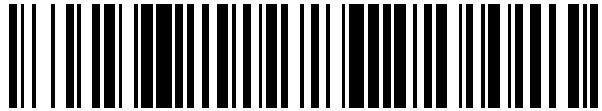


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 065**

51 Int. Cl.:

A61K 31/135 (2006.01)

A01N 33/12 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.09.2008 E 08831300 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2203050**

54 Título: **Uso tópico de R(+)-N-propargil-1-aminoindano para tratar o prevenir sordera parcial**

30 Prioridad:

17.09.2007 US 994222 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.02.2014

73 Titular/es:

**TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LTD.
(100.0%)
5 BASEL STREET P.O. BOX 3190
49131 PETAH TIQVA, IL**

72 Inventor/es:

**LENDVAI, BALAZS;
SZILVESZTER, VIZI;
TIBOR, ZELLES y
GYORGY, HALMOS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 445 065 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

Uso tópico de R(+)-N-propargil-1-aminoindano para tratar o prevenir sordera parcial

A lo largo de toda la presente solicitud se hace referencia a diversas publicaciones, solicitudes de patente publicadas y patentes. Las divulgaciones de estos documentos en sus totalidades se incorporan por este documento por referencia en la presente solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la materia a la que se refiere la presente invención.

Antecedentes de la invención

La sordera parcial es una grave discapacidad que afecta a millones de personas. Las alteraciones de la audición pueden atribuirse a una amplia variedad de causas, que incluyen infecciones, lesión mecánica, ruidos altos, envejecimiento y ototoxicidad inducida por productos químicos que lesionan las neuronas y/o células pilosas del sistema auditivo periférico.

El sistema auditivo periférico consiste en receptores auditivos, células pilosas en el órgano de Corti y neuronas auditivas primarias, las neuronas del ganglio espiral en la cóclea. La actividad de la sinapsis entre las células pilosas internas (CPI) y las dendritas aferentes tipo II se modula por las fibras eferentes olivococleares laterales (OCL) (Eybalin M, (1993) Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 73: 309-373; Eybalin M, Pujol R, (1989) Cochlear neuroactive substances. *Arch Otorhinolaryngol* 246: 228-234; Puel J-L, (1995) Chemical synaptic transmission in the cochlea. *Prog Neurobiol* 47: 449-476).

La ototoxicidad se produce por fármacos o productos químicos que lesionan el oído interno o el nervio vestibulococlear, que envía información del equilibrio y la audición al cerebro desde el oído interno. La ototoxicidad puede producir sordera parcial temporal o permanente, equilibrio, o ambos. Las sustancias que pueden producir ototoxicidad incluyen antibióticos, fármacos de quimioterapia, productos químicos medioambientales, diuréticos de asa, aspirina y productos de quinina.

La rasagilina, R(+)-N-propargil-1-aminoindano, es un potente inhibidor de la monoamina oxidasa (MAO) B de segunda generación (Finberg JP, Youdim MB, (2002) Pharmacological properties of the anti-Parkinson drug rasagiline; modification of endogenous brain amines, reserpine reversal, serotonergic and dopaminergic behaviours. *Neuropharmacology* 43(7):1110-8). El mesilato de rasagilina en un comprimido de 1 mg está comercialmente disponible como monoterapia o como un auxiliar para el tratamiento de enfermedad de Parkinson idiopática como Azilect® de Teva Pharmaceuticals Industries, Ltd. (Petach Tikva, Israel) y H. Lundbeck A/S (Copenhague, Dinamarca). Véase, por ejemplo AZILECT®, Physician's Desk Reference (2006), 60ª edición, Thomson Healthcare. Estudios recientes han demostrado que, además de su actividad de inhibidor de MAO-B, la rasagilina posee potente actividad neuroprotectora demostrada por experimentos *in vitro* e *in vivo*. La neuroprotección por rasagilina se logró en modelos animales de traumatismo craneal cerrado (Huang W, Chen Y, Shohami E, Weinstock M. (1999) Neuroprotective effect of rasagiline, a selective monoamine oxidase-B inhibitor, against closed head injury in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 366(2-3):127-35), isquemia focal global (Speiser Z, Mayk A, Eliash S, Cohen S. (1999) Studies with rasagiline, a MAO-B inhibitor, in experimental focal ischemia in the rat. 106 (7-8) 593-606) y neurotoxicidad inducida por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Sage y col. 2001, 2003), además de modelo transgénico de esclerosis lateral amiotrófica (Waibel S. y col. (2004) Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. 251 (9) 1080-1084) y modelo de 6-OHDA (6-hidroxidopamina) de enfermedad de Parkinson (Blandini, F. y col. (2004) Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2004 Jun;187(2):455-9). Los experimentos en cultivo celular han mostrado que la rasagilina suprime potentemente la muerte celular apoptótica iniciada por mitocondrias (Youdim MBH y col., (2001) Rasagiline (N-propargyl-1R(+)-aminoindan), a selective and potent inhibitor of mitochondrial monoamine oxidase B. *Br. J. Pharmacol.*, 132:500-6; Akao Y. y col. (2002) Mitochondrial permeability transition mediates apoptosis induced by N-methyl(R)salsolinol, an endogenous neurotoxin, and is inhibited by Bcl-2 and rasagiline, N-propargyl-1(R)-aminoindan. 82 (4) 913-923) previniendo el hinchamiento preapoptótico de mitocondrias, activación de caspasas 3, activación de PARP nuclear (poli ADP ribosa polimerasa)-1, translocación de GADPH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y fragmentación del ADN nucleosómico (Youdim MBH y Weinstock M. (2001) Molecular Basis of Neuroprotective Activities of Rasagiline and the AntiAlzheimer Drug TV3326 [N-Propargyl-(3R) Aminoindan-5-YL)-Ethyl Methyl Carbamate]. *Cell. Mol. Neurobiol.* 21(6) 555-573; Youdim MBH y col. (2003) Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease: An Update on Progress. *CNS Drugs.* 17(10):729-762; Bar-am y col. (2004) Regulation of protein kinase C by the anti-Parkinson drug, MAO-B inhibitor, rasagiline and its derivatives, *in vivo*. *Journal of Neurochemistry* 89 (5), 1119-1125; y Weinreb O. y col. (2004) Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, volumen 15, edición 9, páginas 506-516). Además, la rasagilina induce el aumento de la expresión de Bcl-2 y Bcl-xL anti-apoptótica paralelo a la regulación por disminución de Bad y Bax proapoptótica (Youdim MBH y col. (2003) The essentiality of Bcl-2, PKC and proteasome-ubiquitin complex activations in the neuroprotective-antiapoptotic action of the anti-Parkinson drug, rasagiline. *Biochem Pharmacol.* 66(8):1635-41; Yogev-Falach y col. (2003) Amyloid Processing and Signal Transduction Properties of Antiparkinson-Antialzheimer Neuroprotective Drugs Rasagiline and TV3326. *Annals of the New York Academy of Sciences* 993:378-386). Pruebas recientes de un estudio de diseño de inicio retardado en enfermedad de Parkinson también han sugerido una posible eficacia modificadora de la enfermedad

