados solos como un único agente.

20 [0027] Los términos "tratar" o "tratamiento", como se utiliza en este caso, cubren el tratamiento de un estado patológico en un mamífero, particularmente en un ser humano, e incluyen:

- prevenir que se produzca el estado patológico en un mamífero, por ejemplo, dicho mamífero está predispuesto al trastorno pero no está diagnosticado con ese trastorno,
- inhibir el estado patológico, es decir, parar el desarrollo adicional, y/o
- 25 - aliviar el estado patológico, es decir, mejorar los síntomas del trastorno.

[0028] Según la presente invención, los compuestos reivindicados y la composición farmacéutica/medicamento reivindicada se pueden administrar a un mamífero en diferentes formas de dosificación. Se prefiere una forma de dosificación que permita la administración directa del compuesto a las células o tejidos dañados, por ejemplo, en la cóclea del mamífero. Por lo tanto, según una forma de realización de la invención, se prefieren las formas de dosificación no orales, en particular las inyecciones. En estos casos, la administración sobre o en el oído interno tiene lugar, por ejemplo, transtimpánicamente por inyección en el oído medio, por aplicación sobre la ventana redonda u oval del oído interno o por inyección (directa) en el oído interno. En este contexto, pueden emplearse, por ejemplo, bombas o dispositivos similares. Como una forma de dosificación preferida también han de mencionarse geles o materiales similares. Por ejemplo, dichos geles se pueden aplicar en el oído medio y liberar el/los agente(s) activo(s) a lo largo de un periodo más largo debido a su consistencia gelatinosa.

[0029] También es posible aplicar los compuestos (composición farmacéutica, medicamento) sistémicamente, por ejemplo, en una forma de dosificación oral. Estas formas de dosificación incluyen gránulos, polvos, comprimidos o cápsulas, jarabes, emulsiones, suspensiones, etc.

40 [0030] Todas las formas de dosificación se pueden fabricar por técnicas conocidas *per se* usadas de forma convencional en procedimientos farmacéuticos, por ejemplo, por métodos de mezclado, granulación o estratificación. Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas o medicamentos pueden esterilizarse.

[0031] La dosificación exacta (cantidad terapéuticamente eficaz) de los compuestos o la composición farmacéutica/medicamento según la invención se puede seleccionar apropiadamente según el receptor, su edad y peso corporal, su estado clínico actual, el tiempo de administración, la forma de dosificación, el método de administración, el compuesto empleado en realidad y, en su caso, otros fármacos usados.

45

- 5 [0032] Un rango de dosis, preferiblemente un rango de dosis oral, para un receptor adulto se puede seleccionar entre 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,05 a 10 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de 0,05 a 5 mg/kg de peso corporal. En el tratamiento de una pérdida de audición del oído interno después del daño o la pérdida de células ciliadas sensoriales en un órgano de Corti, la dosificación se puede relacionar con el "número de oídos internos tratados" y/o con el "número de administración". Esto se debe a que es apropiada una administración repetida del compuesto/composición farmacéutica a lo largo de un periodo temporal, por ejemplo entre un número de días y un número de semanas/meses, preferiblemente en intervalos de algunos días (1 a 7 días). En estos casos, la cantidad de compuesto activo empleado, preferiblemente directamente en la cóclea como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, mediante infusión, debería estar en el rango de 0,5 µg a 1,0 mg por oído interno y administración.
- 10 [0033] Los compuestos de la invención con la fórmula (I) se pueden preparar por métodos según el estado de la técnica. Como ejemplo, se describen los siguientes procedimientos generales para proporcionar compuestos de la invención que son una "... amida".

