

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
11. August 2011 (11.08.2011)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2011/095338 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation:

C07D 263/34 (2006.01) A61K 31/421 (2006.01)  
C07D 413/06 (2006.01) A61K 31/422 (2006.01)  
C07D 413/12 (2006.01) A61K 31/427 (2006.01)  
C07D 417/04 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01)  
C07D 417/12 (2006.01)

(74) Gemeinsamer Vertreter: EMC MICROCOLLECTI-  
ONS GMBH; Sindelfinger Str. 3, 72070 Tübingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2011/000502

(22) Internationales Anmeldedatum:  
4. Februar 2011 (04.02.2011)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
10 2010 007 281.8  
8. Februar 2010 (08.02.2010) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EMC MICROCOLLECTIONS GMBH [DE/DE]; Sindelfinger Str. 3, 72070 Tübingen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EICKHOFF, Holger [DE/DE]; Franz-Lehár-Weg 8, 71083 Herrenberg (DE).  
LÖWENHEIM, Hubert [DE/DE]; Welzenwiler Str. 11/1, 72074 Tübingen (DE).

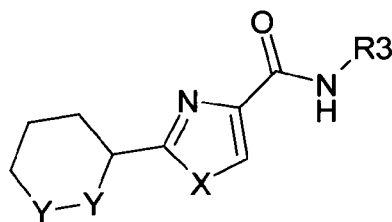
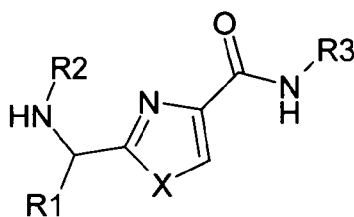
(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärungen gemäß Regel 4.17:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: NOVEL AMINOALKYL-OXAZOLE AND AMINOALKYL-THIAZOLE CARBOXYLIC ACID AMIDES AS REGENERATION-PROMOTING SUBSTANCES FOR SENSORY ORGANS AND POST-MITOTIC TISSUE

(54) Bezeichnung : NEUE AMINOALKYL-OXAZOL- UND AMINOALKYL-THIAZOLCARBONSÄUREAMIDE ALS REGENERATIONSFÖRDERNDE SUBSTANZEN FÜR SINNESORGANE UND POSTMITOTISCHE GEWEBE



X = O, S

(57) Abstract: The present invention relates to novel aminoalkyl-oxazole and aminoalkyl-thiazole carboxylic acid amides that stimulate the endogenous regeneration of terminally differentiated cells in highly specialized organs, tissues and sensory epithelia in mammals *in situ*. The claimed low-molecular-weight compounds are able to induce corresponding cell biological changes such as dedifferentiation, proliferation and the subsequent terminal redifferentiation of cells of the normally post-mitotic tissue. The invention in particular relates to compounds with which a *de novo* formation of hair sensory cells in the organ of Corti can be obtained by inducing cell separation of supporting cells of the inner ear and hearing can be restored after hair cell loss. The compounds according to the invention for the first time enable a causal treatment of inner ear hardness of hearing caused, for example, by noise, ototoxic substances, symptoms of old age or genetic causes on the basis of regenerative biology. The invention further relates to methods for producing the compounds according to the invention, to the formulation (1) (2) thereof as pharmaceutical preparations and to the use thereof for producing pharmaceuticals for regenerative medicine.

(57) Zusammenfassung:

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2011/095338 A1



- 
- hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, ein Patent zu beantragen und zu erhalten (Regel 4.17 Ziffer ii)
  - Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv)

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz 3)

---

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide, die die endogene Regeneration von terminal differenzierten Zellen in hochspezialisierten Organen, Geweben und Sinnesepithelien beim Säuger in situ stimulieren. Die beanspruchten niedermolekularen Verbindungen sind in der Lage, entsprechende zellbiologische Veränderungen wie die Dedifferenzierung, die Proliferation und die nachfolgende terminale Redifferenzierung von Zellen des normalerweise postmitotischen Gewebes zu induzieren. Im Besonderen betrifft die Erfindung Verbindungen, mit denen durch eine Induktion der Zellteilung von Stützzellen des Innenohres eine de novo Bildung von Haarsinneszellen im Corti'schen Organ erreicht und das Hörvermögen nach Haarzellverlust wiederhergestellt werden kann. Die erfindungsgemäßen Verbindungen ermöglichen erstmals eine kausale Behandlung der beispielsweise durch Lärm, ototoxische Substanzen, Alterserscheinungen oder genetische Ursachen bedingten Innenohrschwerhörigkeit auf regenerationsbiologischer Grundlage. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, zu deren Formulierung (1) (2) als pharmazeutische Präparate sowie ihre Anwendung zur Herstellung von Arzneimitteln für die regenerative Medizin.

## Beschreibung

### Neue Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide als regenerationsfördernde Substanzen für Sinnesorgane und postmitotische Gewebe

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäure-  
amide, die die endogene Regeneration von terminal differenzierten Zellen in hochspezialisierten  
5 Organen, Geweben und Sinnesepithelien beim Säuger *in situ* stimulieren.

Die beanspruchten niedermolekularen Verbindungen sind in der Lage, entsprechende zellbiolo-  
gische Veränderungen wie die Dedifferenzierung, die Proliferation und die nachfolgende termi-  
nale Redifferenzierung von Zellen des normalerweise postmitotischen Gewebes zu induzieren.

10 Im Besonderen betrifft die Erfindung Verbindungen, mit denen durch eine Induktion der Zelltei-  
lung von Stützzellen des Innenohres eine *de novo* Bildung von Haarsinneszellen im Corti'schen  
Organ erreicht und das Hörvermögen nach Haarzellverlust wiederhergestellt werden kann.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen,  
zu deren Formulierung als pharmazeutische Präparate sowie ihre Anwendung zur Herstellung  
15 von Arzneimitteln für die regenerative Medizin.

### Stand der Technik

Einschränkungen in der Fähigkeit zu hören und somit zu kommunizieren, haben erhebliche Aus-  
wirkungen auf die Lebensqualität in nahezu allen beruflichen und sozialen Bereichen. Damit ist  
die Sinneserkrankung Schwerhörigkeit eines der vordringlichen gesundheitlichen Probleme in  
20 einer von Kommunikation abhängigen Gesellschaft.

Schwerhörigkeit betrifft im Durchschnitt etwa 10% der Bevölkerung in den Industrienationen. In  
Deutschland geht man heute von 16 Millionen Schwerhörigen, nahezu einem Fünftel der Ge-  
samtbevölkerung, aus (ifo-Institut, 1986). Damit ist Schwerhörigkeit nicht nur die häufigste Er-  
krankung eines Sinnesorgans, sondern auch eine der häufigsten chronischen Erkrankungen  
25 überhaupt.

Betrachtet man die Ursachen für die Schwerhörigkeit, so leiden die Betroffenen in etwa 80% der  
Fälle an einer Schallempfindungsschwerhörigkeit. Einer der häufigsten Gründe hierfür ist der  
Verlust von sensorischen Haarsinneszellen im Corti'schen Organ, dem auditorischen Sinnesepi-  
30 thel, die aufgrund von Lärmexposition, Nebenwirkungen von ototoxischen Medikamenten, alters-  
bedingter Degeneration oder genetischen Ursachen irreversibel durch Zelltod verloren gehen  
(Nadol, 1993).

Für diese weitaus häufigste Form der Schwerhörigkeit kann bisher nur die prothetische Versorgung mit Hörgeräten angeboten werden. Das Ergebnis dieser Versorgung ist jedoch für die Betroffenen aufgrund der mangelnden Sprachverständlichkeit häufig unbefriedigend. Entsprechend werden Hörgeräte nur von einem relativ geringen Anteil der Schwerhörigen auch tatsächlich genutzt.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existiert keine kurative medizinische Behandlungsmöglichkeit für die Hauptursache der Schallempfindungsschwerhörigkeit. Eine solche kausale Behandlung wäre nur durch den Ersatz bzw. die Regeneration der verlorenen Haarsinneszellen des Corti'schen Organs möglich.

In den meisten Organen und Geweben des Säugers ist die Fähigkeit zur Regeneration nach einer Schädigung eingeschränkt oder gar nicht vorhanden. Nur einige wenige Organe und Gewebe, wie beispielsweise die Leber, der Knochen oder die Haut besitzen über die gesamte Lebenszeit des Organismus die Fähigkeit zur spontanen Regeneration durch Neubildung von Zellen. In vielen Fällen verlassen die entsprechenden Zellen in den hochspezialisierten Organen und Geweben (z.B. Herz, Gehirn, Skelettmuskel oder die Sinnesepithelien von Auge und Innenohr) den Zellzyklus irreversibel, um in einem terminal differenzierten Zustand zu verharren. Als Konsequenz haben diese Gewebe auch ihre Fähigkeit zu einer spontanen Regeneration beim Eintreten von schädigenden Ereignissen verloren. Dies führt entsprechend zu irreversiblen funktionellen Defiziten. So bedeuten beispielsweise ein Herzinfarkt für das Herz oder ein Schlaganfall für das Gehirn die häufig irreversible Schädigung der betroffenen Gewebeanteile mit entsprechend dauerhaften Funktionsverlusten.

Es gibt jedoch, beispielsweise bei Amphibien, Gewebe und Organe, wie die Beispiele von Retina oder Gliedmaßen zeigen, bei denen zwar eine terminale Differenzierung vorliegt, die aber trotzdem zu einer spontanen *in vivo* Regeneration befähigt sind (Tsonis, 2000; Tsonis, 2002). Das zentrale zellbiologische Ereignis bei diesen Beispielen besteht in der zellulären Dedifferenzierung, die die Entstehung von multipotenten Vorläuferzellen erlaubt, aus denen durch Proliferation und Redifferenzierung regenerierte Zellen entstehen können.

Die Dedifferenzierung spielt also die entscheidende Rolle bei der Regeneration der terminal differenzierten Gewebe der Amphibien. Im Unterschied dazu zeigen andere Vertebraten geringere Fähigkeiten zur Regeneration.

Für das Hörorgan der Säuger und der Vögel ging man bis vor etwa 20 Jahren davon aus, dass die Haarsinneszellen im Innenohr nur während einer kurzen kritischen Phase der Embryonalentwicklung entstehen können (Ruben, 1967). Danach galten die Sinnesepithelien als postmitotisch und damit nicht zur Regeneration ihrer Sinneszellen befähigt. Überraschenderweise wurde

jedoch die Fähigkeit der Vogel-*Cochlea* zu spontaner Regeneration von Haarsinneszellen nach akustischem Trauma und ototoxischer Schädigung entdeckt (Cotanche 1987; Cruz et al., 1987).

Als grundlegender biologischer Mechanismus für die Haarsinneszellregeneration in der Vogel-*Cochlea* wurde die Zellteilung von direkt zu den zerstörten Haarsinneszellen benachbarten Stützzellen beschrieben (Corwin und Cotanche, 1988; Ryals und Rubel, 1988), wobei eine Population aus undifferenzierten Zellen entsteht, die in der Lage sind, sich zu neu gebildeten Haarsinneszellen und Stützzellen zu redifferenzieren. Hieraus resultiert die nahezu vollständige morphologische und funktionelle Erholung des Sinnesepithels beim Vogel (Cotanche, 1999; Smolders, 1999).

Obwohl zunächst naheliegend, ist es aufgrund grundsätzlicher zellbiologischer Unterschiede bis jetzt noch nicht gelungen, Erkenntnisse aus anderen Modellen auf den Säuger zu übertragen.

Entsprechende Experimente zur Haarsinneszellregeneration bei Säugern gaben keine (Roberson und Rubel, 1994; Vago et al., 1998; Daudet et al., 1998; Daudet et al., 2002; Yamasoba et al., 2003) oder nur sehr geringe (Yamasoba und Kondo, 2006) Hinweise auf eine Fähigkeit zur spontanen Zellteilung von Stützzellen im Corti'schen Organ. Insbesondere gibt es, selbst nach der Anwendung von Wachstumsfaktoren, keinerlei Hinweise auf eine induzierbare Proliferation von Stützzellen im Corti'schen Organ (Staecker et al., 1995; Daudet et al., 2002). Verschiedene Experimente an Kulturen von frühen Entwicklungsstadien des Corti'schen Organs embryonaler Mäuse zeigten nach definierter Laserschädigung ebenfalls nur einzelne proliferative Ereignisse (Kelley et al., 1995).

Dieses völlige Fehlen von Zellteilungen deutet darauf hin, dass die hochspezialisierten Stützzellpopulationen im normalen adulten Corti'schen Organ einen terminal differenzierten Zustand erreicht haben und nicht zum Wiedereintritt in den Zellzyklus befähigt sind. Damit kann im Fall des Innenohres bereits ein einmaliges Schalltrauma zum Untergang von Haarsinneszellen führen und den unausweichlichen sowie irreversiblen Verlust der Hörfunktion nach sich ziehen.

Seit kurzem ist bekannt, dass sich aus den in Regeneration befindlichen Geweben der Amphibien (z.B. Gliedmaßen) ein Extrakt gewinnen lässt, der in der Lage ist, auch bei Säugerzellen eine Dedifferenzierung zu induzieren (McGann et al., 2001). Damit lässt sich bei entsprechender Stimulation der auf der Dedifferenzierung basierende Mechanismus zur Regeneration terminal differenzierter Zellen von den Amphibien auf den Säuger übertragen (Odelberg, 2002). Bei den genannten Regenerationsextrakten handelt es sich jedoch um „Protein-Cocktails“, deren Zusammensetzung nicht näher bekannt ist.

Inzwischen ist es jedoch auch gelungen, mit einer definierten niedermolekularen Verbindung eine entsprechende Wirkung bei Muskelzellen des Säugers zu erzielen (Chen et al., 2004). Durch Screening-Untersuchungen konnten weiterhin mehrere niedermolekulare Verbindungen mit regenerationsbiologisch relevanten Effekten für verschiedene Zelltypen einschließlich Gliazellen identifiziert werden (Übersichten in Xu et al., 2008; Schugar et al., 2008; Feng et al., 2009; Li und Ding, 2009). Diese Effekte deuten darauf hin, dass auch bei weiteren Zelltypen durch geeignete niedermolekulare Verbindungen eine auf der Dedifferenzierung basierende Regeneration induziert werden kann (Tsonis, 2004; Kim et al., 2004; Odelberg, 2002).

Die Übertragung dieses Konzeptes auf regenerationsbiologische Untersuchungen im Innenohr ist bisher einzigartig. Es sind keine niedermolekularen Verbindungen bekannt oder patentiert, die eine Haarsinneszellregeneration im Innenohr bewirken könnten.

Auch andere Konzepte zur Regeneration von Haarsinneszellen im Corti'schen Organ, die nach dem heutigen Stand der Technik verfolgt werden, sind im Hinblick auf eine klinische Anwendung noch wenig erfolgversprechend.

Bei der Beeinflussung der Zellzyklusregulation von Stützzellen durch Ausschalten des Zellzyklusinhibitors  $p27^{Kip1}$  konnten *in vivo* zwar Zellteilungen erreicht werden (WO 99/42088). Die Differenzierung zu Haarsinneszellen wurde bisher jedoch nur unter *in vitro* Bedingungen außerhalb des Gewebekontextes beobachtet (White et al., 2006).

Die gentherapeutisch induzierte Transdifferenzierung von Stützzellen mit dem für die Haarsinneszellendifferenzierung entscheidenden Transkriptionsfaktor *Math1* führte in einem *in vivo* Modell mit induziertem Haarsinneszellverlust zur Konversion von Stützzellen zu Haarsinneszellen, sogar mit einer teilweisen funktionellen Erholung der Organfunktion (Izumikawa et al., 2005; Kawamoto et al., 2003). Allerdings resultierte die Reduzierung der Stützstellen in funktionellen Einschränkungen für das Corti'sche Organ, da ohne Stützzellen ein normaler Ablauf der komplexen Mikromechanik im Transduktionsprozess nicht denkbar ist.