de rasagilina en un ámbito clínico (Parkinson Study, G, A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson's disease, Arch. Neurol. (2004) 61 (4): 561-6).

Si la rasagilina tiene o no efectos positivos sobre el sistema auditivo periférico no se ha investigado hasta ahora.

- 5 La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º: 2006/094783 enseña un procedimiento de administración al sujeto de una cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para sus propiedades neuroprotectoras pero no enseña un procedimiento para tratar sordera parcial. La publicación de solicitud de patente de EE.UU. n.º: 2007/021352 desvela el tratamiento de sordera parcial usando zonisamida sola o en combinación con otros agentes que incluyen antagonistas de NMDA.

Sumario de la invención

- 10 Esta invención objeto proporciona R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo formulado para uso tópico en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial, en el que la sordera parcial se induce por exposición a un agente ototóxico.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Muestra un dibujo esquemático del diseño experimental.

- 15 **Figura 2.** Muestra que el efecto de la rasagilina sobre la liberación de dopamina de la preparación de cóclea de cobaya era dependiente de la concentración.

La rasagilina se añadió al fluido de perfusión de la 8ª fracción y se mantuvo hasta el final del experimento. Los valores de relación de la liberación de dopamina eléctricamente provocada (FRS_2/FRS_1) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de rasagilina se muestran para comparación. Los datos presentados son medias \pm EEM.

- 20 **Figura 3A, B, C y D.** Muestra que los cambios de duración de la aplicación de fármaco no influyeron en la acción de rasagilina. **(A)** El intervalo de tiempo cambia en la liberación de dopamina de la cóclea *in vitro*. Se añadió rasagilina a la perfusión 3-21 minutos antes de la segunda estimulación eléctrica (en paréntesis). La línea de puntos indica el momento adecuado de rasagilina en el estudio previo de los autores de la invención (8ª fracción, 15 min). **(B)** La duración más corta y la más larga de la perfusión de rasagilina se muestran por separado. **(C)** Valores de relación de dopamina eléctricamente provocada. **(D)** Valores de relación de liberación de DA en reposo. Los datos presentados en C y D son medias \pm EEM.
- 25

- Figura 4.** Muestra un ejemplo de ensordecir el oído del ratón con administración intratimpánica de neomicina registrado por mediciones de la respuesta auditiva del tronco encefálico (RTA) *in vivo*. En la medición de control, estímulos de clic provocaron respuestas del tronco encefálico a umbrales de audición normales. Después de 3 semanas de tratamiento intratimpánico con neomicina (pretratado) en el oído izquierdo y con solución salina en el oído derecho no pudieron provocarse respuestas del tronco encefálico en el oído tratado con fármaco ototóxico con preservación del umbral normal en el otro oído (control de vehículo).
- 30

Descripción detallada de la invención

- 35 La invención objeto proporciona R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso según se define en la reivindicación 1.

En una realización del procedimiento, los síntomas de la sordera parcial están seleccionados del grupo que consiste en: audición amortiguada, repiqueteo, rugido, silbido, zumbido en el oído, dolor de oído, sordera parcial en un oído, oído taponado, otitis media y vértigo.

- 40 La sordera parcial se induce por exposición a un agente ototóxico. Dicho agente ototóxico puede seleccionarse del grupo que consiste en antibióticos, quimioterapia, ruido, productos químicos medioambientales, diuréticos de asa, aspirina o quinina.

En otra realización, el sujeto mamífero es un ser humano.

- 45 Según la invención, la cantidad de R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo administrada puede ser de 0,1 mg a 50,0 mg basada en el peso de la base libre de R(+)-N-propargil-1-aminoindano. La administración puede ser de la sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser sal de esilato, mesilato, sulfato, tanato o tartrato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.

En una realización la administración puede ser administración ótica tópica al oído medio.

En otra realización el R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo es cristalino.

En otra realización del procedimiento la composición farmacéutica está en una forma adecuada para administración transdérmica.