#### Procedimiento general para la síntesis de amidas

- 15 [0034] El ácido carbocíclico correspondiente (0,5 mmol) se disolvió en 3 ml de dimetilformamida seca (DMF) y se añadieron diisopropiletilamina (1,5 mmol) y reactivo de acoplamiento HATU [O-N,N,N',N'-tetrametiluronio-hexafluorofosfato] (0,55 mmol). La mezcla se agitó durante 15 min y se añadió la amina correspondiente (0,55 mmol). La mezcla reactiva resultante se agitó durante un tiempo adicional de 4-16 h, mientras la finalización de la reacción se controló por CCF (cromatografía en capa fina) o CL-EM (cromatografía líquida-espectrometría de masas). La mezcla se diluyó con 25 ml de acetato de etilo, (EtOAc), se lavó 1 vez con 20 ml de salmuera, se lavó 1 vez con 20 ml de solución de NaHCO<sub>3</sub> saturada, se lavó 3 veces con 20 ml de solución de ácido cítrico al 5% y se lavó de nuevo 1 vez con 20 ml de solución de NaHCO<sub>3</sub> saturada, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró al vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía en columna rápida (típicamente con un sistema de éter de petróleo-EtOAc) y/o cristalización y/o HPLC preparativa de fase inversa, si fuera necesario.

#### **Resultados farmacológicos**

- 25 [0035] La activación del Kv7.4 se midió usando una línea celular de Kv7.4 funcional y un tinte fluorescente sensible al talio con FLIPRTetra (High-Throughput Cellular Screening System of Molecular Devices, LLC, EE.UU.). El principio del ensayo se basa en la permeabilidad de los canales de potasio al talio. La entrada de talio se midió en células CHO (células de ovario de hámster chino) transfectadas de forma estable con un gen codificante de Kv7.4. Las células se cargaron con el tinte Thallos™ (TEFLABS; n.º cat. 0913), que, en esta fase, es un tinte profluorescente. Después de la activación del canal, con una solución extracelular que contiene talio, los iones de talio se desplazan según el gradiente de concentración a través de canales de potasio abiertos a través de la membrana celular. Cuando un ion de talio se une al tinte Thallos™, emite una emisión fluorescente brillante a 515 nm tras una excitación a 490 nm. Cabe destacar que la señal fluorogénica medida de forma cuantitativa refleja la actividad de los canales iónicos permeables al talio.

[0036] Los experimentos se realizaron en placas de 384 pocillos según el procedimiento siguiente:

- 35 1. Sembrar las células a 10.000 céls/pocillo en placas de 384 pocillos con las paredes negras y el fondo claro.
2. Veinticuatro horas después de la siembra, verter el medio manualmente y añadir 20 µl/pocillo de tinte sensible Thallos™ 0,5X preparado según las instrucciones del fabricante.
3. Incubar las células 1h a temperatura ambiente.
- 40 4. Inyectar fuera de línea 5 µl/pocillo de compuestos de prueba concentrados 5X en tampón Tyrode sin talio y sin cloruro (5 mM de D-gluconato de potasio, 130 mM de D-gluconato de sodio, 2 mM de D-gluconato de calcio, 5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM de D-gluconato de magnesio, 20 mM de HEPES, pH 7,4) con DMSO al 2,5% (el DMSO final está al 0,5%).
5. Después de 10 minutos de incubación, inyectar 25 µl/pocillo de EC20 de talio concentrado 2X (5 mM) en FLIPRTetra y controlar la respuesta cinética durante 120 segundos.

[0037] El efecto de los compuestos de prueba de la invención se midió como la actividad en porcentaje frente al abridor de referencia ML213 a EC100 (100  $\mu$ M) y los valores EC50 se calcularon en consecuencia. Los compuestos de la invención fueron activos como abridores del Kv7.4 con una EC50 comprendida entre 10 nM y 5  $\mu$ M.

### Experimentos *in vivo*

5 [0038] Los compuestos de la invención también se evaluaron *in vivo*. En este contexto, para el registro repetido del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio auditivo, se implantó bilateralmente un electrodo de oro permanente en conejillos de Indias en el nicho de la ventana redonda. La ventana redonda es una abertura desde el oído medio hacia el oído interno. Los electrodos de oro se conectaron a un enchufe miniaturizado en el cráneo. Durante los experimentos, se determinaron los audiogramas entre 0,5 y 45,6 kHz, a una resolución de 8 pasos por octava. Se aplicó un algoritmo automatizado de búsqueda del umbral.