Bei der Aktivierung endogener, im Organ residenter Progenitorstammzellen oder der exogenen Applikation heterologer Stammzellen in das Innenohr konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden (Tateya et al., 2003; Naito et al., 2004; Martinez-Monedero et al., 2007a, b; Li et al., 2003). Eine gezielte oder funktionell relevante Transplantation von Stammzellen in das Innenohr konnte jedoch bisher noch nicht realisiert werden.

## Aufgabenstellung

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, niedermolekulare Verbindungen zu identifizieren, die eine endogene Regeneration von terminal differenzierten Zellen in hochspezialisierten Organen, Geweben und Sinnesepithelien beim Säuger *in situ* stimulieren. Im Besonderen sollen diese Verbindungen die Wiederherstellung des Hörvermögens beim Säuger durch eine *de novo* Bildung von Haarsinneszellen im adulten Corti'schen Organ ermöglichen. Auf der Basis dieser Verbindungen sollte erstmalig eine kausale Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit auf der Grundlage eines regenerationsbiologisch aktiven Arzneimittels ermöglicht werden.

Die Aufgabe wird gelöst durch die Bekanntmachung neuer niedermolekularer Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide mit regenerationsfördernden Eigenschaften, wie sie im Anspruch 1 dargestellt sind. Bevorzugte Ausführungsformen dieser Verbindungen sind in Anspruch 2 deklariert. Die Ansprüche 3 bis 5 betreffen die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen in der medizinischen Therapie. Anspruch 6 betrifft Herstellungsverfahren für die erfindungsgemäßen Verbindungen, und die Ansprüche 7 bis 8 betreffen pharmazeutische Präparate, enthaltend die erfindungsgemäßen Verbindungen sowie deren Herstellung. In den Ansprüchen 10 und 11 ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindungen und pharmazeutischen Präparate zur Behandlung bestimmter Erkrankungen beim Säuger und in den Ansprüchen 12 und 13 die entsprechenden Therapieverfahren offenbart.

Der Wortlaut sämtlicher Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

Das wesentliche Merkmal der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass mit den erfindungsgemäßen Verbindungen erstmals strukturell definierte chemische Wirkstoffe vorliegen, die eine Regeneration von terminal differenzierten Zellen beim Säuger, insbesondere von Haarsinneszellen im Innenohr des Säugers, bewirken können. Aus diesen Gründen hat die vorliegende Erfindung mit der Identifizierung von neuen, bisher nicht bekannten niedermolekularen Verbindungen, die in der Lage sind, regenerationsbiologisch relevante Vorgänge wie die Dedifferenzierung, Proliferation und die daraus resultierende Regeneration von Zellen aus normalerweise postmitotischen Geweben zu stimulieren, ein Alleinstellungsmerkmal.

Die Erfindung beinhaltet weiterhin die Nutzung der regenerationsfördernden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Verbindungen zur ursächlichen Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit nach Schädigung und Verlust der Haarsinneszellen im Corti'schen Organ bis hin zur vollständigen Wiederherstellung des Hörvermögens bei Mensch und Tier.

## Detaillierte Beschreibung

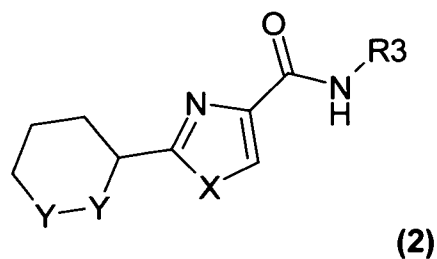
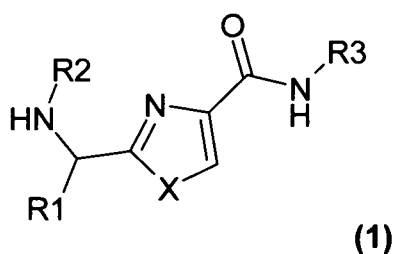
Aufgrund der komplexen Gewebestruktur im Innenohr erscheint unter den verschiedenen Verfahren der Regenerativen Medizin nur eine endogene Regeneration als Regeneration *in situ* denkbar. Voraussetzung für die Induktion dieser Regeneration bei den Haarsinneszellen ist die  
5 geeignete Stimulation des normalerweise hochdifferenzierten postmitotischen auditorischen Sinnesepithels. Zielzellen sind die Stützzellen, die den geschädigten Zellen direkt benachbart sind und als potentielle Vorläufer für eine Neubildung von Haarsinneszellen dienen können.

Obwohl aufgrund des aktuellen Standes der Technik anzunehmen ist, dass der regenerationsbiologische Mechanismus der Dedifferenzierung von Zellen durch bestimmte Wirkstoffe hervorgerufen werden kann, ist es bisher nicht gelungen, entsprechende Verbindungen für die Rege-  
10 neration im Innenohr zu identifizieren.

Die Fähigkeit organischer Verbindungen, eine regenerationsbiologisch relevante Wirkung im Innenohr auszulösen, ist zielstrukturabhängig und kann nicht präzise vorhergesagt werden. Ein entscheidender Faktor für die Erfolgsaussichten bei der biologischen Prüfung ist neben den  
15 potentiell wirksamen Strukturmerkmalen die Auswahl eines geeigneten Scaffolds mit Wirkstoffpotential in Abhängigkeit vom und mit Bezug zum Zielsystem.

Mittels umfangreicher Screening-Untersuchungen von Verbindungen mit potentiell regenerationsfördernden Eigenschaften aus verschiedenen Verbindungsklassen konnten überraschenderweise niedermolekulare Verbindungen identifiziert werden, die in der Lage sind, *in vitro* und  
20 *in vivo* entsprechende zellbiologische Veränderungen wie die Dedifferenzierung und die nachfolgende Proliferation otischer Stützzellen bis hin zur Regeneration von Haarsinneszellen zu induzieren. Mit einer Leitstrukturoptimierung konnten Strukturanaloga dieser Verbindungen entwickelt werden, die eine überragende regenerationsfördernde Wirksamkeit beim Säuger aufweisen.

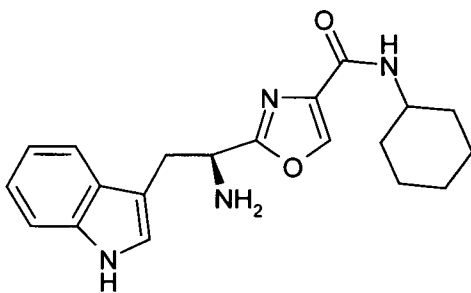
25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide nach den Formeln (1) und (2)



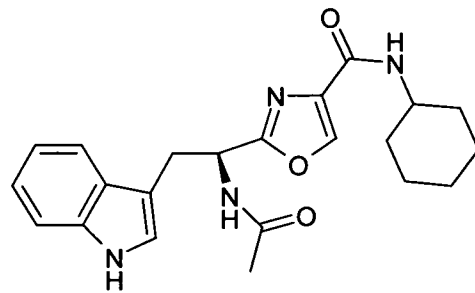
sowie deren Verwendung als Wirkstoffe für die Stimulation der endogenen *in situ* Regeneration von terminal differenzierten Zellen in hochspezialisierten Organen und Geweben, bevorzugt dem Gehirn, dem Herz, der Skelettmuskulatur, und besonders bevorzugt von Sinnesepithelien.

Dabei stehen

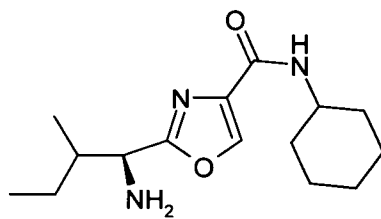
- 5 X für O oder S,  
 Y für C oder N, wobei beide Atome verschieden sein müssen,  
 R2 für Wasserstoff oder Acyl und  
 R1 und R3, die gleich oder verschieden sein können, für einen Substituenten aus den  
 folgenden Gruppen:  
 10 verzweigte oder unverzweigte, substituierte oder unsubstituierte, optional Heteroatome  
 enthaltende Alkylgruppen, Alkylcycloalkylgruppen, Alkylarylgruppen, Cycloalkylgruppen,  
 Cycloalkylarylgruppen, Arylgruppen und Arylcycloalkylgruppen,  
 wobei R1 bevorzugt für (1H-Indol-3-yl)-ethyl und R3 bevorzugt für Cyclohexyl steht.
- 15 Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft erfindungsgemäße Aminoalkyl-oxazol- und Amino-  
 alkyl-thiazolcarbonsäureamide entsprechend den folgenden Formeln (3) bis (8).



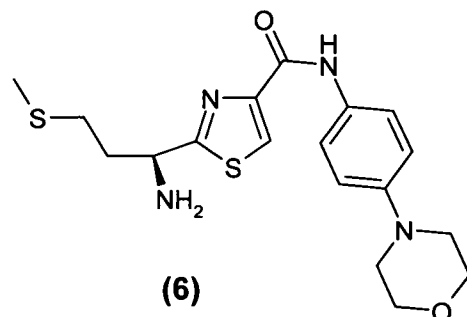
(3)



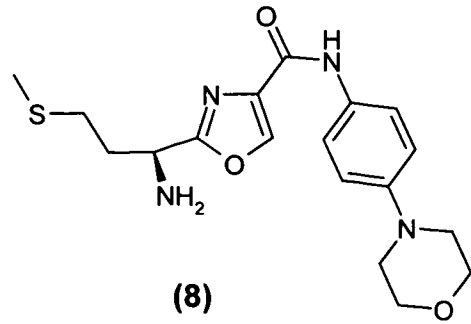
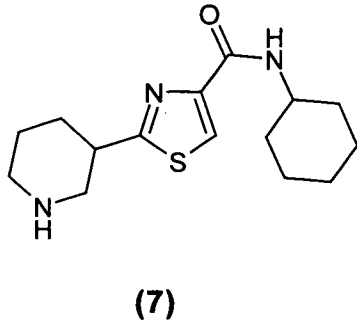
(4)



(5)



(6)



Diese Definitionen schließen pharmazeutisch akzeptable Salze (vorzugsweise nicht toxische und physiologisch verträgliche Salze), die Stereoisomere, Stereoisomeren-Gemische, alle Tautomere, Prodrug-Verbindungen, bevorzugt Prodrug-Ester oder Prodrug-Peptide, und Gemische der erfindungsgemäßen Verbindungen nach den Formeln (1) bis (8) ein.

Das Potential der erfindungsgemäßen niedermolekularen Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide, bereits differenzierte Zellen zu dedifferenzieren, wurde in einem Zellkultur-Assay an aus dem Innenohr der Maus isolierten Stammzellen mit otischem Entwicklungspotential, die in Zellkultur zu, dem ursprünglichen Sinnesepithel möglichst ähnlichen Epithelinseln, differenziert wurden, nachgewiesen. Gegenüber der Kontrolle konnte durch Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen der Anteil Sox2-exprimierender Zellen, ein Stammzellmarker der auch während der Ontogenese des Corti'schen Organs exprimiert wird und als Zeichen zellulärer Dedifferenzierung gilt, mehr als verdoppelt werden. Mit einem Anteil von bis zu 7,4% *BrdU* (*Bromdesoxyuridin*)-positiven Zellen, als Zeichen für die zelluläre Proliferation, unterscheidet sich die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen signifikant von der der Differenzierungs- und DMSO-Kontrollen, bei denen kein *BrdU* inkorporiert wird.

Somit konnte die überraschende biologische Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen, im Sinne der Stimulation von Dedifferenzierung und nachfolgender Proliferation differenzierter otischer Zellen, im *in vitro* Modell nachgewiesen werden.

Die immunocytochemische Analyse der Stammzellmarker auf dem dedifferenzierten Epithel bestätigte die Annahme, dass die erfindungsgemäßen Verbindungen nach ihrer Anreicherung im Zellkern zuerst eine Dedifferenzierung von differenzierten Zellen im Sinne einer Reprogrammierung induzieren, um anschließend deren Proliferation zu ermöglichen.

In dem Zellkulturmodell wurde durch eine Dosis-Wirkungs-Analyse für die erfindungsgemäßen Verbindungen der Konzentrationsbereich für eine effektive Wirksamkeit bezüglich der Proliferation im Rahmen von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$ , bevorzugt von 1  $\mu\text{M}$  bis 3  $\mu\text{M}$  Substanz im Zellkulturmedium definiert.

Vergleichbare Effekte wie im Zellkultur-Assay konnten auch in der *in vitro* Organkultur eines nativen Organs der Maus, d.h. im komplexen, zellulären Verband des Corti'schen Organs, erzielt werden. Nach ototoxischer Haarsinneszellschädigung durch das Aminoglykosid-Antibiotikum Neomycin führte die Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen zur *in situ* Proliferation von verschiedenen Stützzellen im Corti'schen Organ, wie den im Bereich der äußeren Haarzellen liegenden lateral orientierten Deiterszellen (äußere Phalangenzellen) und äußeren Grenzzellen, den im Bereich der inneren Haarzellen liegenden inneren Phalangenzellen und inneren Grenzzellen sowie anderen Stützzellen, die als potentielle Vorläuferzellen für die Regeneration innerer Haarsinneszellen gelten. Im Detail konnten einzeln markierte Zellkerne in verschiedenen Stadien der Mitose bis hin zur vollständig durchlaufenen Zellteilung mit doppelt vorliegenden Zellkernen nachgewiesen werden.

Im *in vivo* Modell des adulten Meerschweinchens zeigten die immunhistochemischen Befunde darüber hinaus eine durch die erfindungsgemäßen Verbindungen induzierte Regeneration von Haarsinneszellen auf der Basis von Zellteilungen von Stützzellen, vorzugsweise in den durch Lärmtraumata geschädigten Bereichen des Corti'schen Organs. Bei entsprechenden Kontrolltieren und Kontrollorganen ohne Applikation der Verbindungen zeigten sich keine spontan regenerierten Haarzellen.

Toxische Effekte oder Unverträglichkeiten der erfindungsgemäßen Verbindungen wurden bei den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Tests in den relevanten Konzentrationsbereichen nicht beobachtet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Herstellung der erfindungsgemäßen Aminoalkyloxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide, die erfindungsgemäß als Wirkstoffe für die Stimulation der endogenen *in situ* Regeneration von terminal differenzierten Zellen in hochspezialisierten Organen und Geweben, bevorzugt dem Gehirn, dem Herz, der Skelettmuskulatur, und besonders bevorzugt von Sinnesepithelien, eingesetzt werden können.

Die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt in mehreren Stufen. Detaillierte Synthesevorschriften können dem Anwendungsbeispiel A entnommen werden. Die Ausgangsstoffe zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen sind bekannt und können im Fachhandel bezogen oder nach bekannten Vorschriften hergestellt werden.

Ein möglicher Weg ist die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen an einer festen Phase ausgehend von einem Aminosäureamid. Dazu wird die Aminosäure, deren Seitenkette den Substituenten R1 repräsentiert, an einem polymeren Träger mit aktivierter Kohlensäureester-Gruppe immobilisiert und anschließend ihre Säuregruppe amidiert. Die Cyclisierung des Aminosäureamides zum Oxazol bzw. des Aminosäurethioamides zum Thiazol erfolgt mit Brombrenztraubensäure und N,N-Dimethylanilin. Bei Verwendung von Brombrenztraubensäureethylester

muss die entstandene Ester-Gruppe nachträglich verseift werden. Für die Synthese der Thiazole werden die Aminosäureamide vor der Cyclisierung mit Lawessons Reagenz in die entsprechenden Thioamide überführt. Die erhaltenen Aminosäure-oxazol-/Thiazolcarbonsäuren werden anschließend mit einem Amin, welches den Substituenten R3 repräsentiert, umgesetzt. Abschließend erfolgen die saure Abspaltung der Aminosäure-oxazol-/Thiazolcarbonsäureamide vom Syntheseharz und die nachfolgende chromatographische Aufreinigung.