Abreviaturas

- 5 RAT - respuesta auditiva del tronco encefálico
- AMPA - ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
- DA - dopamina
- GADPH - gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- HEPES - ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
- 10 CPI - células pilosas internas
- DAS - diferencias altamente significativas
- OCL - olivococlear lateral
- 6-OHDA - 6-hidroxidopamina
- MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
- 15 NMDA - ácido N-metil-D-aspartico
- PARP - poli ADP ribosa polimerasa

El mesilato de R(+)-PAI está comercialmente disponible como Azilect[®] de Teva Pharmaceutical Industries Ltd. y Lundbeck A/S. El R(+)-PAI puede obtenerse por resolución óptica de mezclas racémicas de enantiómeros R y S de PAI. Una resolución tal puede llevarse a cabo por cualquier procedimiento de resolución convencional muy conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, la resolución puede llevarse a cabo por cromatografía en columna preparativa sobre una columna quiral. Otro ejemplo de un procedimiento de resolución adecuado es la formación de sales diaestereoméricas con un ácido quiral tal como ácido tartárico, málico, mandélico o derivados de N-acetilo de aminoácidos, tales como N-acetil-leucina, seguido de recristalización para aislar la sal diaestereomérica del enantiómero R deseado. Una descripción completa de la preparación de R(+)-PAI y sus sales se describe en las patentes de EE.UU. n.ºs: 5.532.415, 5.387.612, 5.453.446, 5.457.133, 5.599.991, 5.744.500, 5.891.923, 5.668.181, 5.576.353, 5.519.061, 5.786.390, 6.316.504, 6.630.514. Las sales de R(+)-PAI incluyen mesilato, maleato, fumarato, tartrato, clorhidrato, bromhidrato, esilato, p-toluenosulfonato, benzoato, acetato, fosfato, tanato y sulfato. Por ejemplo, puede prepararse tanato de rasagilina mediante un procedimiento que comprende combinar una disolución de ácido tánico con base de rasagilina.

30 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para dar una respuesta terapéutica deseada sin excesivos efectos secundarios adversos (tales como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable cuando se usa en el modo de la presente invención. Por ejemplo, una cantidad eficaz para inhibir, atenuar o invertir síntomas de sordera parcial. La cantidad eficaz específica puede variar con factores tales como la afección particular que está tratándose, la condición física del paciente, el tipo de mamífero que está tratándose, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay) y las formulaciones específicas empleadas y la estructura de los compuestos o sus derivados.

35 La dosificación de los compuestos administrados en el tratamiento variará dependiendo de factores tales como las características farmacodinámicas de un agente quimioterapéutico específico y su modo y vía de administración; la edad, sexo, tasa metabólica, eficiencia de absorción, salud y peso del receptor; la naturaleza y grado de los síntomas; el tipo de tratamiento concurrente que se administra; la frecuencia de tratamiento; y el efecto terapéutico deseado.

40 Una unidad de dosificación de los compuestos puede comprender un único compuesto o mezclas de los mismos con compuestos de sordera parcial o con otros compuestos también usados para tratar lesión de neuritas.

45 Los compuestos pueden administrarse en mezcla con diluyentes farmacéuticos adecuados, sustancias de relleno, excipientes o vehículos (denominados conjuntamente en el presente documento como un vehículo farmacéuticamente aceptable) adecuadamente seleccionados con respecto a la forma deseada de administración y de acuerdo con prácticas farmacéuticas convencionales. La unidad estará en una forma adecuada para administración tópica. Los compuestos pueden administrarse solos, pero generalmente están mezclados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Este vehículo puede ser un sólido o líquido y el tipo de vehículo se elige generalmente basándose en el tipo de administración

que se usa. El agente activo puede co-administrarse en forma de un liposoma, como un polvo aglomerado o en una forma líquida. Ejemplos de formas de dosificación líquidas adecuadas incluyen disoluciones o suspensiones en agua, grasas y aceites farmacéuticamente aceptables, alcoholes u otros disolventes orgánicos, que incluyen ésteres, emulsiones, jarabes o elixires, suspensiones, disoluciones y/o suspensiones reconstituidas de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas de gránulos efervescentes. Tales formas de dosificación líquidas pueden contener, por ejemplo, disolventes, conservantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, diluyentes, edulcorantes, espesantes y agentes de fusión adecuados.

En el desarrollo de composiciones farmacéuticas, la cristalinidad es una propiedad deseable en un componente farmacéutico activo. Las sustancias cristalinas facilitan el procesamiento y formulación en la mayoría de los tipos de formas de dosificación farmacéuticas.

Por cualquier intervalo desvelado en el presente documento, se indica que todas las cantidades en unidades de centésimas, décimas y números enteros dentro del intervalo se desvelan específicamente como parte de la invención. Así, por ejemplo, 0,01-50,0 mg significa que cantidades en unidades de 0,02, 0,03 ... 0,09; 0,1, 0,2 ... 0,9; y 1, 2 ... 49 mg están incluidas como realizaciones de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, un sujeto "aquejado" con sordera parcial significa el sujeto al que se le ha diagnosticado sordera parcial o una afección en la que puede producirse sordera parcial.

En la presente solicitud, un sujeto diagnosticado con sordera parcial se refiere a un sujeto diagnosticado con alteraciones de la audición atribuidas a una amplia variedad de causas, que incluyen infecciones, lesión mecánica, ruidos altos, envejecimiento y ototoxicidad inducida químicamente que daña las neuronas y/o células pilosas del sistema auditivo periférico. Los síntomas incluyen audición amortiguada, repiqueteo, rugido, silbido, zumbido en el oído, dolor de oído, sordera parcial en un oído, oído taponado, otitis media y vértigo. El diagnóstico puede ser por audición por conducción aérea, audición por conducción ósea, prueba de Rinne, audiometría, audiometría del habla, discriminación del habla, timpanometría o prueba del reflejo acústico. La rasagilina puede usarse como un posible compuesto terapéutico que previene o inhibe sordera parcial.