[0039] Después de medir un audiograma de referencia, los animales fueron pretratados con un compuesto de la invención, como un activador de canales iónicos, mediante la aplicación local al oído medio. La solución correspondiente del compuesto de la invención se eliminó después de un tiempo de exposición, por ejemplo, después de 2 horas. Luego, el oído medio se enjuagó y se secó antes de realizar los registros del PAC para valorar los cambios del umbral.

15 [0040] A continuación, se indujo una sordera en los conejillos de Indias por aplicación local al oído medio de una mezcla de al menos un agente ototóxico y al menos un compuesto de la invención. Por ejemplo, se pueden usar como agentes ototóxicos la kanamicina, la furosemida o mezclas de estos compuestos.

[0041] Los umbrales de respuesta del PAC resultantes se compararon con oídos que fueron expuestos a los agentes ototóxicos solos.

20 [0042] Con estos experimentos se pudo demostrar que la exposición a los agentes ototóxicos solos, por ejemplo, la exposición a kanamicina o a furosemida o a mezclas de estos compuestos, revelaron una pérdida de audición coclear grave. En cambio, si estos agentes ototóxicos se aplican junto con al menos uno de los compuestos de la invención, hay una reducción significativa de la pérdida de audición, en comparación con la pérdida de audición con los agentes ototóxicos solos.

25 [0043] Detalles adicionales de los experimentos *in vivo* son los siguientes.

[0044] En este contexto, los dibujos muestran:

Figura 1: Ilustración esquemática del diseño experimental para investigar compuestos otoprotectores en un modelo de pérdida de audición inducida por fármacos ototóxicos *in vivo*.

30 Figura 2: Análisis cuantitativo de respuestas del PAC el día 0. (A) Pérdida del umbral del PAC después del pretratamiento con ACOU001. (B) Otoprotección después de la aplicación local de ACOU001 y kanamicina/furosemida en comparación con el tratamiento con el fármaco ototóxico solo.

Figura 3: Análisis cuantitativo de respuestas del PAC en diferentes puntos temporales de observación. Otoprotección a los 7 días (A) y a los 21 días (B) después del tratamiento con ACOU001 y kanamicina/furosemida en comparación con el tratamiento con el fármaco ototóxico solo.

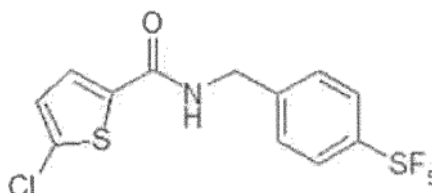
35 [0045] El flujo de trabajo típico de los experimentos *in vivo* se muestra en la figura 1. Todos los animales recibieron cuidados conforme a los estándares descritos por la 'Ley de Protección Animal' alemana (Tierschutzgesetz) y a la Directiva Europea 2010/63/EU para la protección de los animales utilizados para uso experimental. Los experimentos fueron aprobados por las autoridades locales (Solicitud HN03/15).

40 [0046] Todos los procedimientos se realizaron bajo anestesia usando una mezcla de fentanilo, midazolam y medetomidina. Durante la cirugía y las mediciones, los animales se mantuvieron sobre una almohadilla térmica a 37°C. Para el registro repetido del potencial de acción compuesto (PAC) del nervio auditivo, se implantó bilateralmente en los conejillos de Indias un electrodo de oro permanente en el nicho de la ventana redonda (VR) conectado a un enchufe

miniaturizado en el cráneo. Los audiogramas se determinaron entre 0,5 y 45,6 kHz, a una resolución de 8 pasos por octava. Se aplicó un algoritmo automatizado de búsqueda del umbral.

5 [0047] Después de medir un audiograma de referencia, los animales fueron pretratados con un activador de canales iónicos, en este caso con ACOU001, mediante la aplicación local en el oído medio. ACOU001 (designación interna del solicitante) es 5-cloro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida.