Bei einer weiteren Herstellungsvariante wird die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen in Lösung durchgeführt. Die Synthese erfolgt unter Anwendung der Schutzgruppen-Chemie ausgehend von einer Boc-geschützten Aminosäure mit der Seitenkette R1. Die Synthesestufen sind prinzipiell zu den für die feste Phase beschriebenen adäquat. Am Ende der Synthese erfolgen die saure Abspaltung der Boc-Schutzgruppe und die nachfolgende chromatographische Aufreinigung.

Beide Herstellungsverfahren erlauben sowohl die Synthese von racemischen als auch von enantiomerenreinen Verbindungen. Die Verbindungen werden entweder in freier Form oder als Salz, sofern salzbildende Gruppen enthalten sind, erhalten. Als Salze der erfindungsgemäßen Verbindungen sind pharmazeutisch akzeptable Salze bevorzugt. Beispiele solcher Salze sind Salze anorganischer oder organischer Säuren, Salze anorganischer oder organischer Basen sowie Salze basischer oder saurer Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auch als Prodrug-Verbindungen, vorzugsweise als Prodrug-Ester oder Prodrug-Peptide, oder ähnliches modifiziert werden. In bestimmten Fällen kann durch die Kupplung von die Zellpenetration fördernden Molekülen wie z.B. Biotin oder Maleimidopropionsäure, optional über geeignete Spacermoleküle, an die primäre Aminogruppe oder die Acylierung dieser Aminogruppe, entsprechend dem Substituenten R2, die Bioverfügbarkeit und damit die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen Verbindungen verbessert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide zur Herstellung pharmazeutischer Präparate für die Behandlung von Erkrankungen beim Säuger, die mit geschädigten postmitotischen Geweben in Zusammenhang stehen, insbesondere für die Behandlung der durch Schädigung und Verlust der Haarsinneszellen im Corti'schen Organ bedingten Innenohrschwerhörigkeit beim Säuger. Diese Präparate, enthaltend wenigstens einen erfindungsgemäßen Wirkstoff allein oder in Kombination, enthalten optional weitere pharmazeutisch geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe wie z.B. Trägersubstanzen, Konservierungsmittel, Stabilisatoren, Emulgatoren, Detergentien, Lösemittel, Lösevermittler, Salze zur Regulation des osmotischen Druckes und Puffersalze. Zusätzlich können sie weitere therapeutisch relevante Wirkstoffe, Adjuvantien sowie regenerationsfördernde Substanzen wie z.B. Wachstumsfaktoren oder Entzündungshemmer enthalten.

Pharmazeutisch geeignete Materialien sind die im Bereich der Pharmazie und Lebensmitteltechnologie sowie in angrenzenden Gebieten bekanntermaßen verwendbaren Stoffe, insbesondere die in den einschlägigen Arzneibüchern gelisteten, deren Eigenschaften einer physiologischen Anwendung nicht entgegenstehen.

- 5 Die Effekte, die durch die erfindungsgemäßen Verbindungen hervorgerufen werden, sind auch abhängig von deren Formulierung. Entsprechende pharmazeutische Präparate sollten die direkte Applikation des Arzneimittels in die *Cochlea* des Säugers ermöglichen. Geeignete Applikationsformen für die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate, enthaltend mindestens einen Wirkstoff nach den Formeln (1) und (2), können beispielsweise Lösungen, Suspensionen,  
10 Sprays, Gele, Hydrogele, Lotionen, Emulsionen, Pasten, Salben oder Cremes sein.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate erfolgt in üblicher Weise nach dem Fachmann bekannten Verfahren, wie in den einschlägigen Arzneibüchern beschrieben, z.B. durch Mischen, Granulieren oder Beschichtungsmethoden. Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate können zusätzlich sterilisiert werden.

- 15 Die Erfindung betrifft auch die Verwendung der erfindungsgemäßen Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide als regenerationsfördernde Wirkstoffe zur Behandlung von Erkrankungen bei Menschen und Tieren, die mit geschädigten postmitotischen Geweben in Zusammenhang stehen, bevorzugt zur Wiederherstellung des Hörvermögens nach Verlust oder  
20 Schädigung der Haarsinneszellen im Innenohr. Hierzu verabreicht man einer Person oder einem Tier, die oder das einer derartigen Behandlung bedarf, eine therapeutisch effektive Menge eines erfindungsgemäßen regenerationsfördernd wirkenden Präparates, enthaltend mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung nach den Formeln (1) und (2). Der Wirkstoff oder das erfindungsgemäße pharmazeutische Präparat werden dabei direkt oder indirekt (einschließlich systemisch), vorzugsweise lokal, unmittelbar auf/an die geschädigten Gewebestrukturen aufgetragen. Die Applikation an oder in das Innenohr erfolgt beispielsweise transtympanal durch Injektion in das Mittelohr, durch Auftragen an das runde oder ovale Fenster des Innenohres oder durch Injektion in das Innenohr. Hierbei können verschiedene Systeme zur Wirkstoffapplikation (Gelformulierungen, Pumpen) verwendet werden.

- 30 Die erfindungsgemäßen Verbindungen und pharmazeutischen Präparate können allein, in Kombination mit anderen erfindungsgemäßen Verbindungen oder in Kombination mit einem oder mehreren Wirkstoffen, die für die jeweilige beschriebene therapeutische Indikation der erfindungsgemäßen Verbindungen relevant sind, angewendet werden. Die zeitliche Abfolge der Applikation ist dabei nicht eingeschränkt. Eine erfindungsgemäße Verbindung kann entweder zeitgleich, vor oder nach den anderen Wirkstoffen, als separates Arzneimittel oder Kombinationspräparat und auf demselben oder unterschiedlichen Applikationswegen verabreicht werden.  
35

Die exakte therapeutisch effektive Menge für die Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit bei einem Subjekt hängt von verschiedenen Faktoren, unter anderem vom Umfang der Schädigung des Gewebes, von Größe, Statur, Alter und Gesundheitszustand des Patienten, von Applikationsweg und -form, der angewandten konkreten Verbindung und gegebenenfalls weiteren verwendeten Arzneimitteln ab. Somit ist es zum jetzigen Zeitpunkt nicht sinnvoll, die exakte Menge zu spezifizieren. Jedoch kann man prinzipiell von einer mehrfachen Applikation der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparate über einen Zeitraum von bis zu 8 Wochen in Abständen von einem bis sieben Tagen bis hin zu einer kontinuierlichen Applikation durch Systeme zur Wirkstoffdosierung, die über einen Mechanismus zur dauerhafte Abgabe verfügen „sustained release“, ausgehen. Die eingesetzte Wirkstoffmenge sollte im Bereich von 0,5 µg bis 1,0 mg pro Innenohr und Applikation liegen.

#### Gewerbliche Anwendbarkeit

Regenerationsbiologisch relevante Verbindungen, die in der Lage sind, entsprechende zellbiologische Veränderungen wie Dedifferenzierung, Proliferation oder terminale Redifferenzierung zu induzieren, sowie deren Formulierungen stellen eine neue Form von Wirkstoffen dar, da es sich um ein völlig neues Therapiekonzept handelt.

Mit den erfindungsgemäßen Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamiden ist es erstmals gelungen, eine durch niedermolekulare Verbindungen induzierte Zellteilung von otischen Stützzellen und die daraus resultierende Regeneration von Haarsinneszellen im hochdifferenzierten postmitotischen Gewebe des Corti'schen Organs beim Säuger nachzuweisen. Bisher sind keine vergleichbaren Verfahren zur *in vivo* Regeneration von Haarsinneszellen auf der Basis von pharmazeutischen Wirkstoffen beschrieben.

Aufgrund der beobachteten Wirkprofile der erfindungsgemäßen Verbindungen sind diese als pharmazeutische Wirkstoffe zur kausalen therapeutischen Behandlung der Schallempfindungsschwerhörigkeit auf regenerationsbiologischer Grundlage geeignet. Dieser Behandlungsansatz ist allen anderen bisher diskutierten Verfahren wie Gentherapie oder Stammzelltransplantation grundsätzlich überlegen. Negative Einflüsse wurden in den bisherigen *in vitro* und *in vivo* Modellen nicht beobachtet.

Näheres zu besonders bevorzugten Ausführungsformen sowie weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung von Ausführungsbeispielen in Verbindung mit den Unteransprüchen, wobei die vorstehend genannten und nachstehend noch zu erläuternden individuellen Merkmale jeweils für sich und in beliebigen Kombinationen miteinander beansprucht sind.

Die Ausführungsbeispiele sind rein illustrativ und schränken die Breite der Erfindung nicht ein.

## Ausführungsbeispiele

## Beispiel A – Synthese von 2-[1-Amino-alkyl]-oxazol-4-carbonsäureamiden und der entsprechenden 2-[1-Amino-alkyl]-thiazol-4-carbonsäureamide

Die Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgte ausgehend von den Aminosäureamiden unter Nutzung relevanter Publikationen zur Herstellung ähnlicher Verbindungen (Vidnov et al., 1996; Stanchev et al., 1999; Stankova et al., 1999; Kaiser et al; 2000).

Sowohl die Zwischenstufen als auch die Endprodukte wurden mit HPLC und Massenspektrometrie bezüglich ihrer Reinheit und Identität überprüft. Zusätzlich erfolgte die Charakterisierung der Endprodukte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie. Alle Ausgangsstoffe und Reagenzien sind kommerziell erhältlich.

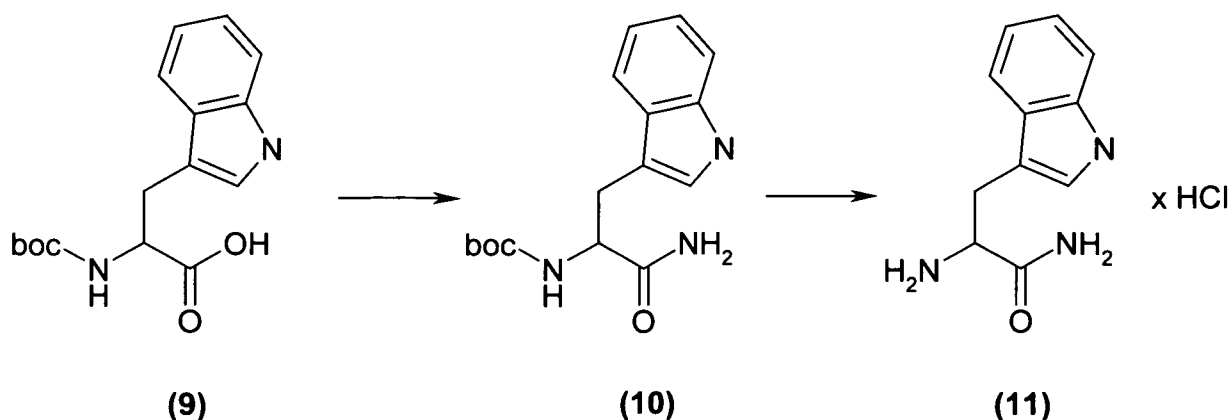
Im Folgenden ist ein Syntheseweg an einer festen Polymer-Phase, ausgehend von einem Aminosäureamid, beschrieben. Da ein Großteil der Synthesevorschriften identisch ist, wurden für die Oxazole und die Thiazole keine separaten Syntheseverfahren verwendet. Vorangestellt wurde exemplarisch die Synthese des Tryptophanamides (11) als Ausgangsstoff für die besonders bevorzugten Verbindungen (3) und (4).

Anschließend wurde ein alternativer Syntheseweg in Lösung, lediglich für die Thiazole, beschrieben. Für den geübten Fachmann stellt es jedoch keine Schwierigkeit dar, die Synthesbedingungen auf die Oxazole zu übertragen.

Für die variablen Substituenten wurden in den Versuchsbeschreibungen die Abkürzungen X, R1 und R3, die die gleiche Bedeutung wie in den Patentansprüchen haben, verwendet.

Die beschriebenen Synthesen ermöglichen die Darstellung der Verbindungen in stereochemisch reiner Form. Sie werden entweder in freier Form oder als Salz, sofern salzbildende Gruppen enthalten sind, erhalten.

## Darstellung von D-Tryptophanamid (11)

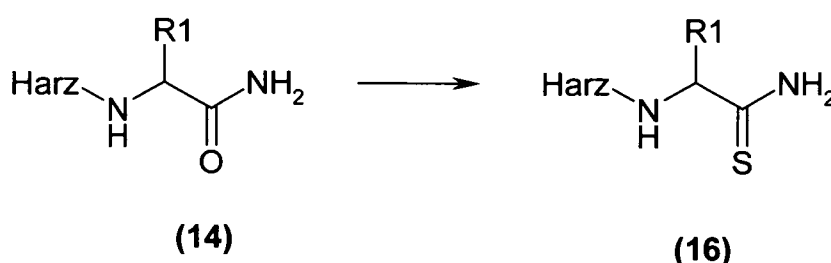




Raumtemperatur geschüttelt und dann 2 h auf 60°C erwärmt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt und das Harz mit trockenen Lösungsmitteln gewaschen (5 x DMF, 5 x DCM).

5 Eine auf -20°C gekühlte Lösung von Pyridin (10 Äquiv.; 6,55 mmol; 520 mg; 530 µL) in trockenem DCM (5 mL) wurde mit Trifluoressigsäureanhydrid (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 688 mg; 456 µL) gemischt und zu dem gewaschenen Harz gegeben. Nach 30 min bei -20°C wurde die Suspension auf Raumtemperatur erwärmt und weitere 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt, das Harz (15) gewaschen (je 3 x DMF, MeOH, THF, DCM, Diethylether) und im evakuierten Exsikkator getrocknet.

Darstellung von immobilisierten Thioamiden (16) mit Lawessons Reagenz

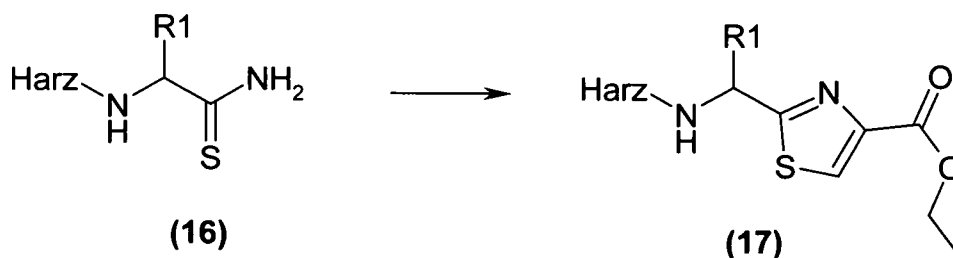


10

Das Aminosäureamid-Harz (14) (1 Äquiv.; 655 µmol; 500 mg) wurde mit einer Lösung von Lawessons Reagenz (3 Äquiv.; 1,97 mmol; 797 mg) in Dimethoxyethan (DME) (10 mL) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt, das Harz (16) gewaschen (6 x DMF, je 3 x MeOH, THF, DCM, Diethylether) und im evakuierten Exsikkator getrocknet.