La presente invención se entenderá mejor a partir de los detalles experimentales que siguen. Sin embargo, un experto en la materia apreciará fácilmente que los procedimientos específicos y resultados tratados son meramente ilustrativos de la invención como se describe más completamente en las reivindicaciones que siguen después.

Discusión

La dopamina (DA) se identificó como un posible modulador de la sinapsis aferente de CPI (Safieddine S, Prior AM, Eybalin M, (1997) Choline acetyltransferase, glutamate decarboxylase tyrosine hydroxylase, calcitonin gene-related peptide and opioid peptides coexist in lateral efferent neurons of rat and guinea-pig. *Eur J Neurosci* 9: 356-367). Es bien sabido que la cóclea es vulnerable a diferentes agentes nocivos que pueden conducir a sordera parcial neurosensorial (Pujol R, Puel J-L, (1999) Excitotoxicity, synaptic repair, and functional recovery in the mammalian cochlea: a review of recent findings. *Ann NY Acad Sci* 884: 249-54). Además de la disfunción de las arterias suministradoras otros agentes nocivos patológicos (como hipopresia endolinfática o traumatismo acústico) pueden causar isquemia en el órgano de Corti (Vass Z, Brechtelsbauer PB, Nuttall AL, Miller JM, (1995) Effect of endolymphatic hydrops on capsaicin evoked increase in cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol* 115: 754-758). La excitotoxicidad también está desempeñando una función en el patomecanismo de presbiacusia (Seidman MD, Quirk WS, Shirwany NA, (1999) Mechanisms of alterations in the microcirculation of the cochlea. *Ann NY Acad Sci* 884: 226-232), ototoxicidad inducida por aminoglucósidos (Duan M, Agerman K, Ernfors P, Canlon B, (2000) Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 7597-7602) y acúfenos (Sahley TL, Nodar RH, (2001) A biochemical model of peripheral tinnitus. *Hear Res* 152: 43-54).

Estímulos perjudiciales también activan los núcleos cocleares, que pueden liberar transmisores protectores en la cóclea: se mostró que las fibras eferentes OCL que contienen dopamina establecen un mecanismo de retroalimentación de bucle corto entre el tronco encefálico y la cóclea (Pujol R, (1994) Lateral and medial efferents: a double neurochemical mechanism to protect and regulate inner and outer hair cell function in the cochlea. *Br J Audiol* 28: 185-191). En línea con la teoría de la función cocleo-protectora de la sustancia OCL dopamina, (i) los agonistas de receptores de D₁ y D₂ inhibieron la activación inducida por NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) y AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico) del nervio aferente primario (Puel J-L, Bobbin RP, Fallon M, (1988) An ipsilateral cochlear efferent loop protects the cochlea during intense sound exposure. *Hear Res* 37: 65-70), (ii) la estimulación de las fibras OCL disminuyó la amplitud del potencial de acción de compuestos cocleares provocada por la estimulación con ruido intenso (Oestreicher E, Arnold W, Ehrenberger K, Felix D, (1997) Dopamine regulates the glutamatergic inner hair cell activity in guinea pigs. *Hear Res* 107: 46-52) y finalmente (iii) la administración intracoclear del agonista de receptores de dopamina D₂/D₃ piribedil redujo las características electrofisiológicas y cambios estructurales provocados por isquemia (d'Aldin C, Eybalin M, Puel J-L, Characon G, Ladrech S, Renard N, Pujol R, (1995a) Synaptic connections and putative functions of the dopaminergic innervation of the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolar* 252: 270-274. d'Aldin C, Puel J-L, Leducq R,

Crambes O, Eybalin M, Pujol R, (1995b) Effect of a dopaminerg agonist in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 90: 202-211; Gil-Loyzaaga P, (1995) Neurotransmitters of the olivocochlear lateral efferent system: with an emphasis on dopamine. *Acta Otolaryngol* 115: 222-226; Pujol R, Puel J-L, d'Aldin CG, Eybalin M, (1993) Pathophysiology of the glutamergic synapses in the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 113: 330-334). Además, se ha mostrado que la isquemia experimental y la activación de los receptores de glutamato metabotrópicos neuroprotectores pueden inducir *in vitro* la liberación de dopamina de la cóclea agudamente aislada (Halmos G, Doleviczenyi Z, Vizi ES, Lendvai B, Zelles T. (2005) Oxygen-glucose deprivation evokes dopamine release in isolated cochleae. *Neuroscience* 132: 801-809, Doleviczenyi Z, Halmos G, Répássy G, Vizi ES, Zelles T, Lendvai B., (2005) Cochlear dopamine release is modulated by group II metabotropic glutamate receptors via GABAergic neurotransmission. *Neurosci. Lett.* 385: 93-98). Tomados conjuntamente, estos datos establecieron suficientemente el posible efecto neuroprotector de la dopamina durante isquemia.

La presente invención describe la modulación de la liberación de dopamina por rasagilina para provocar este factor protector en isquemia. La rasagilina, a las concentraciones administradas y en los momentos adecuados, puede producir una potenciación de la liberación de dopamina provocada por la estimulación del campo como se reveló por los valores de FRS_2/FRS_1 en la preparación de cóclea. El aumento fue significativo a las mayores concentraciones, 100 y 300 μM de rasagilina.

Ejemplos

Ejemplo 1

Animales y preparación de tejido

Se abrieron los tímpanos bullosos de un cobaya macho (que pesaba 150-350 g). La cápsula ósea de la cóclea se eliminó en orientación estereomicroscópica y la estría vascular se desnudó y la cóclea se fracturó en la base de la columela. La preparación contuvo el ganglio espiral, las fibras auditivas aferentes, los axones y las terminaciones axónicas de los haces aferentes y tanto las células pilosas internas como externas. Todos los experimentos se llevaron a cabo en una disolución similar a perilinfa, que contenía NaCl 150 mM, KCl 3,5 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, HEPES 2,75 mM y Tris-OH 2,25 mM a la temperatura de 37 °C y pH 7,4. La osmolalidad se fijó por D-glucosa y continuamente se saturó con O_2 al 100 %.