[0048] La estructura química de este compuesto ACOU001 es la siguiente:



10 [0049] La solución que contiene ACOU001 se eliminó después de 2 horas y el oído medio se enjuagó y se secó antes de realizar los registros del PAC para valorar los cambios del umbral. A continuación, los conejillos de Indias fueron ensordecidos por aplicación local en el oído medio usando una mezcla de 200 mg/ml de kanamicina, 50 mg/ml de furosemida y 100 µM de ACOU001. Se compararon los umbrales de respuesta del PAC con oídos que fueron expuestos al agente ototóxico solo. Se realizaron registros del PAC a los 7, 14 y 21 días después de este tratamiento. Después de la medición final el día 21, los animales fueron sacrificados, las cócleas fijadas por perfusión con paraformaldehído al 4% y preparadas para el análisis inmunohistológico para cuantificar la protección de las células ciliadas (CC).

15 [0050] Los resultados obtenidos de este conjunto de experimentos se muestran en la figura 2 y la 3. En comparación con los umbrales del PAC de referencia en oídos no tratados (Fig. 2A, línea discontinua (media)), el pretratamiento con el compuesto ACOU001 (línea continua (superior)) condujo a una pequeña, muy probablemente conductora, pérdida de audición (línea de puntos y rayas (inferior): diferencia entre la línea superior y la línea media). Esta pérdida de audición conductora puede explicarse por el líquido restante en el oído medio después de la aplicación local. El líquido restante afecta a la transmisión en el oído medio a bajas frecuencias (Fig. 2A, triángulos negros).

20

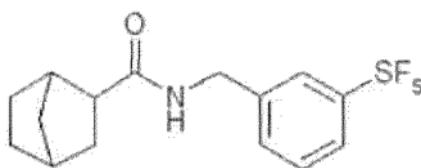
[0051] La exposición a kanamicina y furosemida (Fig. 2B, línea discontinua (superior)) reveló una pérdida de audición pancoclear grave. En cambio, la aplicación de ACOU001 junto con el fármaco ototóxico (línea continua (media)) causó una reducción significativa en la pérdida de audición de ~ 25 dB NPS (NPS: nivel de presión sonora) en las frecuencias medias a altas (5-11 kHz) en comparación con el fármaco ototóxico solo (línea de puntos y rayas inferior).

25 [0052] Siete días después de la administración de kanamicina y furosemida, se registró una pérdida de audición profunda y se mantuvo permanente en todo el rango de frecuencias (CPU: cambio permanente del umbral) a lo largo de una duración de 21 días (Fig. 3A/B, línea discontinua superior). Las curvas del PAC después del tratamiento con kanamicina/furosemida más ACOU001 también cambiaron a niveles umbrales mayores después de siete días, pero mejoraron después de 21 días (Fig. 3A/B, línea continua media). En comparación con el animal ensordecido, se registró una reducción significativa de la pérdida de audición (~25-40 dB NPS) en todas las frecuencias después de 21 días de cotratamiento con el aminoglucósido kanamicina más ACOU001 (Fig. 3B, línea de puntos y rayas inferior).

30

[0053] Se obtienen resultados significativos similares (con protecciones de audición (reducción de la pérdida de audición) de al menos 20-30 dB NPS) durante los experimentos *in vivo* con los compuestos:

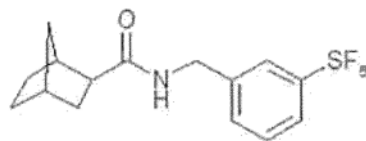
- (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida



35



- (1S,2S,4R)-N-(3-(pentafluorosulfanyl)benzyl)bicyclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida



**REIVINDICACIONES**

1. Compuesto seleccionado del siguiente grupo de compuestos:

- 5 (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1S,2S,4R)-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(trifluorometil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(trifluorometoxi)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1S,2S,4R)-N-(3-(trifluorometil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1S,2S,4R)-N-(3-(trifluorometoxi)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida.

2. Compuesto según la reivindicación 1 seleccionado del siguiente grupo de compuestos:

- 10 (1R,2R,4S)-rel-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida  
 (1S,2S,4R)-N-(3-(pentafluorosulfanil)bencil)biciclo[2.2.1]heptano-2-carboxamida.