15

Cyclisierung des immobilisierten Thioamides (16) zum Thiazol (17)

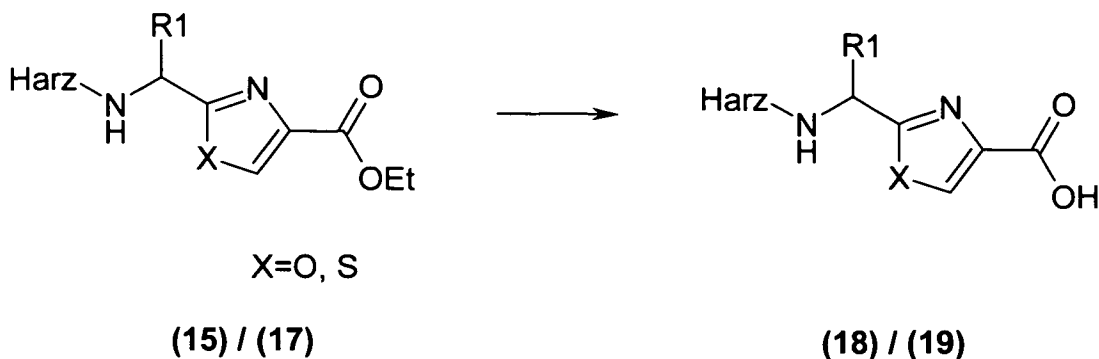


20

Brombrenztraubensäureethylester (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 640 mg; 412 µL) und N,N-Dimethylanilin (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 397 mg; 416 µL) wurden in DMF (4 mL) gelöst und zu dem Aminosäure-Thioamid-Harz (16) (1 Äquiv.; 655 µmol; 500 mg) gegeben. Die Suspension wurde 16 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Reaktionslösung wurde abgesaugt, das Harz (17) gewaschen (je 3 x DMF, MeOH, THF, DCM, Diethylether) und im evakuierten Exsikkator getrocknet. Die Identität und Reinheit des Reaktionsproduktes (17) wurden nach einer Testabspaltung mit 5% TFA in DCM über 1 h bei Raumtemperatur chromatographisch und massenspektrometrisch überprüft.

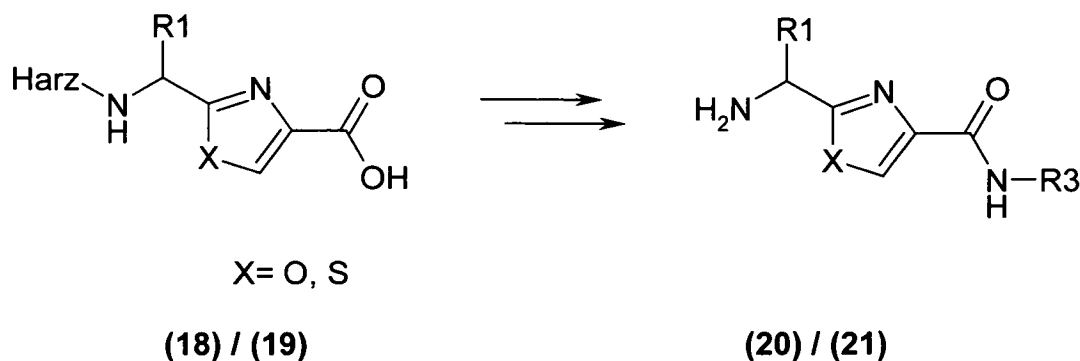
25

Verseifung der immobilisierten Ethylester (15) und (17)



Das Aminosäure-oxazol- (15) bzw. Aminosäure-thiazolcarbonsäureethylester-Harz (17) (1 Äquiv.; 655 µmol; 500 mg) wurde in THF (2,5 mL) vorgequollen und mit einer Lösung von Lithiumhydroxid Monohydrat (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 137 mg) in Wasser (1,25 mL) und MeOH (1,25 mL) versetzt. Nach 3 h bei Raumtemperatur wurde die Reaktionslösung abgesaugt, das Harz (18) bzw. (19) gewaschen (je 3 x Wasser, Wasser / DMF 1:1, DMF, Dioxan, THF, DCM, Diethylether) und im evakuierten Exsikkator getrocknet.

Amidierung der Carbonsäuren (18) und (19) und Abspaltung vom Harz

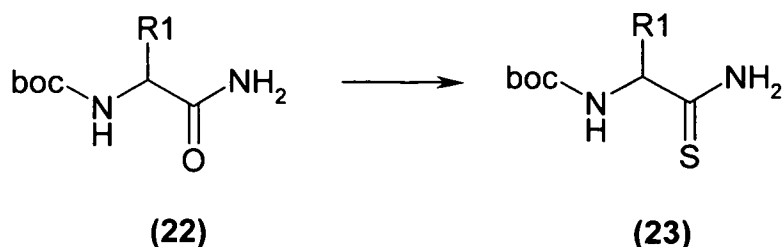


Zu dem Aminosäure-oxazol- (18) bzw. Aminosäure-thiazolcarbonsäure-Harz (19) (1 Äquiv.; 655 µmol; 500 mg) wurde eine Lösung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 443 mg) und DIC (5 Äquiv.; 3,28 mmol; 413 mg) in trockenem DMF (5 mL) gegeben. Nach 30 min Schütteln bei Raumtemperatur wurde das R3-Amin zugegeben (10 Äquiv.; 6,55 mmol) und die Suspension 16 h bei Raumtemperatur weiter geschüttelt. Nach Absaugen der Reaktionslösung wurde das Harz gewaschen (je 3 x DMF, MeOH, THF, DCM, Diethylether) und im Luftstrom trocken gesaugt.

Anschließend wurde das Produkt (20) bzw. (21) mit einer Lösung von 5% TFA in DCM über 1 h bei Raumtemperatur vom Harz abgespalten.

Nach dem Eindampfen der Abspaltlösungen wurde das Rohprodukt aus tBuOH / Wasser 4:1 lyophilisiert und über Kieselgel mit einem DCM-MeOH-Gradienten chromatographiert.

Darstellung der Thioamide (23) mit Lawessons Reagenz in Lösung

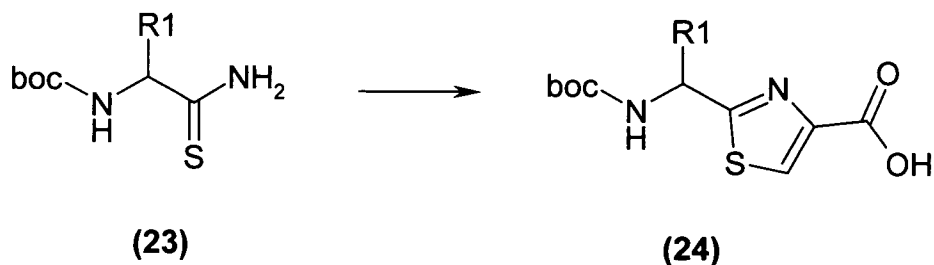


Zu einer Lösung des Boc-Aminosäureamides (22) (1 Äquiv.; 1,00 mmol) in trockenem DME (7,5 mL) wurde unter Rühren Lawessons Reagenz (0,75 Äquiv.; 750 µmol; 305 mg) gegeben.

Die Reaktionslösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt und das Lösungsmittel nachfolgend am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abdestilliert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat (30 mL) aufgenommen und mit 10%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung (15 mL) 30 min kräftig gerührt. Nach Trennung der Phasen wurde die wässrige Phase zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit 10%iger Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen und anschließend über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt (23) im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Die Rohprodukte können aus Ethylacetat bzw. Ethylacetat / Petrolether umkristallisiert oder per Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt werden.

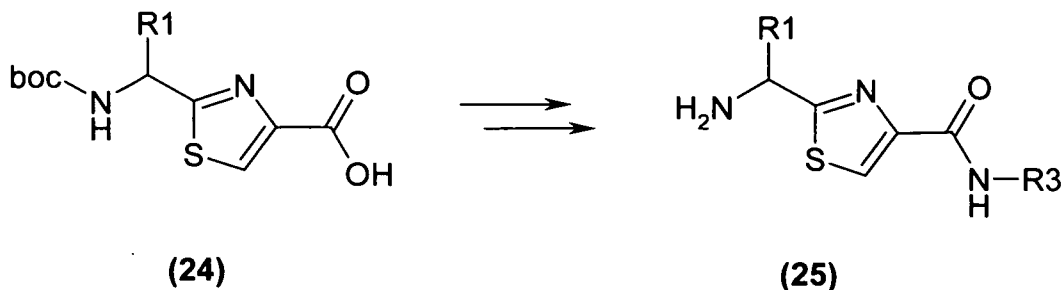
15 Cyclisierung der Thioamide (23) zum Thiazol (24) in Lösung



Zu einer Lösung des Boc-Aminosäurethioamides (23) (1 Äquiv.; 0,80 mmol) in wasserfreiem Ethanol (6 mL) wurde Calciumcarbonat (2 Äquiv.; 1,60 mmol; 161 mg) gegeben und die Suspension 10 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde Brombrenztraubensäure (1,5 Äquiv.; 1,20 mmol; 201 mg) zugegeben. Nach 4 h Rühren bei Raumtemperatur wurde die Reaktionsmischung filtriert und der Rückstand mit Ethanol nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand in Ethylacetat (10 mL) aufgenommen und dreimal mit 10 mL 5%iger Kaliumhydrogensulfat-Lösung sowie einmal mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung extrahiert. Anschließend wurde die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel abdestilliert und das Produkt (24) im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Die Rohprodukte wurden per Flash-Chromatographie an Kieselgel gereinigt.

## Amidierung des Thiazols (24) und Abspaltung der Boc-Schutzgruppe in Lösung

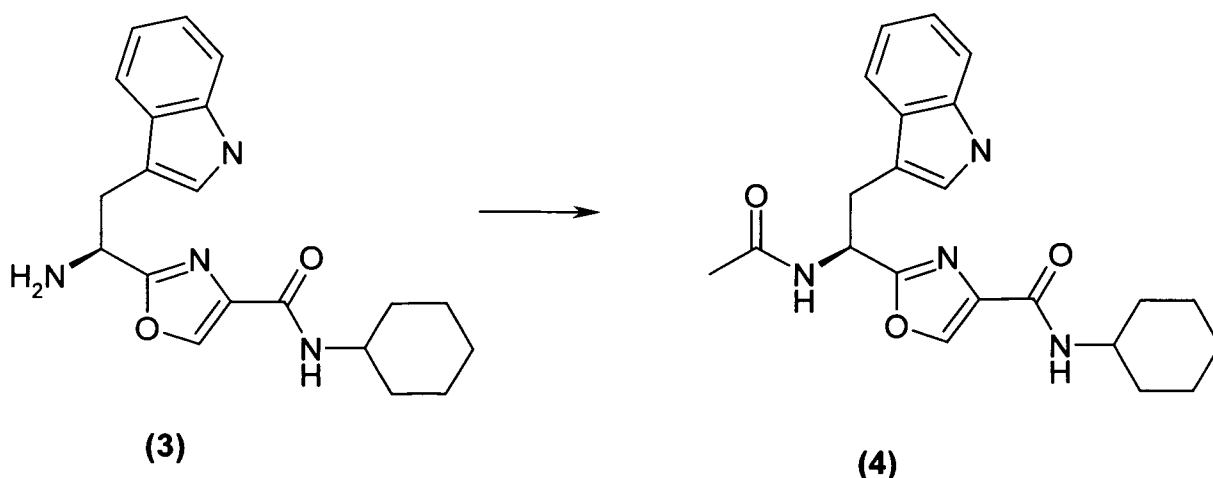


Die Boc-Aminosäure-thiazolcarbonsäure (24) (1 Äquiv.; 0,80 mmol) wurde mit (Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphat (PyBOP) (1,05 Äquiv.; 0,84 mmol; 437 mg) und Triethylamin (TEA) (3 Äquiv.; 2,40 mmol; 242 mg; 330  $\mu$ L) in THF versetzt und 5 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Dann wurde das R3-Amin (1,3 Äquiv.; 1,04 mmol) zugegeben und 18 h bei Raumtemperatur gerührt.

Die Reaktionslösung wurde eingedampft und das Rohprodukt mit einem DCM-MeOH-Gradienten über Kiesegel chromatographiert.

10 Zur Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurden das Amid in 25% TFA in DCM über 1 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend eingedampft. Zu dem Rohprodukt wurde mehrfach Heptan zugegeben und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck wieder abdestilliert. Das Produkt (25) wurde anschließend aus tBuOH / Wasser 4:1 lyophilisiert.

## N-Acetylierung von 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3)



15

Das Aminoalkyl-oxazolcarbonsäureamid (3) (1 Äquiv.; 28  $\mu$ mol; 10 mg) wurde mit Acetanhydrid (5 Äquiv.; 140  $\mu$ mol; 14 mg; 13  $\mu$ L) und TEA (2 Äquiv.; 56  $\mu$ mol; 6 mg; 8  $\mu$ L) in DCM (0,5 mL) versetzt und 18 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionslösung wurde anschließend eingedampft und das Rohprodukt (4) aus tBuOH / Wasser 4:1 lyophilisiert.

### Beispiel B – Nachweis der regenerativen Eigenschaften im *in vitro* Zellkultur-Assay

Zunächst wurden in einer Suspensionskultur typische zelluläre Cluster „Sphären“, ausgehend von aus dem postnatalen Corti'schen Organ der Maus isolierten Stammzellen mit otischem Entwicklungspotential, gezüchtet. Unter im Vergleich zu bekannten Verfahren (Oshima et al., 2007; 5 Senn et al., 2007) optimierten Kulturbedingungen in einem mit *B27* und *N2* supplementierten *DMEM/F12*-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium), konnten aus der Stammzellkultur unter Zugabe von *FGF* (fibroblast growth factor) und *IGF* (insulin-like growth factor) ca. 1.600 solide Sphären pro Corti'sches Organ generiert werden (Abbildung 1C).

10 Durch Markierungen auf Proteinebene (Abbildung 1A) und den Nachweis von mehreren Stammzellmarkern auf mRNA-Ebene (Abbildung 1B) wurde gezeigt, dass sich die unter diesen Kulturbedingungen gebildeten Otosphären in einem dedifferenzierten Zustand befinden, der einem früheren Zustand während der Ontogenese im Corti'schen Organ entspricht. Darüber hinaus können Zellteilungen in den Otosphären nachgewiesen werden.

15 Stützzellen sind *in situ* die potentiellen Vorläufer für eine Regeneration von Haarsinneszellen und damit die eigentlichen Zielzellen für die Induktion einer Haarsinneszellregeneration. Zu diesem Zweck war es erforderlich, *in vitro* eine gemeinsame Kultur von Haar- und Stützzell-ähnlichen Zellen zu etablieren, die das Corti'sche Organ in seiner zellulären Zusammensetzung möglichst gut repräsentiert.

20 Dazu wurden in einem zweiten Schritt die kultivierten Otosphären unter adhärennten Kulturbedingungen auf einer Ornithin / Fibronectin Oberfläche zu, dem ursprünglichen Sinnesepithel möglichst ähnlichen, einschichtigen Epithelinseln differenziert.

Durch immunocytochemischen Nachweis konnten auf Proteinebene je drei geeignete Stütz- und Haarsinneszellmarker identifiziert werden. In Abbildung 2 ist ein Vergleich der Situation im nativen Organ (*in vivo*) und in den differenzierten Epithelinseln der Zellkultur (*in vitro*) anhand dieser 25 Marker zum dargestellt.

Diese mit den bisher bekannten Methoden und ohne Zusatz der erfindungsgemäßen Verbindungen durchgeführten Voruntersuchungen zeigten, dass die kultivierten otischen Epithelinseln 30 als zelluläre Basis für den Nachweis des regenerativen Potentials der erfindungsgemäßen Verbindungen bei Stützzell-ähnlichen Zellen des Innenohrs geeignet sind. Zum Nachweis der Effekte, die durch die applizierten Substanzen vermittelt werden, kann die Veränderung der Protein-Expression von Stütz-, Haar-, und Stammzellmarkern herangezogen werden.

35 Für das Screening wurde zum einen der Anteil *Sox2*-positiver Zellen in der *in vitro* Kultur bestimmt. *Sox2* ist ein Stammzellmarker, der auch während der Ontogenese des Corti'schen Or-

gans exprimiert wird. Ihm wird eine tragende Rolle in der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen und bei der Induktion von pluripotenten Stammzellen aus differenzierten Zellen zugeschrieben (Takahashi und Yamanaka, 2006). Dies macht Sox2, insbesondere im Kontext einer induzierten Dedifferenzierung / Reprogrammierung von Zellen, zu einem wichtigen Marker.

- 5 Durch Zugabe der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) zu der Zellkultur konnte der Anteil Sox2-exprimierender Zellen gegenüber der Differenzierungs-Kontrolle mehr als verdoppelt werden (Abbildung 3).