Superfusión de microvolumen

Las cócleas se incubaron con [^3H]dopamina 0,2 μM (Amersham, RU, act. espec.: 31,0 Ci/mmoles, 6 μCi en 1 ml) durante 35 min. Cada cóclea se colocó después en una cámara de plexos de microvolumen y se superfundió a 3 ml/min con disolución similar a perilinfa. Después de 1 hora de pre-perfusión el flujo de salida se recogió en fracciones de 3 min. La actividad liberada se determinó ensayando alícuotas de 500 μl de cada muestra con espectrometría de centelleo líquido (Packard Tri-Carb 1900TR). Después de recoger las muestras durante 57 minutos (19 fracciones), cada cóclea se transfirió de las microcámaras a 500 μl de ácido tricloroacético al 10 % durante un día y se ensayaron 100 μl para la radiactividad del tejido. Mediciones de HPLC anteriores mostraron que el 91-95 % de la radiactividad provocada por la estimulación podría ser atribuible a [^3H]dopamina y sus metabolitos (Gáborján A, Lendvai B, Vizi ES, (1999a) Neurochemical evidence of dopamine release by lateral olivocochlear efferents and its presynaptic modulation in guinea-pig cochlea. *Neuroscience* 90: 131-138). La estimulación del campo eléctrico se aplicó durante un periodo de fracción (3 min, 360 pulsos) a 60 V, 2 Hz y 0,5 ms de duración en las fracciones 3ª y 13ª. Los pulsos se administraron por un estimulador Grass S88 (West Warwick, EE.UU.) mediante electrodos de platino en la parte superior e inferior de la cámara de tejido.

Dependencia de la concentración

Se añadió rasagilina al fluido de perfusión, 15 minutos antes de la estimulación del segundo campo (8ª fracción) a la concentración de 1, 10, 100 y 300 μM y se mantuvo hasta el final de los experimentos. A la concentración baja, la rasagilina no cambió la liberación de dopamina coclear mientras que dosis mayores elevan la liberación de DA coclear (Fig. 2).

Efecto del momento adecuado de administración de rasagilina sobre la liberación de dopamina coclear provocada

El examen del efecto del momento adecuado de perfusión de rasagilina vino a abordar la posible participación de procesos intracelulares lentos en la acción de rasagilina en la cóclea, tal como interacción con fosforilación de enzimas o receptores intracelulares o interferencia con la síntesis de proteínas. La suposición fue que cuanto mayor fuera el tiempo antes de la segunda estimulación eléctrica, mayor sería el efecto sobre la amplitud de la liberación de dopamina provocada. En estos experimentos la rasagilina (100 μM) se añadió a la perfusión 21, 18, 12, 9, 6 y 3 minutos antes de la segunda estimulación del campo.

Los diferentes momentos adecuados de perfusión de rasagilina no produjeron diferente potenciación de la liberación de dopamina provocada (Fig. 3A-C). Además, la rasagilina administrada incluso a la duración más larga (21 minutos antes

de la estimulación) dejó de inducir diferencias significativas en la liberación en reposo de dopamina (Fig. 3B, D).

Todos los grupos con los diversos momentos adecuados de perfusión de rasagilina causaron una potenciación significativa de la liberación de dopamina provocada (Tabla 1). En contraste, los valores de p de la prueba a posteriori no revelaron diferencias adicionales entre los grupos de momentos adecuados. Los números como se presentan en la tabla son los valores de probabilidad (p) de las comparaciones a posteriori de DAS de Tukey (un procedimiento estadístico usado para probar la significación estadística de comparaciones por pares no planificadas, Winer, Michels & Brown, 1991) entre grupos de tratamiento de 3, 6, 9, 12, 18, 21 minutos de perfusión con rasagilina y un control. Los valores de p significativos se indican subrayados.

Tabla 1. Valores de p de experimentos del momento adecuado de rasagilina que muestran potenciación significativa de la liberación de dopamina.

	3 minutos	6 minutos	9 minutos	12 minutos	18 minutos	21 minutos
6 minutos	0,999763					
9 minutos	0,867797	0,975706				
12 minutos	0,998655	0,970966	0,535902			
18 minutos	1,000000	0,999780	0,887884	0,999156		
21 minutos	0,999926	0,992801	0,699156	0,999996	0,999957	
control	<u>0,006352</u>	<u>0,002175</u>	<u>0,000205</u>	<u>0,016949</u>	<u>0,011157</u>	<u>0,014986</u>

Análisis de datos

Para describir de la mejor forma posible la liberación de dopamina durante un periodo de recogida, la liberación fraccionaria (LF) del flujo de salida de tritio se determinó como el porcentaje de radiactividad total presente en el tejido en el momento de la recogida de muestras. La liberación fraccionaria provocada por las estimulaciones de campo (S_1 y S_2) se calculó por el área bajo la curva, es decir, restando la media de la liberación basal de la liberación fraccionaria total durante la estimulación eléctrica (Halmos G, Gáborján A, Lendvai B, Répássy G, Z Szabó L, Vizi ES, (2000) Veratridine-evoked release of dopamine from guinea pig isolated cochlea. Hear Res 144: 89-96, Halmos G, Lendvai B, Gáborján A, Baranyi M, Z Szabó L, Csokonai Vitéz L, (2002) Simultaneous measurement of glutamate and dopamine release from isolated guinea pig cochlea. Neurochem Int 40: 243-248). Los efectos de fármacos sobre la liberación de [3 H]dopamina provocada por la estimulación del campo se expresaron por la relación calculada de FRS_2 con respecto a FRS_1 , en presencia y ausencia del fármaco, respectivamente. El efecto de fármacos sobre el flujo de salida en reposo de tritio se determinó como la relación de la suma de los dos mayores valores de LF en reposo consecutivos en presencia del fármaco y antes de que el fármaco alcanzara la cóclea (FRR_2/FRR_1). Los datos se expresan como las medias \pm EEM. Se usó ANOVA para el análisis estadístico. Se aplicó la prueba a posteriori de Tukey para determinar la significación de comparaciones por pares.