3. Compuesto seleccionado del siguiente grupo de compuestos:

- 15 5-cloro-N-(4-trifluorometoxi)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-fluoro-N-(4-trifluorometoxi)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-cloro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-fluoro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-fluoro-N-(4-(trifluorometil)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-cloro-N-(4-(trifluorometil)bencil)tiofeno-2-carboxamida.

4. Compuesto según la reivindicación 3 seleccionado del siguiente grupo de compuestos:

- 20 5-cloro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida  
 5-fluoro-N-(4-(pentafluorosulfanil)bencil)tiofeno-2-carboxamida.

5. Composición farmacéutica o medicamento, que comprende:

- al menos un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones precedentes y
- un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 25 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para usar como una composición farmacéutica o un medicamento para la profilaxis o la terapia de una pérdida de audición del oído interno después del daño o la pérdida de células ciliadas sensoriales en un órgano de Corti.

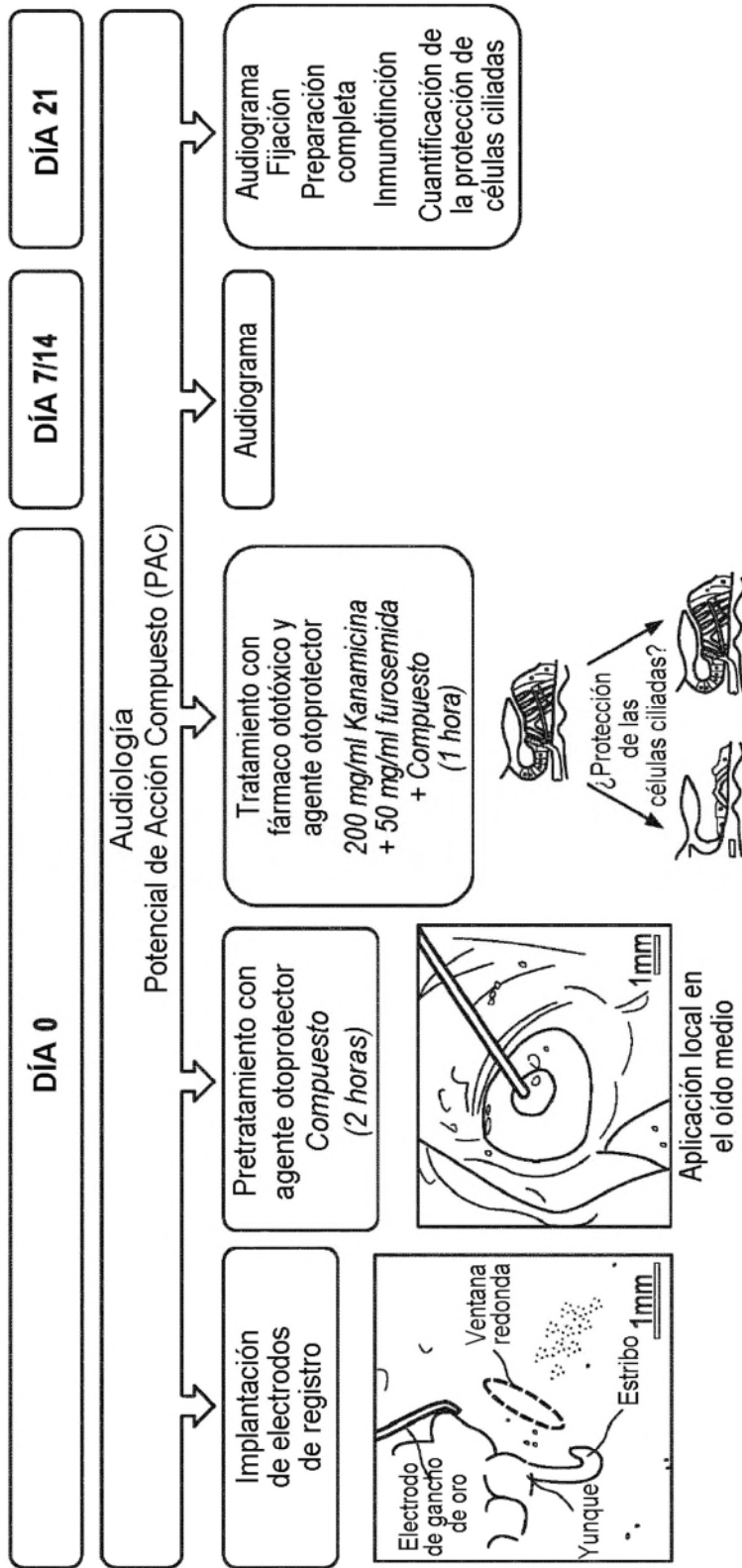


Fig. 1

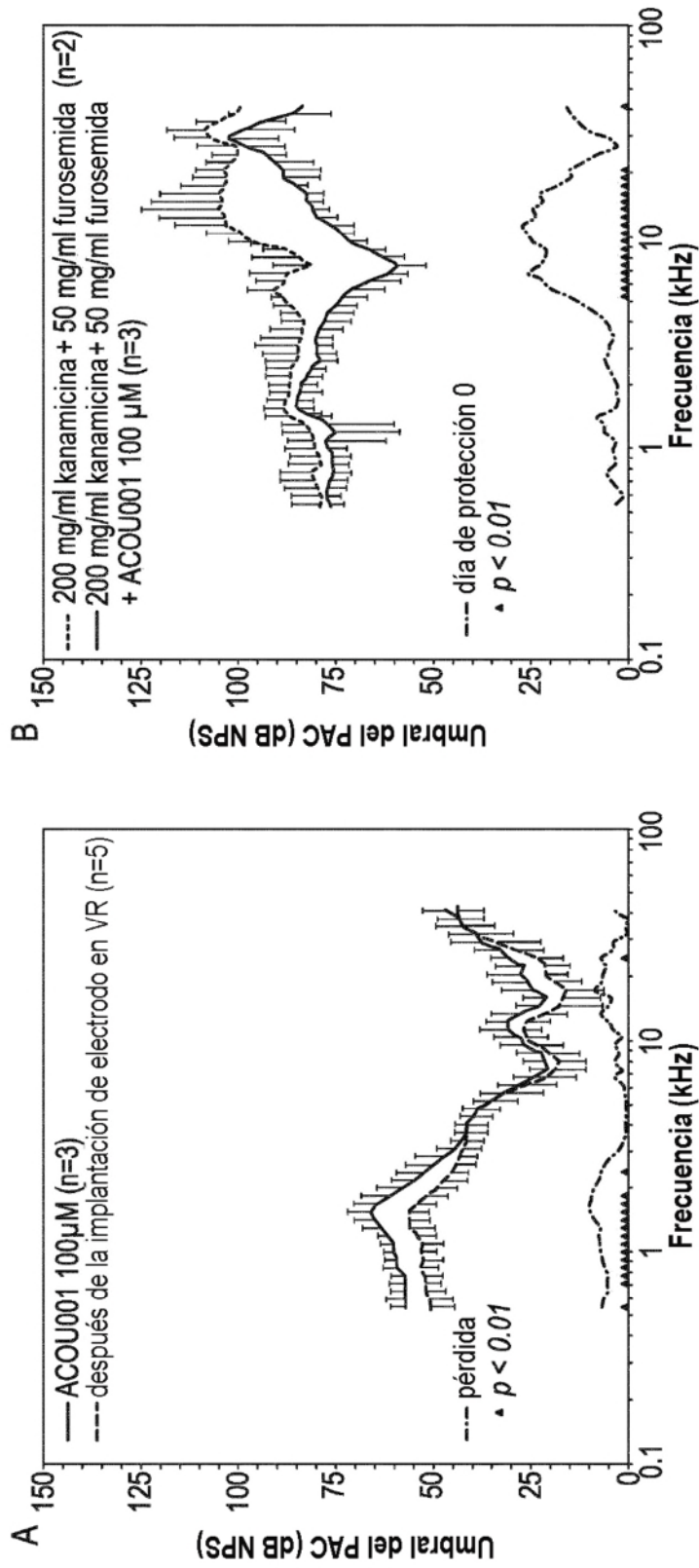


Fig. 2

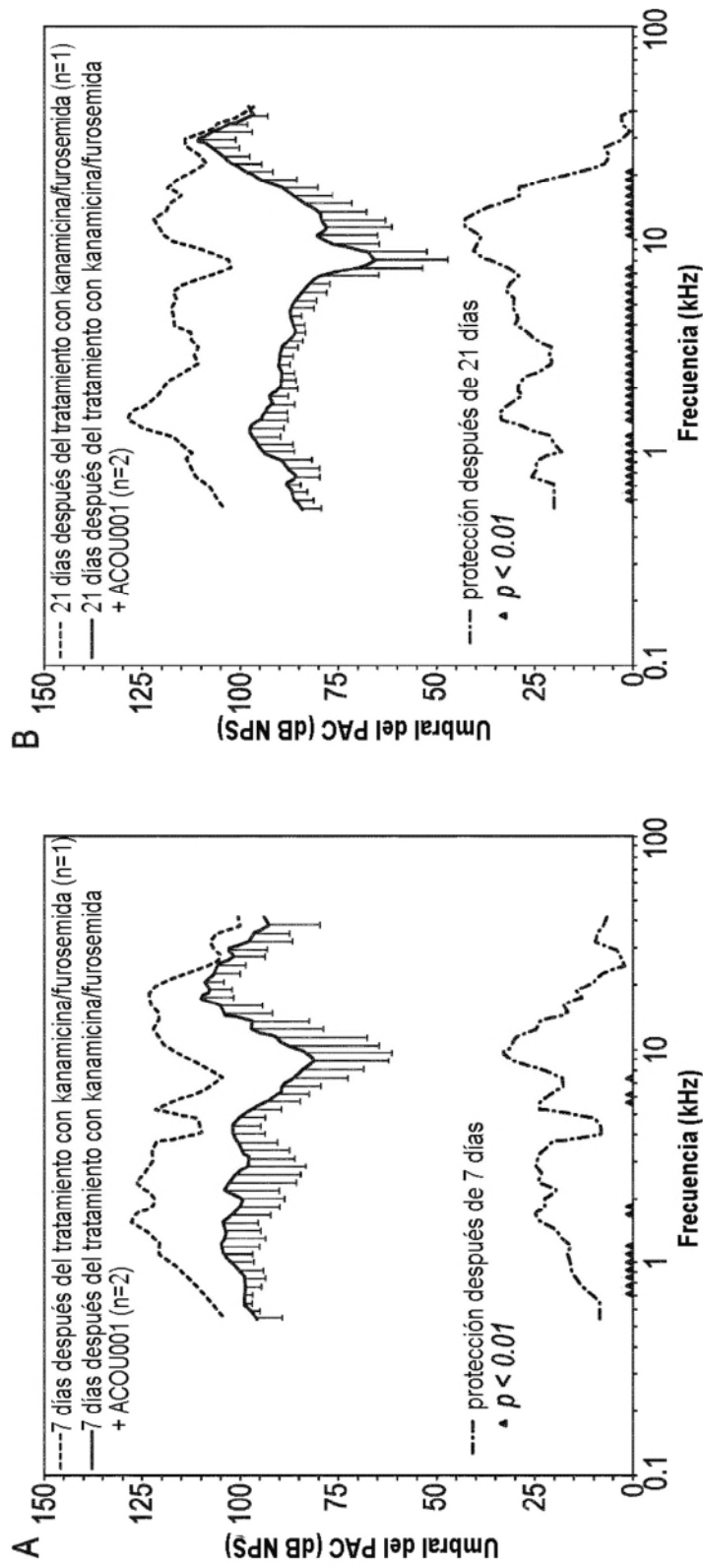


Fig. 3