10 Ob die durch die Verbindungen induzierte Expression von Stammzellmarkern letztlich auch mit einer erhöhten Proliferation der Zellen in Kultur einhergeht, wurde durch die Quantifizierung der *BrdU*-positiven Zellen geprüft. Dabei wurde die Kultur während der Substanzapplikation für 5 h mit dem Thymidin-Analogen *BrdU* inkubiert. Zellteilung führt während der S-Phase des Zellzyklus zur Inkorporation von *BrdU*. Regt eine der Substanzen zu Zellteilungen an, lässt sich dies mit einem gegen *BrdU* gerichteten Antikörper detektieren und visualisieren.

- 15 Durch Zugabe der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) zu der Zellkultur konnte bei 4,8% der zuvor differenzierten Zellen eine Proliferation induziert werden (Abbildung 4).

20 Die erfindungsgemäße Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) erzielte sowohl bezüglich der Sox2-Expression als auch der *BrdU*-Inkorporation signifikant positive Ergebnisse. Damit wurde der Nachweis erbracht, dass sie in der Lage ist, die Dedifferenzierung und nachfolgende Proliferation von otischen Stützzellen zu induzieren.

In einer Dosis-Wirkungs-Analyse wurde der optimale Konzentrationsbereich ermittelt, in dem diese Verbindung ihre maximale regenerationsbiologische Wirkung in der Zellkultur entfaltet.

- 25 Hierzu wurde die *BrdU*-Inkorporation in dem Stammzell-basierten *in vitro* Zellkultur-Assay bei 4 Konzentrationen zwischen 0,3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  im Kulturmedium erfasst. Es zeigte sich, dass für die Konzentration 0,3  $\mu\text{M}$  kein signifikanter Effekt erzielt werden kann. Der Mittelwert bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  aber bereits erhöht ist. Ab einer Konzentration von 3  $\mu\text{M}$  wird bereits das Sättigungsniveau von ca. 9% *BrdU*-positiven Zellen erreicht (Abbildung 5).

- 30 Beispiel C – Nachweis der regenerativen Eigenschaften im *in vitro* Organkulturmodell

Zur Bestätigung der im Zellkultur-Assay beobachteten Effekte im nativen Organ, d.h. *in situ* im komplexen zellulären Verband des Corti'schen Organs, wurde eine Form der Organkultur genutzt, bei der sich das zu kultivierende Gewebe, in diesem Fall das gesamte Innenohr der Maus, in einem rotierenden, mit Kulturmedium gefüllten Zylinder befindet (Hahn et al., 2008). Die

*Cochlea* wurde zuvor basal und apikal im Bereich der *scala tympani* eröffnet. Dadurch konnte der Einfluss der Schwerkraft minimiert und gleichzeitig ein optimaler Gas- und Nährstoffaustausch zwischen dem Gewebe des Corti'schen Organs und dem Kulturmedium erreicht werden. Unter diesen Bedingungen konnte das Explantat im Vergleich zu einer stationären Kultur länger in Kultur erhalten werden.

Zum Nachweis, dass durch die Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen die nach Haarsinneszellverlust im Corti'schen Organ verbleibenden Stützzellen zu Vorläuferzellen differenzieren und nachfolgend proliferieren, wurde eine Situation analog einem schwerhörigen Ohr geschaffen. Nach Applikation des ototoxischen Aminoglykosid-Antibiotikums Neomycin (1 mM) fanden innerhalb von 24 Stunden  $\frac{2}{3}$  aller Haarsinneszellen den Zelltod. Lediglich in den apikalen Bereichen der *Cochlea* überlebten einige Haarsinneszellen, deren Anzahl im Versuchsverlauf durch die initiale Schädigung weiter abnahm. Nach Entfernung des Neomycins aus dem Medium, konnten die verbliebenen Stützzellen weiter kultiviert werden.

Anschließend wurde *BrdU* gleichzeitig mit den erfindungsgemäßen Verbindungen (5  $\mu$ M) in das Kulturmedium appliziert und die Proliferation durch die *BrdU*-Inkorporation nach 4 Tagen quantifiziert.

Nach Zugabe der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (**3**) zu der Organkultur konnte in den am weitesten lateral orientierten Deiterszellen eine *BrdU*-Inkorporation nachgewiesen werden (Abbildung 6B). Dies traf auch für einzelne innere Phalangen- und Grenzzellen zu (Abbildung 6C), die mit der inneren Haarsinneszelle assoziiert sind und als potentielle Vorläuferzellen für deren Regeneration angesehen werden können. In Kontrolleexperimenten ohne Substanzapplikation erfolgte keine spontane Inkorporation von *BrdU* innerhalb der Deiters-, inneren Phalangen- und inneren Grenzzellen (Abbildung 6A).

Die unterschiedliche Morphologie der *BrdU*-positiven Zellkerne deutet auf verschiedene Stadien der Mitose, bis hin zur vollständig durchlaufenen Zellteilung, hin. An verschiedenen Kernen konnte eine Chromatin-Kondensation beobachtet werden (Abbildungen 6D, E). Gleichzeitig wurden *BrdU*-positive Kerne in unmittelbarer, relativer Nähe zueinander nachgewiesen (Abbildungen 6E, F).

Dies bedeutet, dass im Sinnesepithel des Corti'schen Organs durch die Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (**3**) neue Zellen im Sinne einer Regeneration durch Zellteilung von Stützzellen entstanden sind.

#### Beispiel D – Nachweis der regenerativen Eigenschaften nach *in vivo* Applikation

Die regenerationsbiologische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen wurde ebenfalls im *in vivo* Modell des adulten Meerschweinchens nachgewiesen. Durch Impulslärm wurde eine akute Lärmschädigung verursacht, die in einem Verlust von Haarsinneszellen des Corti'schen  
5 Organs, insbesondere im Bereich der äußeren Haarsinneszellen resultierte. Anschließend erfolgte die kontinuierliche lokale Applikation der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (**3**) aus einer subkutan implantierten miniosmotischen Pumpe (Alzet®) via Choleostomie direkt in die *scala tympani* der *Cochlea*. Die Substanz in der Pumpe wurde mit 200 µM entsprechend höher dosiert, da ein Verdünnungseffekt in der Perilymphe zu erwarten war.  
10

Die Applikation erfolgte über einen Zeitraum von 6 Wochen mit einem sich anschließenden Warteintervall von 2 Wochen. Parallel wurde *BrdU* über das Trinkwasser oder die miniosmotische Pumpe verabreicht, um proliferierende Zellen im Corti'schen Organ zu markieren.

Nach Entnahme des Corti'schen Organs erfolgte die immunhistochemische Dreifach-Markierung mit *BrdU* (Zellteilung), *Myosin VI* (Haarsinneszellen) und *DAPI* (Kernfärbung) (Abbildung 7) sowie mit *Sox2* (pluripotente Stützzellen).  
15

*BrdU*-markierte Stützzellen und Haarsinneszellen konnten vorzugsweise in den durch das Lärmtrauma geschädigten Bereichen des Corti'schen Organs nachgewiesen werden. In Kontrollorganen der Gegenseite mit/ohne Lärmschädigung und ohne Substanzapplikation waren  
20 keine *BrdU*-markierten Haarsinneszellen und insgesamt, entsprechend den bekannten Befunden zur Spontanproliferation, nur wenige *BrdU*-markierte Zellen nachweisbar.

Die *in vivo* Befunde zeigen eindeutig, dass durch die Applikation der erfindungsgemäßen Verbindung 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (**3**) eine Re-  
25 generation von Haarsinneszellen auf der Basis von Zellteilungen auch im adulten Tier induziert werden kann. Dies unterstreicht das überraschend große Potential der erfindungsgemäßen Verbindungen als Wirkstoff zur kausalen Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit durch die Regeneration von Haarsinneszellen.

#### Beispiel E – Toxizität

30 In den Zellkultur-, Organkultur- und *in vivo* Untersuchungen ergaben sich für den untersuchten Konzentrationsbereich von 0,3 µM bis 200 µM, keine Hinweise auf eine toxische Wirkung der erfindungsgemäßen Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide.

## Abbildungen

Abbildung 1 Isolation und Kultivierung von Stammzellen aus dem Corti'schen Organ der Maus.

(A) Stammzellen aus dem Innenohr lassen sich gewinnen, indem man die Zellen des postnatalen Corti'schen Organs vereinzelt, die noch enthaltenen Stammzellen isoliert und unter selektiven Bedingungen in einer Suspensionskultur kultiviert. Unter diesen Bedingungen bilden sich Sphären aus, die den Stammzellmarker Sox2 exprimieren (A'), dem eine tragende Rolle in der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen und bei der Induktion von pluripotenten Stammzellen aus differenzierten Zellen zugeschrieben wird (Takahashi und Yamanaka, 2006). Außerdem inkorporieren die Zellkerne in den Sphären BrdU (A''), das die Proliferation der Zellen anzeigt.

(B) In den Sphären werden mehrere Stammzellmarker exprimiert, die sich auch während der Ontogenese im Corti'schen Organ nachweisen lassen. Als Positivkontrolle (pos) wurde die mRNA aus einem Corti'schen Organ vom embryonalen Entwicklungstag 14,5 aufgetragen. Normiert auf das Haushaltsgen GAPDH konnte gezeigt werden, dass sowohl im entstehenden Innenohr als auch in den daraus isolierten Stammzellen *Jag1*, *Nestin*, *Sox2* und *Nanog* exprimiert werden.

(C) Mit optimierten Methoden konnte, im Vergleich zur aktuell publizierten Literatur (Oshima et al., 2007; Senn et al., 2007), der Anteil der aus der Primärkultur gebildeten Sphären verdoppelt werden.

Abbildung 2 *In vivo* und *in vitro* Protein-Expressionsprofil von Haar- und Stützzellmarkern.

(A) *p27<sup>Kip1</sup>* wird in allen Stützzellen des Corti'schen Organs exprimiert. Weder innere noch äußere Haarsinneszellen sind *p27<sup>Kip1</sup>*-positiv. Innerhalb der epithelialen Inseln konnte eine *p27<sup>Kip1</sup>*-Expression nachgewiesen werden (A').

(B) GFAP-Markierung bei Stützzellen im Corti'schen Organ unmittelbar unter den Kernen der Deiterszellen sowie im Bereich der inneren Phalangenzellen. Auch *in vitro* wurde das Muster der Filamente nachgewiesen (B').

(C) *E-Cadherin* markiert alle Stützzellen, die lateral zu den Pfeilerzellen orientiert sind. *E-Cadherin* befindet sich auch in den Membranen der epithelialen Inseln (C').

Haarsinneszellmarker wie *Myosin VIIA* (D), *Myosin VI* (E) und *Calretinin* (F) markieren *in vivo* zuverlässig innere und äußere Haarsinneszellen. Alle Marker sind auch in einzelnen Zellen innerhalb der *in vitro* Kultur nachweisbar (D', E', F').

Die Sterne markieren im nativen Organ jeweils die 3 äußeren Haarsinneszellen und die innere Haarsinneszelle (immer rechts).

Skalierung: 20 µm in den Bildern des naiven Corti'schen Organs (A-F),  
10 µm in der Zellkultur (A'-F').

Abbildung 3 Relative Anzahl von Zellen mit Sox2-Expression im Screening-Assay.

Es wurde untersucht, welche der niedermolekularen Verbindungen eine Erhöhung des Anteils Sox2-positiver Zellen (als Marker für die Dedifferenzierung von Zellen, normiert auf das Niveau der Differenzierungs-Kontrolle) induzieren konnten.

5 Sieben Verbindungen unterscheiden sich signifikant von der Kontrolle ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ).

Abbildung 4 Relative Anzahl *BrdU*-positiver Zellen im Screening-Assay.

Durch den Nachweis von *BrdU* kann quantifiziert werden, wie viele Zellen innerhalb eines bestimmten Zeitraums in die S-Phase des Zellzyklus eingetreten sind. Im Screening wurden die Zellen für fünf Stunden mit *BrdU* inkubiert.

10 Dargestellt ist der Anteil von Zellen in der Gesamtpopulation, die durch Substanzapplikation zur Proliferation angeregt wurden.

Acht Verbindungen konnten eine signifikante Proliferation induzieren ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ).

15 Abbildung 5 Dosis-Wirkungs-Analyse für 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) (Substanz 33).

In der Adhäsionskultur wurde die Dosis-Abhängigkeit des induzierten *BrdU*-Effektes überprüft. Bei Erhöhung der Substanzkonzentration im Kulturmedium von

20 0,3  $\mu\text{M}$  auf 3  $\mu\text{M}$  stieg die *BrdU*-Inkorporation auf ein signifikant höheres Niveau ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ). Mit höheren Konzentrationen konnte die *BrdU*-Inkorporation nicht weiter gesteigert werden. Die Kontrolle, eine Population von Zellen aus der *in vitro* Kultur mit einer vergleichbaren Menge DMSO ohne Substanzapplikation, vermittelte keinen Effekt.

25 Abbildung 6 Durch 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) (Substanz 33) induzierte *BrdU*-Inkorporation im Organkultur-Modell.

Durch *BrdU*-Inkorporation wurde der Umfang der induzierten Proliferation von Stützzellen nachgewiesen.

30 In der Kontrolle ohne Substanzapplikation wurde in den Deiters-, den inneren Phalangen- und den Grenzzellen keine *BrdU*-Inkorporation festgestellt (A). Nach Applikation der erfindungsgemäßen Verbindung (3) (Substanz 33, 5  $\mu\text{M}$ ) wurde in lateral orientierten Deiterszellen (B) sowie in einzelnen inneren Phalangen- sowie inneren Grenzzellen (C) *BrdU* inkorporiert.

Die *BrdU*-positiven Zellkerne befanden sich in verschiedenen Stadien der Mitose bzw. hatten die Zellteilung vollständig durchlaufen (D, E, F).

35 Skalierung: 20  $\mu\text{m}$ .

Abbildung 7 Dreifach-Markierung nach intracochleärer Applikation von 2-[1-Amino-2-(1H-indol-3-yl)-ethyl]-oxazol-4-carbonsäure-cyclohexylamid (3) *in vivo*.

Im *in vivo* Experiment am adulten Meerschweinchen wurde die regenerative Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen unter realen Bedingungen nachgewiesen (Applikation über 6 Wochen durch Alzet<sup>®</sup>-Pumpe (200 µM) parallel mit *BrdU* (100 mg/mL), Organentnahme und Färbung nach 8,5 Wochen).

Dargestellt sind mit *Myosin VI* (Marker für Haarsinneszellen) und *BrdU* (Marker für Zellteilung) markierte innere Haarsinneszellen. Der Zellkern ist mit DAPI (Kernfärbung) markiert.

Die Markierung mit *BrdU* zeigt die Regeneration auf Basis einer Zellteilung an.