Ejemplo 2

Mediciones de respuestas auditivas del tronco encefálico (RAT) *in vivo* en ratones

Resumen

Se trataron ratones con neomicina intratimpánica (200 mg/ml) en el oído derecho en dos días consecutivos. Los oídos izquierdos se dejaron para control de vehículo (inyección de NaCl). Con el fin de desarrollar sordera parcial significativa, la medición de los potenciales provocados por el tronco encefálico se hizo 3 semanas después del pretratamiento con neomicina (con anestesia general). Las estimulaciones con clic al oído que incluyen diversas frecuencias se usaron para provocar la respuesta auditiva en el tronco encefálico que se midió por múltiples electrodos colocados sobre la cabeza del animal.

Discusión:

Los experimentos de control mostraron la audición umbral de cada oído (Fig. 4). El pretratamiento con la neomicina ototóxica conocida produjo sordera parcial evidente en el lado tratado (Fig. 4). La alteración de la audición no fue debida a la propia intervención debido a que el lado tratado con vehículo no mostró hipoacusia (Fig. 4).

5 A continuación se evaluó la posible función protectora de la rasagilina sobre la sordera parcial inducida por neomicina *in vivo*. El examen del efecto protector anticipado de la rasagilina tuvo lugar en dos conjuntos de experimentos. En el primer experimento, la rasagilina se administró tópicamente en el oído medio, inyectando 0,5 mg de rasagilina intratimpánicamente junto con neomicina una vez (0,5 mg/día) (n=4). La rasagilina inhibió completamente el efecto ototóxico de la neomicina en esta serie de experimentos; el umbral de audición de los animales tratados intratimpánicamente permaneció sin cambiar en comparación con el umbral antes del tratamiento con neomicina. En el
10 segundo experimento se estudió el efecto de la administración sistémica de rasagilina. La rasagilina (100 µl) se administró intraperitonealmente en el día del tratamiento con neomicina intratimpánica y los tres días siguientes (50 mg/kg de rasagilina diariamente) (n=4). A diferencia de la administración tópica, el uso sistémico de rasagilina no pudo prevenir el efecto ototóxico del fármaco de aminoglucósido. Todos los oídos tratados con neomicina ensordecieron.

15 La administración intratimpánica de rasagilina tiene efecto neuroprotector contra la ototoxicidad por aminoglucósidos que indica el posible uso terapéutico de la rasagilina para prevenir sordera parcial.

Ejemplo 3

Mediciones de respuestas auditivas del tronco encefálico (RAT) *in vivo* en cobayas

Animales

20 Se usaron cobayas que pesaban 250-300 g en todos los experimentos. Todas las intervenciones (incluyendo las mediciones de RAT y tratamientos intratimpánicos) se realizan con anestesia general usando inyección i.p. de una mezcla de ketamina y xilazina.

Medición de RAT

25 Se coloca un altavoz en cada oído y las respuestas RAT se detectaron por cuatro electrodos de superficie. Estos electrodos se colocan dos en la región mastoidea y uno en el vértice como positivo y el cuarto electrodo se colocó en la frente como el electrodo base. Se obtienen señales acústicas calibradas para provocar respuesta del tronco encefálico. El umbral de detección visual se determina por la disminución de la presión sonora en etapas de 5 dB. Después, las respuestas provocadas se filtran y se promedian con 500 barridos usando un procesador de señales. Todas las pruebas de RAT se realizan bilateralmente y se obtienen niveles de presión sonora equivalente de pico (NPSEP) de referencia en términos de decibelio (dB). Todos los animales se someten a la prueba de audición de referencia (RAT) antes de cualquier
30 tipo de tratamiento con el fin de descartar sordera parcial anterior. Las mediciones del umbral de RAT de control se comparan con valores de pretratamiento. El desplazamiento del umbral auditivo se somete a análisis estadístico, se determina la significación estadística.

Grupos de estudio

35 Todos los grupos de tratamiento contienen la administración intratimpánica de neomicina y se realizaron en orientación estereomicroscópica. Se usa una aguja fina para miringotomía y los fármacos se administran por la misma aguja. El oído medio completo se llena hasta que el fluido pueda verse en el canal auditivo externo. Los animales se tumban sobre el lado opuesto durante 5 minutos después de la inyección intratimpánica con el fin de evitar el goteo de fármacos del oído medio. Inyecciones típicas son aproximadamente 100 µl de disolución en el oído medio evitando derramamiento a mayores volúmenes. La concentración se calcula usando este volumen. Por ejemplo, una dosis de 50 mg/kg de rasagilina para una cobaya de 300 g se logra administrando 15 mg de rasagilina disuelta en 100 µl de disolución. Después de la
40 medición del umbral de referencia los animales se dividen en diferentes grupos de tratamiento del siguiente modo:

Grupo de control: oído derecho: neomicina 1 mg/kg, oído izquierdo: vehículo, n=6 animales;

Grupo de estudio de rasagilina IP: N=6-8 animales, tres días antes del tratamiento con neomicina intratimpánica: rasagilina 1 mg/kg día; neomicina intratimpánica (1 mg/kg) en ambos oídos.