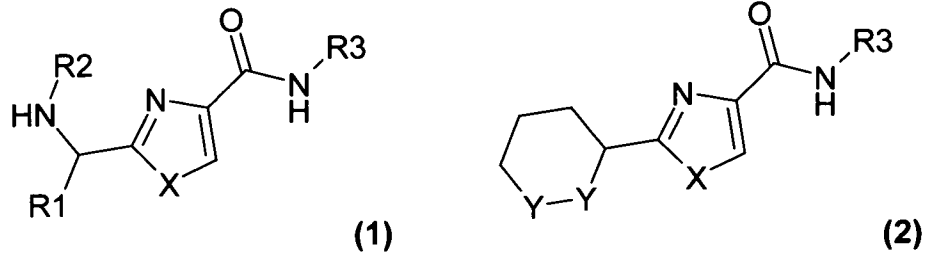
## Literatur

1. Chen S, Zhang Q, Wu X, Schultz PG, Ding S (2004) Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J Am Chem Soc* 126(2):410-411
- 5 2. Corwin JT, Cotanche DA (1988) Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240:1772-1774
3. Cotanche DA (1987) Regeneration of hair cell stereocilia bundles in the chick cochlea following severe acoustic trauma. *Hear Res* 30:181-196
4. Cotanche DA (1999) Structural recovery from sound and aminoglycoside damage in the avian cochlea. *Audiol Neurootol* 4:271-285
- 10 5. Cruz RM, Lambert PM, Rubel EW (1987) Light microscopic evidence of hair cell regeneration after gentamicin toxicity in chick cochlea. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 113:1058-1062
6. Daudet N, Vago P, Ripoll C, Humbert G, Pujol R, Lenoir M (1998) Characterization of atypical cells in the juvenile rat organ of Corti after aminoglycoside ototoxicity. *J Comp Neurol* 401:145-162
- 15 7. Daudet N, Ripoll C, Lenoir M (2002) Transforming growth factor induced cellular changes in organotypic cultures of juvenile, amikacin-treated rat organ of Corti. *J Comp Neurol* 442:6-22
8. Feng B, Ng JH, Heng JC, Ng HH (2009) Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4(4):301-312
9. Hahn H, Müller M, Löwenheim H (2008) Whole organ culture of the postnatal sensory inner ear in simulated microgravity. *J Neurosci Meth* 171(1):60-71
- 20 10. ifo-Institut für Wirtschaftsforschung in Zusammenarbeit mit Infratest Gesundheitsforschung im Auftrag des Deutschen Grünen Kreuzes, Marburg „Hörtest 1985“, Sektion „Gutes Hören“ (1986)
11. Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, Raphael Y (2005) Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11:271-276
- 25 12. Kaiser D, Videnov G, Maichle-Mössmer C, Strähle J, Jung G (2000) X-ray structures and *ab initio* study of the conformational properties of novel oxazole and thiazole containing di- and tripeptide mimetics. *J Chem Soc Perkin Trans 2*:1081-1085
13. Kawamoto K, Ishimoto SI, Minoda R, Brough DE, Raphael Y (2003) Math1 gene transfer generates new cochlear hair cells in mature guinea pigs *in vivo*. *J Neurosci* 23:4395-4400
- 30 14. Kelley MW, Talreja DR, Corwin JT (1995) Replacement of hair cells after laser microbeam irradiation in cultured organs of Corti from embryonic and neonatal mice. *J Neurosci* 15:3013-3026
15. Kim S, Rosania GR, Chang YT (2004) Dedifferentiation? What's next? *Mol Interv* 4:83-85
16. Li H, Liu H, Heller S (2003) Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9:1293-1299
- 35 17. Li W, Ding S (2009) Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol Sci* 31(1):36-45
18. Martinez-Monedero R, Edge AS (2007a) Stem cells for the replacement of inner ear neurons and hair cells. *Int J Dev Biol* 51:655-661
- 40 19. Martinez-Monedero R, Oshima K, Heller S, Edge AS (2007b) The potential role of endogenous stem cells in regeneration of the inner ear. *Hear Res* 227:48-52
20. McGann CJ, Odelberg SJ, Keating MT (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by new regeneration extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(24):13699-13704
21. Nadol JB Jr (1993) Hearing Loss. *N Engl J Med* 329:1092-1102
- 45 22. Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim TS, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J (2004) Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 15:1-4
23. Odelberg SJ (2002) Inducing cellular dedifferentiation: a potential method for enhancing endogenous regeneration in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 13(5):335-343

24. Oshima K, Grimm CM, Corrales CE, Senn P, Martinez-Monedero R, Géléoc GS, Edge AS, Holt JR, Heller S (2007) Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:18-31
- 5 25. Roberson DW, Rubel EW (1994) Cell division in the gerbil cochlea after acoustic trauma. *Am J Otol* 15:28-34
26. Ruben RJ (1967) Development of the inner ear of the mouse. A autoradiographic study of terminal mitosis. *Acta Otolaryngol (Stockh) [Suppl]* 220:1-44
27. Ryals BM, Rubel EW (1988) Hair cell regeneration after acoustic trauma in adult Coturnix Quail. *Science* 240:1774-1776
- 10 28. Schugar RC, Robbins PD, Deasy BM (2008) Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Ther* 15(2):126-135
29. Senn P, Oshima K, Teo D, Grimm C, Heller S (2007) Robust postmortem survival of murine vestibular and cochlear stem cells. *J Assoc Res Otolaryngol* 8(2):194-204
- 15 30. Smolders JWT (1999) Functional recovery in the avian ear after hair cell regeneration. *Audiol Neurootol* 4:286-302
31. Staecker H, Lefebvre PP, Malgrange B, Moonen G, Van De Water TR (1995) Technical comments: Regeneration and mammalian auditory hair cells. *Science* 267(5198):709-711
- 20 32. Stanchev M, Tabakova S, Videnov G, Golovinsky E, Jung G (1999) Synthesis and antimicrobial activity *in vitro* of new amino acids and peptides containing thiazole and oxazole moieties. *Arch Pharm* 332:297-304
33. Stankova IG, Videnov GI, Golovinsky EV, Jung G (1999) Synthesis of thiazole, imidazole and oxazole containing amino acids for peptide backbone modification. *J Peptide Sci* 5:392-398
34. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676
- 25 35. Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, Yamada S, Kageyama R, Anito Y, Ito J (2003) Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 14:1677-1681
36. Tsonis PA (2000) Regeneration in vertebrates. *Dev Biol* 221(2):273-284
37. Tsonis PA (2002) Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation* 70(8):397-409
- 30 38. Tsonis PA (2004) Stem cells from differentiated cells. *Mol Interv* 4(2):81-83
39. Vago P, Humbert G, Lenoir M (1998) Amikacin intoxication induces apoptosis and cell proliferation in rat organ of Corti. *Neuroreport* 9:431-436
- 35 40. Videnov G, Kaiser D, Kempter, C, Jung G (1996) Synthesis of naturally occurring, conformationally restricted oxazole- and thiazole containing di- and tripeptide mimetics. *Angew Chem Int Ed Engl* 35(13/14):1503-1506
41. White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N (2006) Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 441:984-987
42. Xu Y, Shi Y, Ding S (2008) A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine. *Nature* 453(7193):338-344
- 40 43. Yamasoba T, Kondo K, Miyajima C, Suzuki M (2003) Changes in cell proliferation in rat and guinea pig cochlea after aminoglycoside-induced damage. *Neurosci Lett* 347:171-174
44. Yamasoba T, Kondo K (2006) Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea *in vivo*. *Cell Tissue Res* 325: 23-31

## Patentansprüche

### 1. Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide nach den Formeln



wobei

X für O oder S,

Y für C oder N, wobei beide Atome verschieden sein müssen,

R2 für Wasserstoff oder Acyl und

R1 und R3, die gleich oder verschieden sein können, für einen Substituenten aus den folgenden Gruppen stehen:

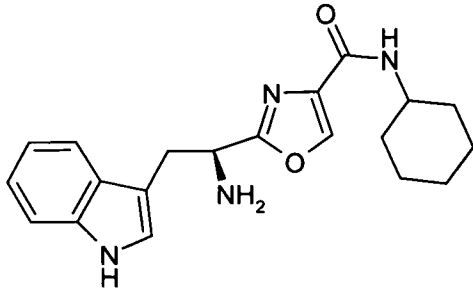
verzweigte oder unverzweigte, substituierte oder unsubstituierte, optional Heteroatome enthaltende Alkylgruppen, Alkylcycloalkylgruppen, Alkylarylgruppen, Cycloalkylgruppen, Cycloalkylarylgruppen, Arylgruppen und Arylcycloalkylgruppen,

wobei R1 bevorzugt für (1H-Indol-3-yl)-ethyl und R3 bevorzugt für Cyclohexyl steht,

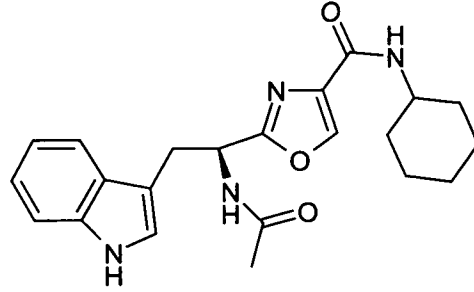
oder

ein pharmazeutisch akzeptables Salz, ein Stereoisomer, ein Stereoisomeren-Gemisch, ein Tautomer oder eine Prodrug-Verbindung, bevorzugt ein Prodrug-Ester oder ein Prodrug-Peptid, davon.

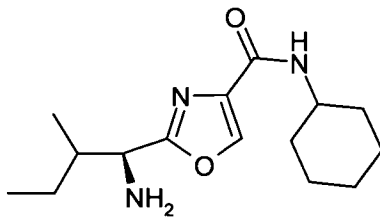
## 2. Verbindungen nach Anspruch 1 ausgewählt aus der Gruppe



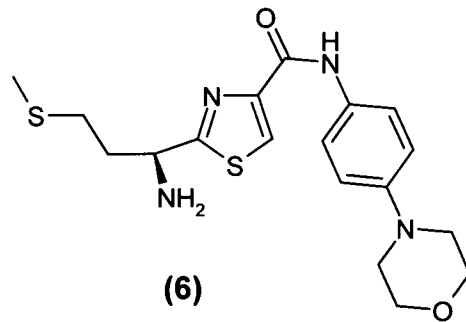
(3)



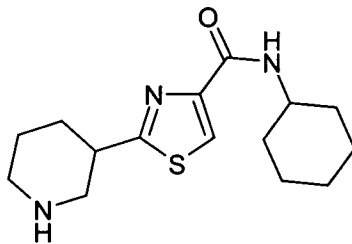
(4)



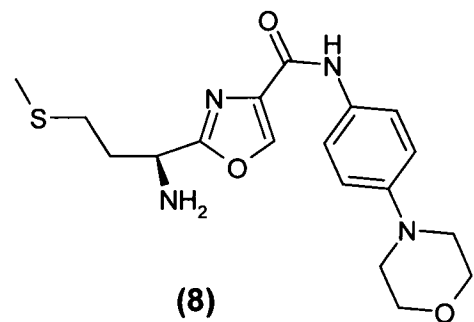
(5)



(6)



(7)



(8)

oder

ein pharmazeutisch akzeptables Salz, ein Stereoisomer, ein Stereoisomeren-Gemisch, ein Tautomer oder eine Prodrug-Verbindung, bevorzugt ein Prodrug-Ester oder ein Prodrug-Peptid, davon.

3. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 zur Verwendung für jedweden medizinischen Zweck, bevorzugt als Medikament für verschiedene Indikationen in der Human- und Veterinärmedizin.

4. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 als regenerationsfördernder Wirkstoff, dadurch gekennzeichnet, dass sie bei Einwirkung einer therapeutisch effektiven Menge auf das geschädigte Gewebe von hochspezialisierten Organen und Geweben, bevorzugt dem Gehirn, dem Herz, der Skelettmuskulatur, und besonders bevorzugt von Sinnesepithelien, die endogene *in situ* Regeneration des normalerweise postmitotischen Gewebes durch regenerationsbiologische Wirkungen wie Dedifferenzierung, Proliferation und nachfolgende Redifferenzierung von terminal differenzierten Zellen stimuliert.
5. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 als regenerationsfördernder Wirkstoff zur Regeneration der otischen Sinnesepithelien beim Säuger, dadurch gekennzeichnet, dass sie bei Einwirkung einer therapeutisch effektiven Menge die endogene *in situ* Regeneration geschädigter und verlorener Haarsinneszellen im Corti'schen Organ durch regenerationsbiologische Wirkungen wie Dedifferenzierung, Proliferation und nachfolgende Redifferenzierung von Stützzellen im Innenohr stimuliert.
6. Verfahren zur Herstellung der Aminoalkyl-oxazol- und Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamide nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Cyclisierung zum Oxazol bzw. Thiazol und deren nachfolgende Amidierung ausgehend von einer natürlichen oder unnatürlichen zu amidierenden Aminosäure an fester Phase oder unter Verwendung der Boc-Schutzgruppen-Chemie in Lösung erfolgt.
7. Pharmazeutisches Präparat, enthaltend eine therapeutisch effektive Menge mindestens eines Aminoalkyl-oxazol- oder Aminoalkyl-thiazolcarbonsäureamides nach einem der Ansprüche 1 und 2 allein oder in Kombination, optional weitere regenerationsfördernde oder anderweitig therapierelevante Wirkstoffe sowie weitere pharmazeutisch geeignete Inhaltsstoffe wie z.B. Trägersubstanzen, Hilfs- und Zusatzstoffe, Detergentien, Adjuvantien und andere.
8. Pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es in einer für die direkte (lokale) oder indirekte (einschließlich der systemischen) Applikation auf/an das geschädigte Gewebe bzw. auf/in die *Cochlea* des Säugers geeigneten Formulierung, bevorzugt als Lösung, Suspension, Spray, Gel, Hydrogel, Lotion, Emulsion, Paste, Salbe oder Creme vorliegt.
9. Verfahren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates nach den Ansprüchen 7 und 8, dadurch gekennzeichnet, dass man die Bestandteile vermischt und/oder in Lösung bringt und/oder mit einem physikalischen oder biologischen Träger assoziiert.

10. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 oder eines pharmazeutischen Präparates nach einem der Ansprüche 7 bis 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur kausalen Behandlung von Erkrankungen beim Säuger, die mit geschädigten postmitotischen Geweben in Zusammenhang stehen, auf regenerationsbiologischer Grundlage durch unmittelbare oder mittelbare Applikation einer therapeutisch effektiven Menge auf/an die geschädigten Gewebestrukturen.
11. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 oder eines pharmazeutischen Präparates nach einem der Ansprüche 7 bis 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur kausalen Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit und Wiederherstellung des Hörvermögens beim Säuger nach Schädigung und Verlust der Haarsinneszellen im Corti'schen Organ auf regenerationsbiologischer Grundlage durch unmittelbare oder mittelbare Applikation einer therapeutisch effektiven Menge auf/an die geschädigten Gewebestrukturen in der *Cochlea*.
12. Verfahren zur kausalen Behandlung von Erkrankungen von Menschen und Tieren, die mit geschädigten postmitotischen Geweben in Zusammenhang stehen, auf regenerationsbiologischer Grundlage, dadurch gekennzeichnet, dass eine therapeutisch effektive Menge einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 oder eines pharmazeutischen Präparates nach einem der Ansprüche 7 bis 9 unmittelbar, vorzugsweise lokal, auf/an die geschädigten Gewebestrukturen aufgetragen oder mittelbar, vorzugsweise systemisch, verabreicht wird.
13. Verfahren zur kausalen Behandlung der Innenohrschwerhörigkeit und zur Wiederherstellung des Hörvermögens von Menschen und Tieren nach Schädigung und Verlust der Haarsinneszellen im Corti'schen Organ auf regenerationsbiologischer Grundlage, dadurch gekennzeichnet, dass eine therapeutisch effektive Menge einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 und 2 oder eines pharmazeutischen Präparates nach einem der Ansprüche 7 bis 9 unmittelbar oder mittelbar auf/an die geschädigten Gewebestrukturen in der *Cochlea*, vorzugsweise transtympanal durch Injektion in das Mittelohr, durch Auftragen an das runde oder ovale Fenster des Innenohres oder durch Injektion in das Innenohr appliziert wird.

-----

Zeichnungen

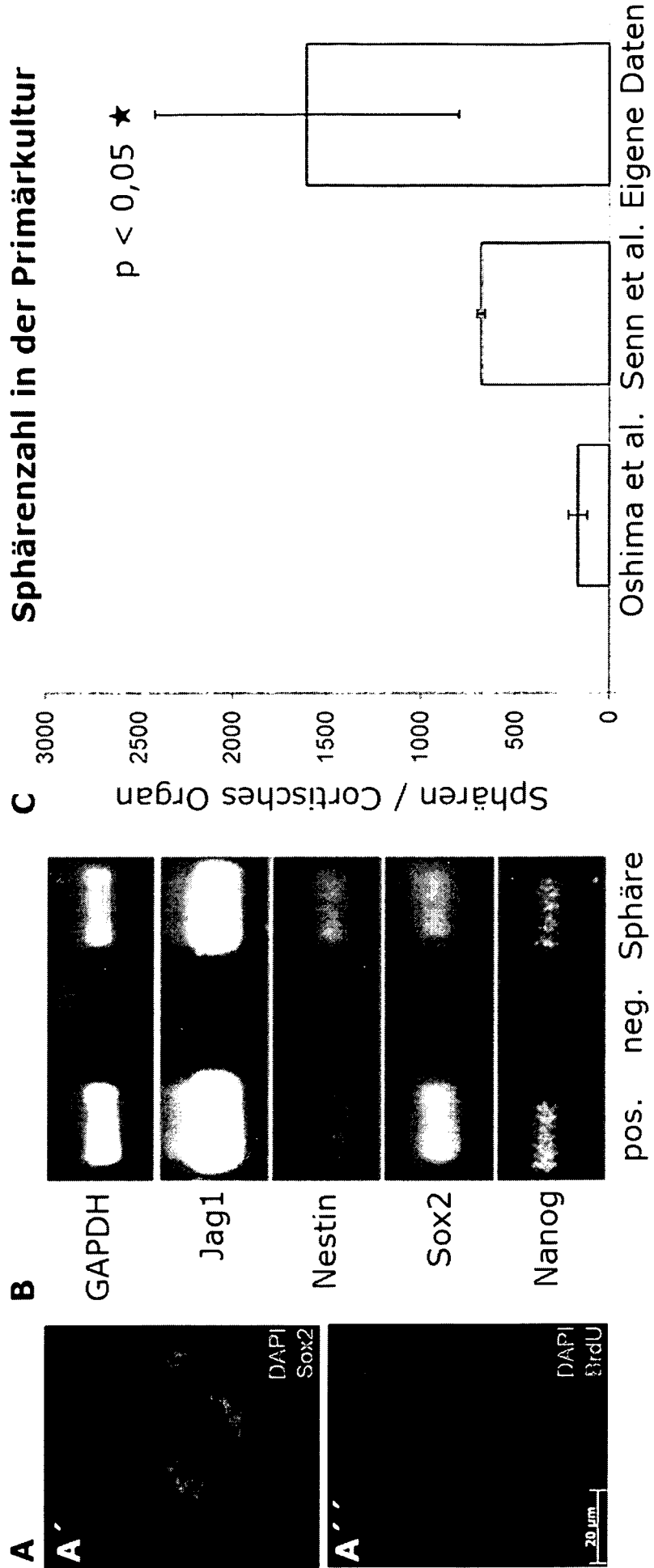


Abbildung 1

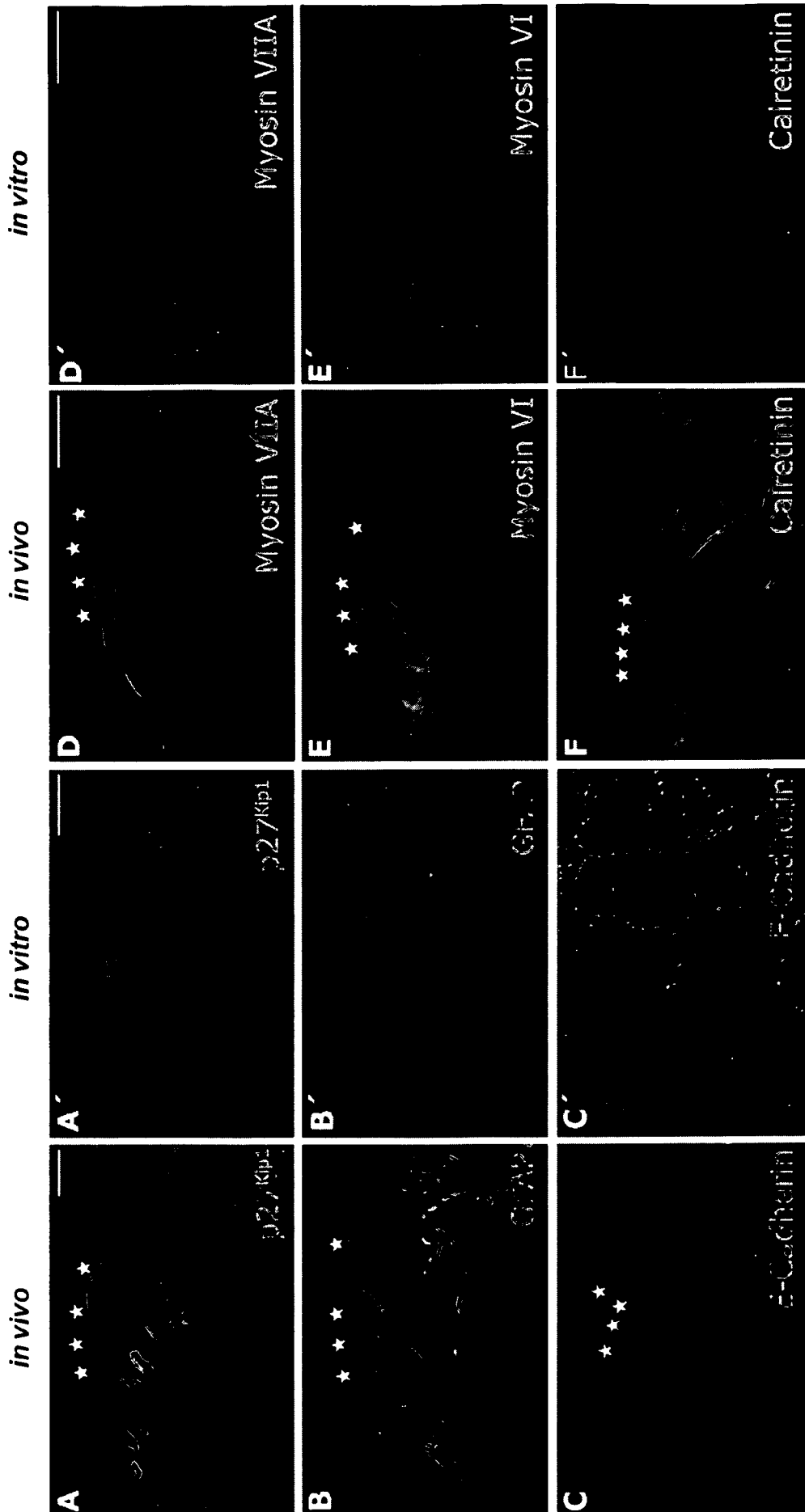


Abbildung 2

**Substanzstimulierte relative Sox2-Expression**

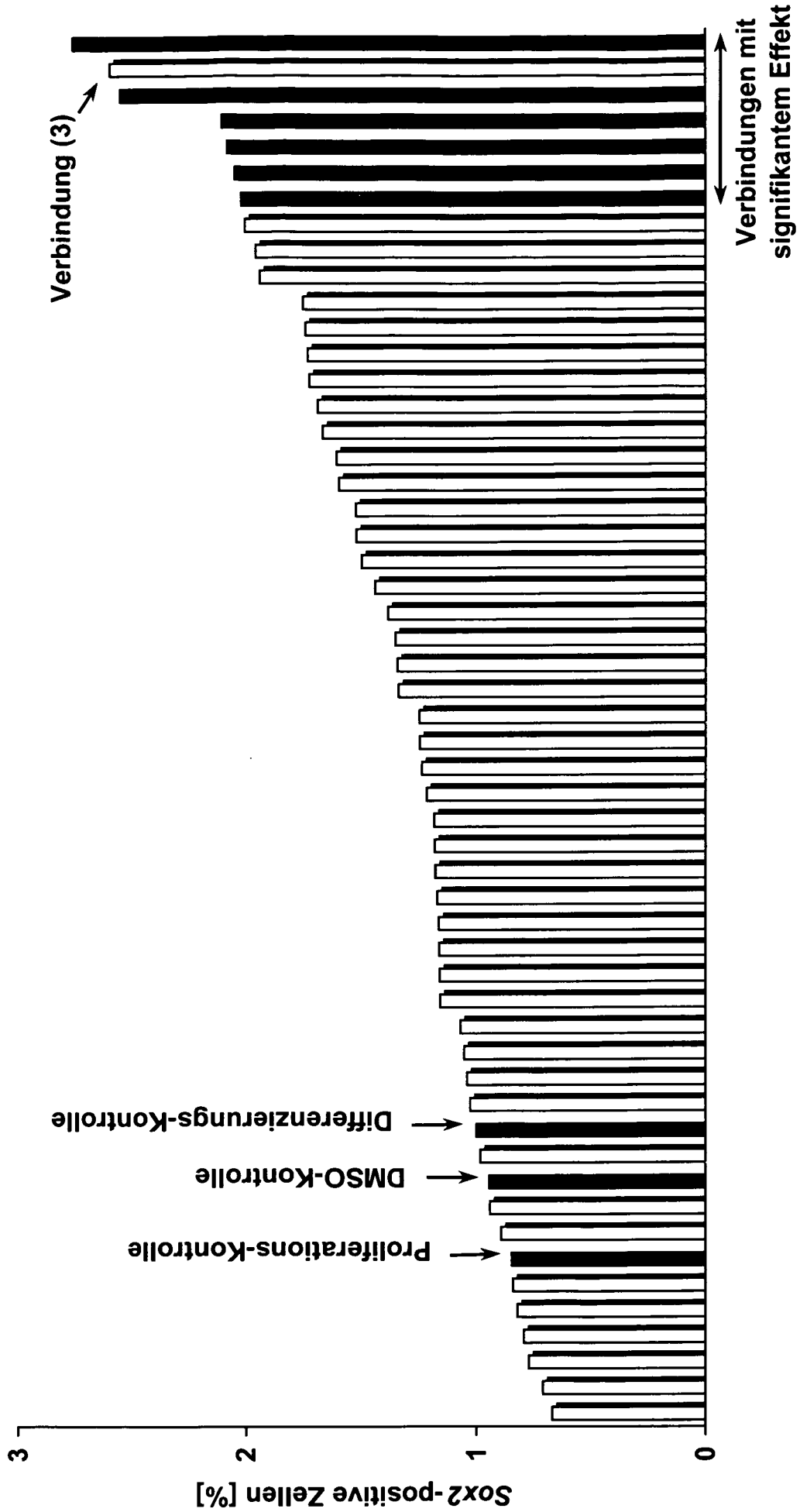


Abbildung 3

Substanzstimulierte relative BrdU -Inkorporation

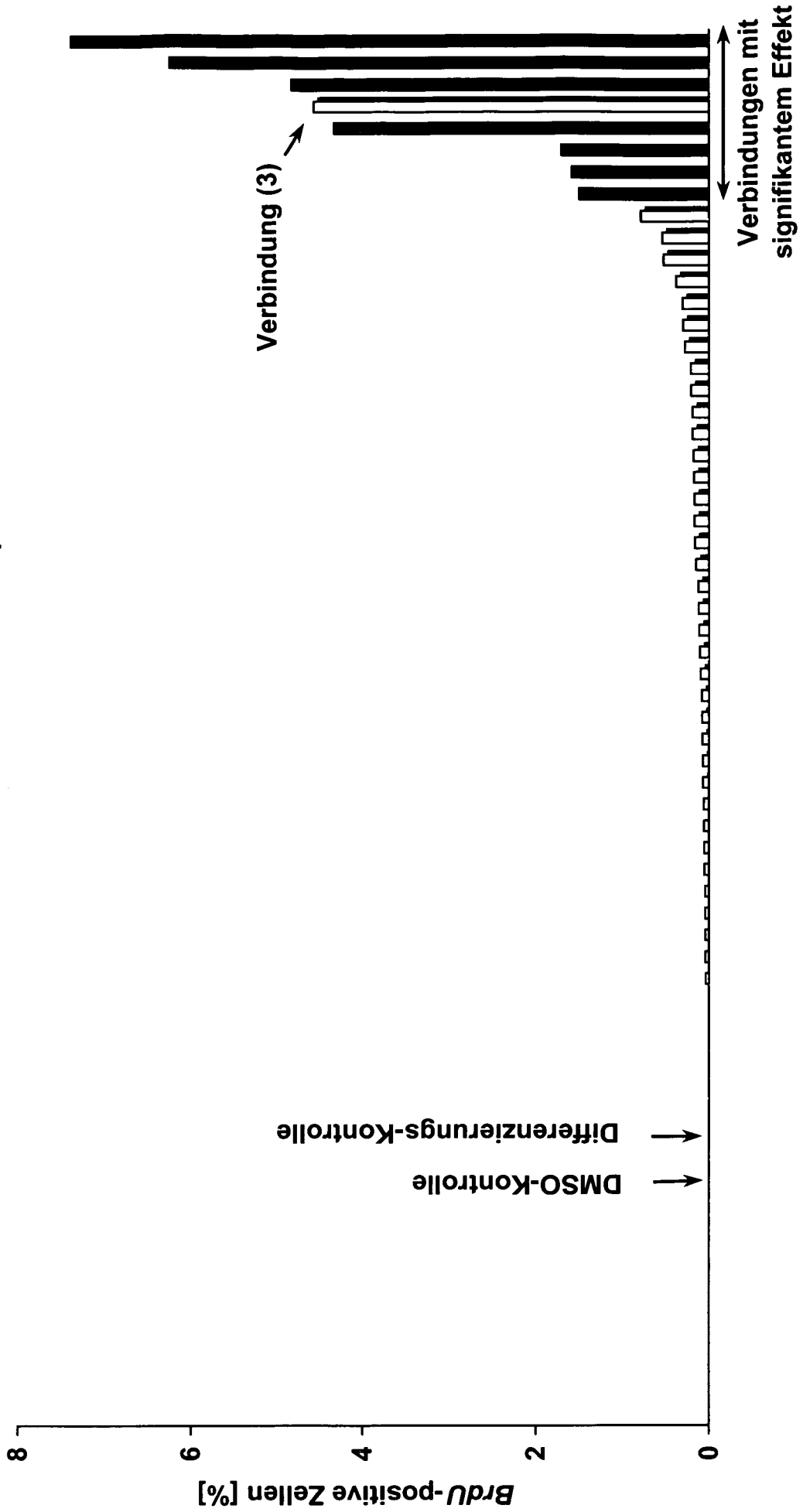


Abbildung 4

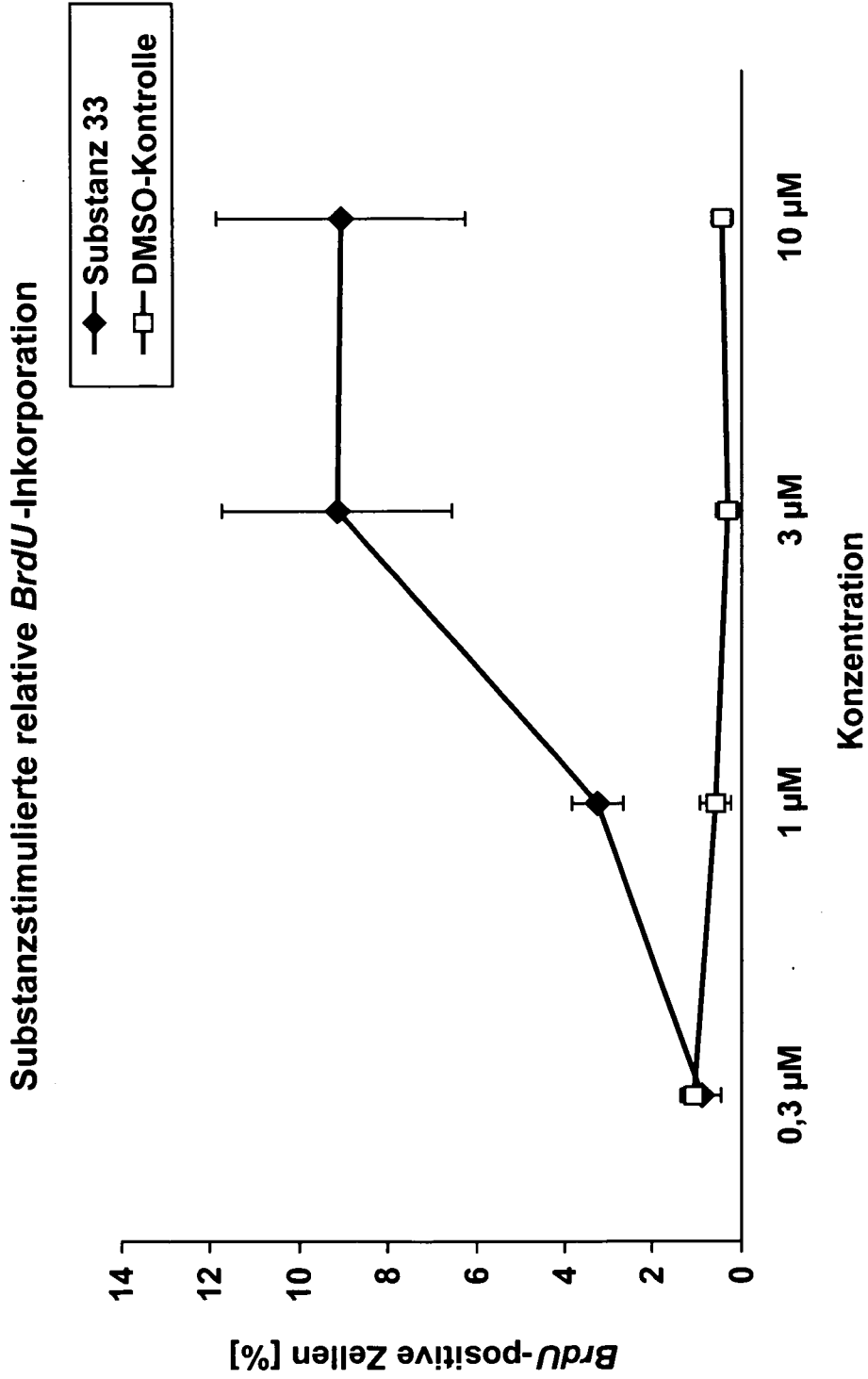


Abbildung 5

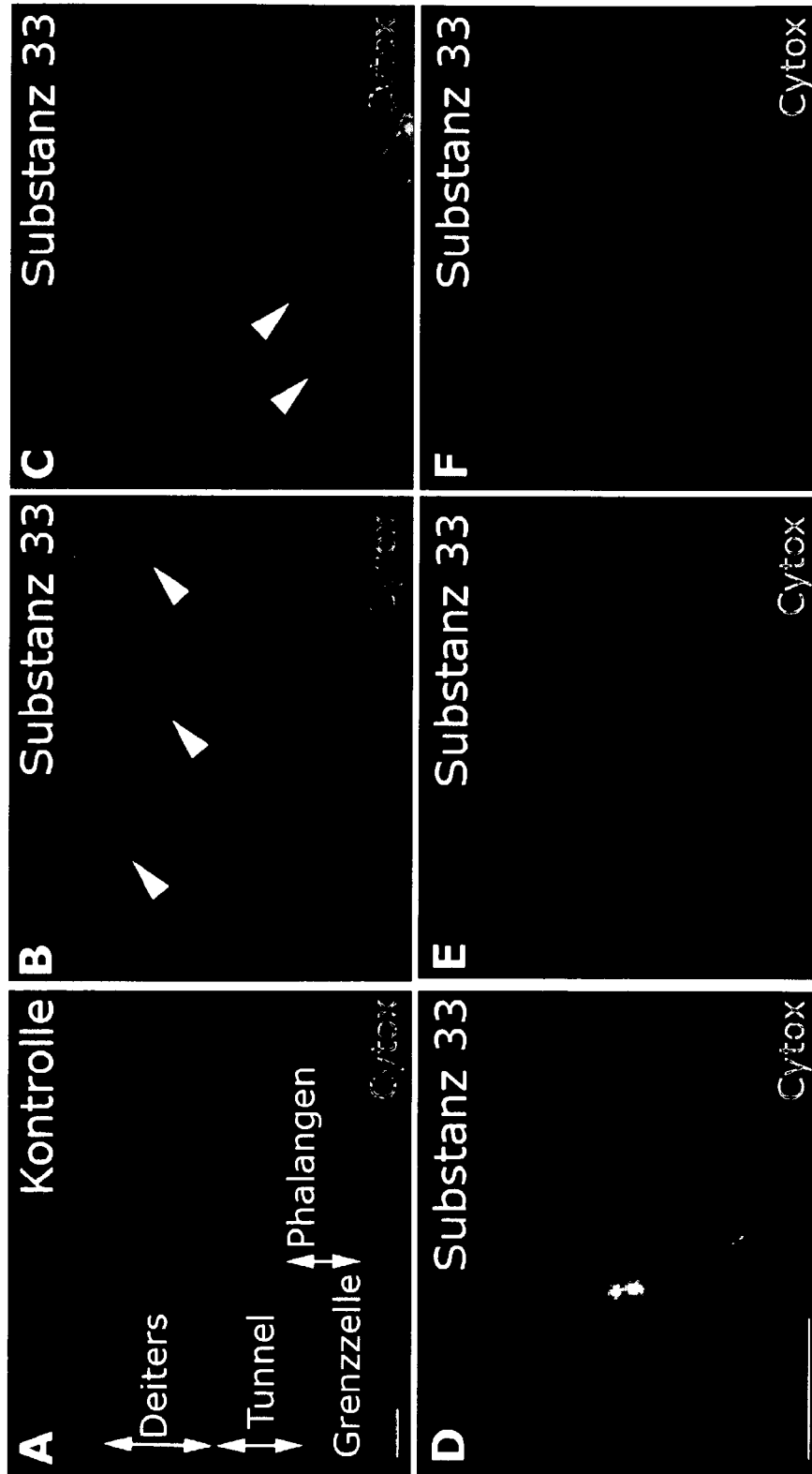


Abbildung 6

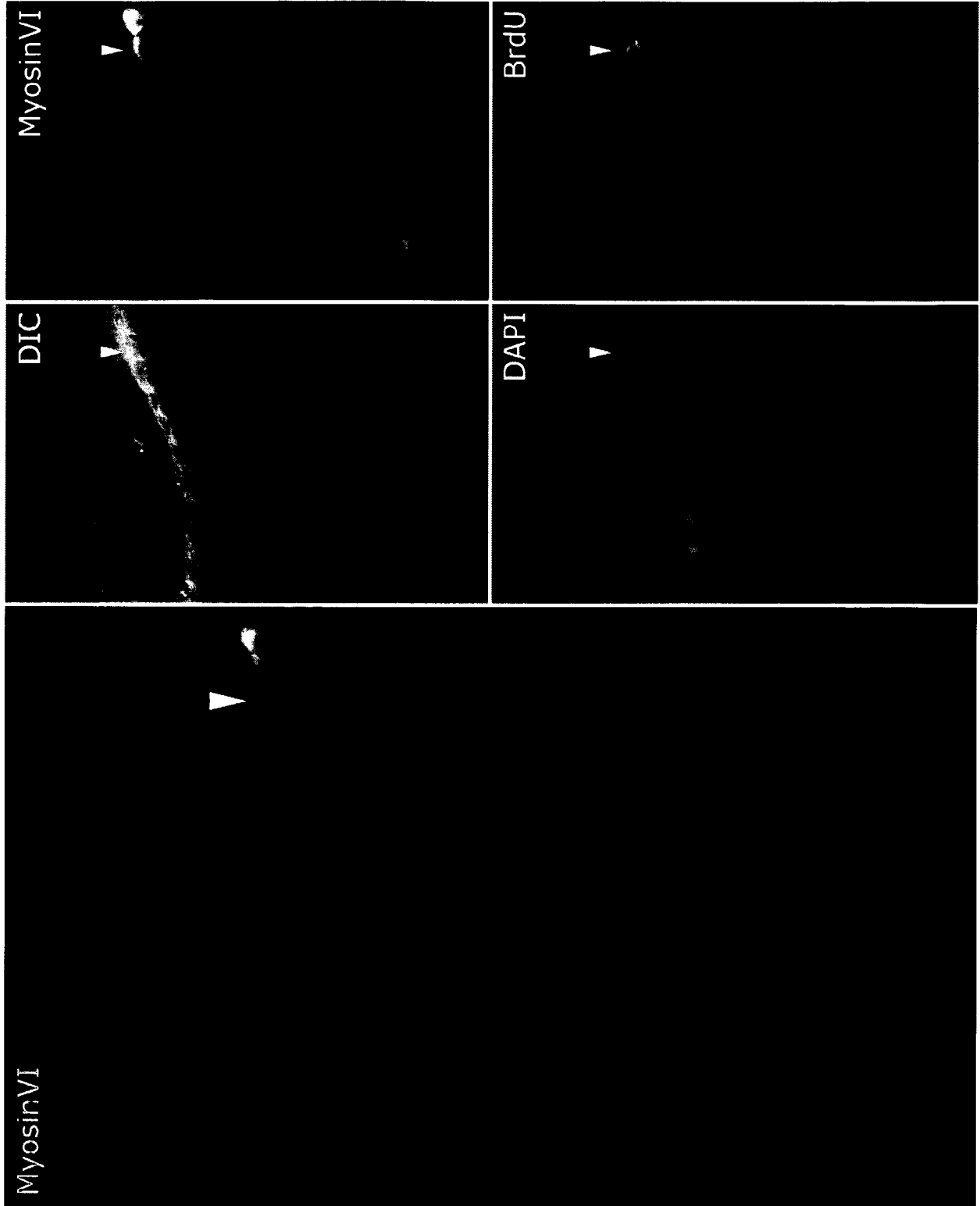


Abbildung 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/000502

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 INV. C07D263/34 C07D413/06 C07D413/12 C07D417/04 C07D417/12  
 A61K31/421 A61K31/422 A61K31/427 A61P27/16  
 ADD.  
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED  
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 C07D  
 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)  
 EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 009 005 A1 (ASTELLAS PHARMA INC [JP]) 31 December 2008 (2008-12-31) claim 1; examples 770,772,773 -----	1
A	WO 99/42088 A2 (OTOGENE AG [DE]; LOEWENHEIM HUBERT [DE]) 26 August 1999 (1999-08-26) the whole document -----	3-5,7-13
A	WO 02/04605 A2 (OTOGENE USA INC [US]; OTOGENE AG [DE] SOUND PHARMACEUTICALS INC [US]) 17 January 2002 (2002-01-17) the whole document -----	3-5,7-13
A	WO 00/18407 A1 (CEPHALON INC [US]) 6 April 2000 (2000-04-06) the whole document -----	3-5,7-13
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  29 March 2011	Date of mailing of the international search report  26/05/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Von Daacke, Axel

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2011/000502

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LÖWENHEIM,H. ET AL.: "Regenerative Medizin in der Therapie der Innenohrschwerhörigkeit", HNO, vol. 56, no. 3, 22 February 2008 (2008-02-22), pages 288-300, XP002630413, DOI: 10.1007/s00106-008-1689-y the whole document -----	3-5,7-13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/000502

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP 2009005	A1	31-12-2008	CA 2649043 A1	01-11-2007
			CN 101426774 A	06-05-2009
			WO 2007123269 A1	01-11-2007
			KR 20090004976 A	12-01-2009
			US 2009286766 A1	19-11-2009
-----				
WO 9942088	A2	26-08-1999	AT 250936 T	15-10-2003
			AU 763868 B2	31-07-2003
			AU 2928199 A	06-09-1999
			CA 2320717 A1	26-08-1999
			DE 19807426 A1	14-10-1999
			DE 59907195 D1	06-11-2003
			DK 1056467 T3	09-02-2004
			EP 1056467 A2	06-12-2000
			ES 2211055 T3	01-07-2004
			JP 2002503687 T	05-02-2002
			PT 1056467 E	27-02-2004
			US 7087581 B1	08-08-2006
			-----	
WO 0204605	A2	17-01-2002	AU 8821901 A	21-01-2002
			AU 2001288219 B2	23-11-2006
			CA 2412764 A1	17-01-2002
			CN 1441841 A	10-09-2003
			EP 1307542 A2	07-05-2003