45 Después de la administración de neomicina intratimpánica: rasagilina 1 mg/kg día intraperitonealmente o por vía oral durante 3 semanas (durante la duración completa de la medición de RAT). Grupo de estudio del efecto intratimpánico de rasagilina. N=6 animales, oído derecho: neomicina 1 mg/kg y rasagilina, 50 mg/kg, oído izquierdo: neomicina solo 1 mg/kg. Administración intratimpánica solo para evaluar el efecto de la administración de rasagilina local (mismo diseño que en el experimento preliminar).

50 Para estimar el umbral de audición el estímulo sonoro se aplica a diferentes frecuencias. En animales de control a una frecuencia particular el sonido induce una respuesta en el oído. En animales sordos la respuesta no se detecta

normalmente a ninguna frecuencia.

Discusión:

5 Los experimentos de control muestran el umbral de audición de cada oído. El pretratamiento con la neomicina ototóxica conocida produce sordera parcial evidente en el lado tratado. La alteración de la audición no es debida a la propia intervención debido a que el lado tratado con vehículo no muestra hipoacusia.

10 A continuación se evalúa la posible función protectora de la rasagilina sobre la sordera parcial inducida por neomicina *in vivo*. El examen del efecto protector anticipado de la rasagilina tiene lugar en dos conjuntos de experimentos. En el primer experimento, la rasagilina se administra tópicamente en el oído medio, inyectando 0,5 mg de rasagilina intratimpánicamente junto con neomicina una vez. La rasagilina inhibe completamente el efecto ototóxico de la neomicina en esta serie de experimentos; el umbral de audición de los animales tratados intratimpánicamente permanece sin cambiar en comparación con el umbral antes del tratamiento con neomicina. En el segundo experimento se estudia el efecto de la administración sistémica de rasagilina. La rasagilina se administra intraperitonealmente en el día del tratamiento con neomicina intratimpánica y los tres días siguientes. A diferencia de la administración tópica, el uso sistémico de rasagilina no puede evitar el efecto ototóxico del fármaco de aminoglucósido. Todos los oídos tratados con
15 neomicina ensordecieron.

La administración intratimpánica de rasagilina tiene un efecto neuroprotector contra la ototoxicidad por aminoglucósidos que indica el posible uso terapéutico de la rasagilina para prevenir sordera parcial.

REIVINDICACIONES

1. R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo formulado para uso tópico en el tratamiento, prevención o alivio de síntomas de sordera parcial en un sujeto, en el que la sordera parcial se induce por exposición a un agente ototóxico.
- 5 2. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 1, en el que el agente ototóxico está seleccionado del grupo que consiste en antibióticos, quimioterapia, ruido, productos químicos medioambientales, diuréticos de asa, aspirina y quinina.
- 10 3. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 1 o 2, para su uso en el alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 1 o 2, en el que el síntoma de sordera parcial está seleccionado del grupo que consiste en: audición amortiguada, repiqueteo, rugido, silbido, zumbido en el oído, dolor de oído, sordera parcial en un oído, oído taponado, otitis media y vértigo.
- 15 4. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el sujeto es un ser humano.
- 20 5. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que se usa en una cantidad de 0,1 mg a 50,0 mg basada en el peso de la base libre de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.
- 25 6. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 5, que se usa en una cantidad de 0,1 mg a 10,0 mg basada en el peso de la base libre de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.
7. La sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 8. La sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano según la reivindicación 7, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 7, que es la sal de esilato, mesilato, sulfato, tanato o tartrato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.
- 35 9. La sal farmacéuticamente aceptable de R(+)-N-propargil-1-aminoindano según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 8, que es la sal de mesilato de R(+)-N-propargil-1-aminoindano.
- 40 10. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que se formula para administración ótica tópica al oído medio.
11. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según la reivindicación 10, que se formula para inyección intratimpánica.
12. El R(+)-N-propargil-1-aminoindano o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para su uso en el tratamiento, prevención o alivio de un síntoma de sordera parcial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que se formula para uso transdérmico.