			JP 2004502785 T	29-01-2004
-----				
WO 0018407	A1	06-04-2000	AT 361752 T	15-06-2007
			AU 763435 B2	24-07-2003
			AU 6053299 A	17-04-2000
			CA 2345295 A1	06-04-2000
			CN 1328461 A	26-12-2001
			DE 69936059 T2	24-01-2008
			EP 1126855 A1	29-08-2001
			ES 2288042 T3	16-12-2007
			HK 1040053 A1	21-09-2007
			JP 2002525329 T	13-08-2002
			NZ 511024 A	31-10-2003
			-----	

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/000502

<b>A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> INV. C07D263/34 C07D413/06 C07D413/12 C07D417/04 C07D417/12 A61K31/421 A61K31/422 A61K31/427 A61P27/16 ADD. Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) C07D Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 2 009 005 A1 (ASTELLAS PHARMA INC [JP]) 31. Dezember 2008 (2008-12-31) Anspruch 1; Beispiele 770,772,773 -----	1
A	WO 99/42088 A2 (OTOGENE AG [DE]; LOEWENHEIM HUBERT [DE]) 26. August 1999 (1999-08-26) das ganze Dokument -----	3-5,7-13
A	WO 02/04605 A2 (OTOGENE USA INC [US]; OTOGENE AG [DE] SOUND PHARMACEUTICALS INC [US]) 17. Januar 2002 (2002-01-17) das ganze Dokument -----	3-5,7-13
A	WO 00/18407 A1 (CEPHALON INC [US]) 6. April 2000 (2000-04-06) das ganze Dokument -----	3-5,7-13
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
29. März 2011		26/05/2011
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Von Daacke, Axel

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LÖWENHEIM,H. ET AL.: "Regenerative Medizin in der Therapie der Innenohrschwerhörigkeit", HNO, Bd. 56, Nr. 3, 22. Februar 2008 (2008-02-22), Seiten 288-300, XP002630413, DOI: 10.1007/s00106-008-1689-y das ganze Dokument -----	3-5,7-13

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2011/000502

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 2009005	A1	31-12-2008	CA 2649043 A1 01-11-2007
			CN 101426774 A 06-05-2009
			WO 2007123269 A1 01-11-2007
			KR 20090004976 A 12-01-2009
			US 2009286766 A1 19-11-2009
-----			
WO 9942088	A2	26-08-1999	AT 250936 T 15-10-2003
			AU 763868 B2 31-07-2003
			AU 2928199 A 06-09-1999
			CA 2320717 A1 26-08-1999
			DE 19807426 A1 14-10-1999
			DE 59907195 D1 06-11-2003
			DK 1056467 T3 09-02-2004
			EP 1056467 A2 06-12-2000
			ES 2211055 T3 01-07-2004
			JP 2002503687 T 05-02-2002
			PT 1056467 E 27-02-2004
			US 7087581 B1 08-08-2006
-----			
WO 0204605	A2	17-01-2002	AU 8821901 A 21-01-2002
			AU 2001288219 B2 23-11-2006
			CA 2412764 A1 17-01-2002
			CN 1441841 A 10-09-2003
			EP 1307542 A2 07-05-2003
			JP 2004502785 T 29-01-2004
-----			
WO 0018407	A1	06-04-2000	AT 361752 T 15-06-2007
			AU 763435 B2 24-07-2003
			AU 6053299 A 17-04-2000
			CA 2345295 A1 06-04-2000
			CN 1328461 A 26-12-2001
			DE 69936059 T2 24-01-2008
			EP 1126855 A1 29-08-2001
			ES 2288042 T3 16-12-2007
			HK 1040053 A1 21-09-2007
			JP 2002525329 T 13-08-2002
			NZ 511024 A 31-10-2003
			-----