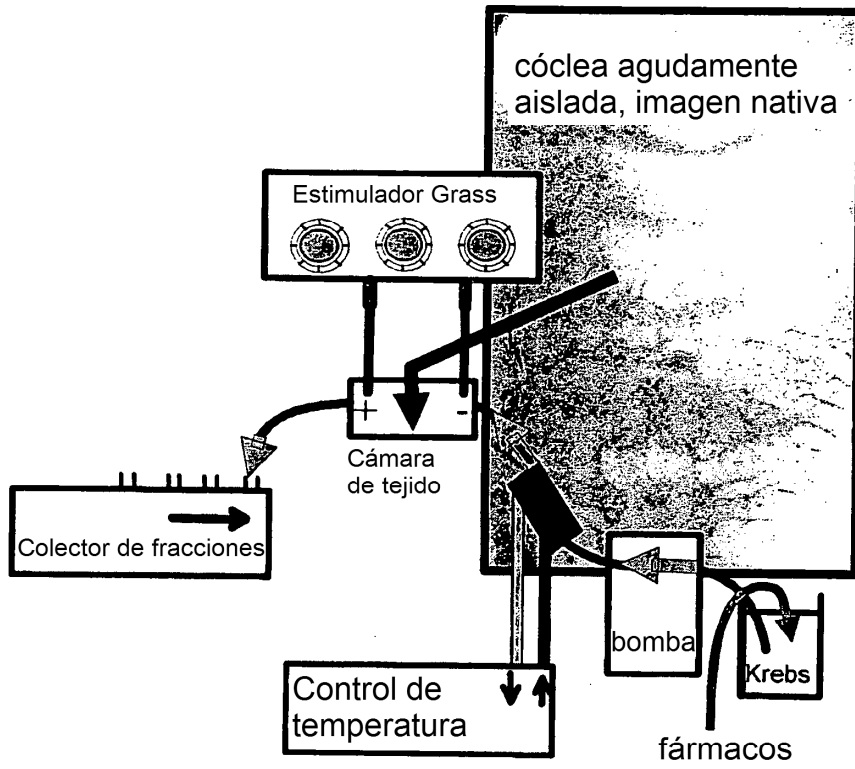
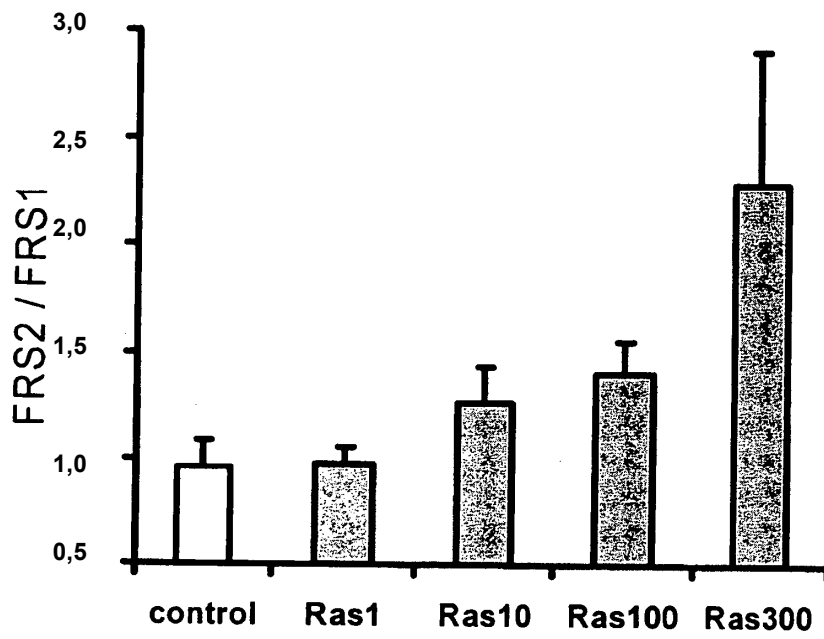


Figura 1



Fi
gu
ra
2

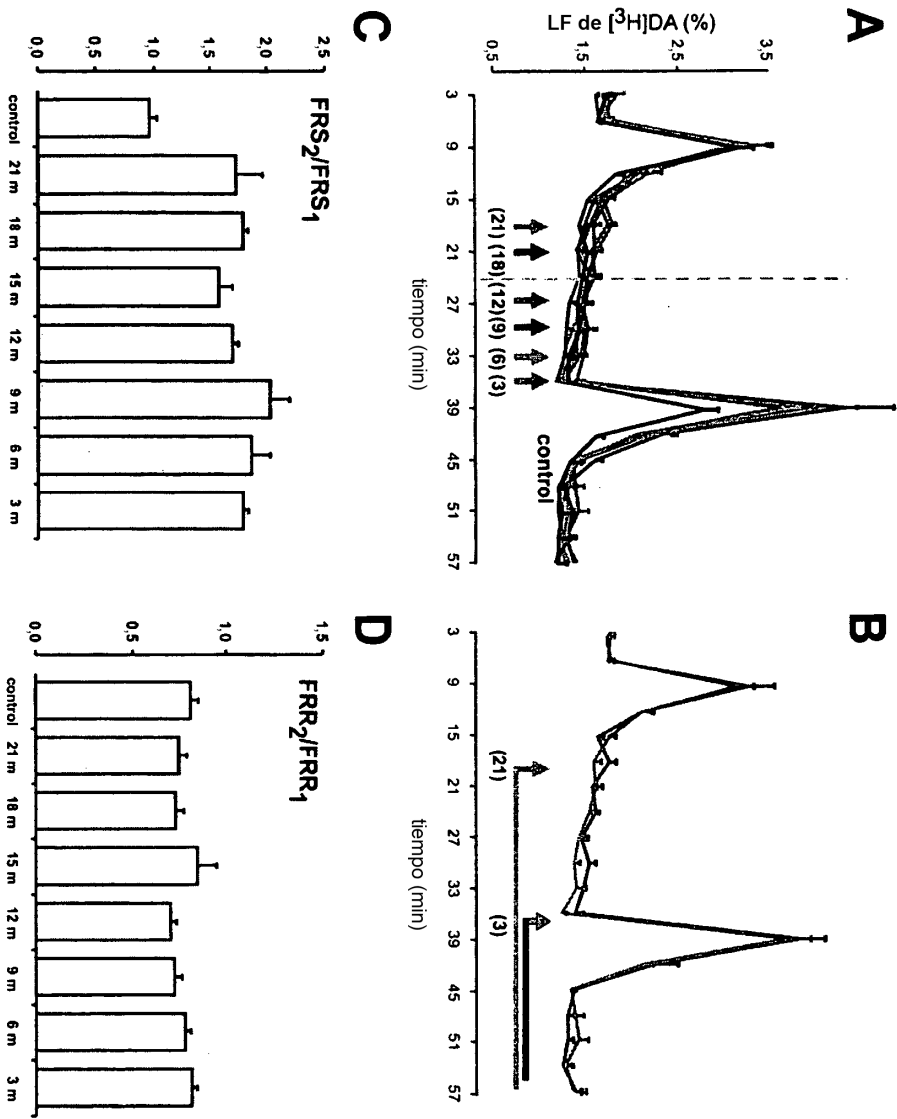


Figura 3

Figura 4

