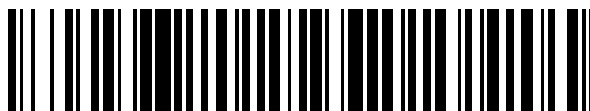


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 521 519**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 31/5513 (2006.01)

A61K 31/195 (2006.01)

A61K 31/4422 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.01.2006 E 10158404 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2196199**

54 Título: **Tratamiento de fenómenos fantasma**

30 Prioridad:

25.01.2005 DE 102005004343

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

12.11.2014

73 Titular/es:

**OTOLANUM AG (100.0%)
Bahnhofstrasse 21
6300 Zug, CH**

72 Inventor/es:

**KNIPPER, DR. MARLIES y
RÜTTIGER, DR. LUKAS**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 521 519 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

Tratamiento de fenómenos fantasma

5 La presente invención se refiere a una sustancia para el tratamiento de fenómenos fantasma, en concreto para el tratamiento del tinnitus agudo.

Estas sustancias son bien conocidas en el estado actual de la técnica.

10 El fenómeno fantasma del tinnitus consiste en la precepción de ruidos por parte de un paciente que son producidos por el oído y el sistema auditivo. Cuando el tinnitus se hace presente desde hace unas semanas hasta tres meses se denomina tinnitus agudo. Cuando el tinnitus perdura más de un año se clasifica como crónico. De acuerdo con las estadísticas epidemiológicas, el tinnitus crónico afecta en Alemania a aproximadamente tres millones de adultos, es decir, aproximadamente al 4% de la población. A escala mundial, cada año aproximadamente diez millones de personas comienzan a padecer tinnitus y aproximadamente 340.000 de estos casos pasan de una forma aguda a una forma crónica, la denominada tasa de enfermedades recientes.

15 Entre las múltiples causas del tinnitus se encuentran daños acústicos crónicos, lesiones agudas del oído por explosiones, sordera súbita y otras afecciones que van acompañadas de pérdida de audición. De acuerdo con los estudios clínicos, la sordera laberíntica como forma de progresión crónica o como sordera por traumatismo acústico, seguida de la enfermedad de Menière y la sordera súbita, está relacionada con el tinnitus en más de dos tercios de los casos. También intervienen en el origen y la continuidad del tinnitus afecciones de las vértebras cervicales y también de la articulación temporomandibular y el sistema muscular masticatorio. El tinnitus también parece presentar un
20 componente psíquico, de modo que, en este contexto, se habla de tinnitus psicogénico. No obstante, en muchos casos no se puede determinar ninguna causa veraz del tinnitus, aunque se lleve a cabo una diagnosis profunda.

Actualmente, la terapia del tinnitus consiste en tratamientos psicossomáticos, terapia de relajación, *biofeedback*, hipnoterapia, estimulación eléctrica, lidocaína, iontoforesis o enmascaramiento. Sin embargo, se trata de conceptos terapéuticos exclusivamente sintomáticos.

25 El documento WO 02/15907 A1 propone el tratamiento del tinnitus mediante la administración de flupirtina, un producto que abre los canales de potasio. Este tratamiento tiene la desventaja de que la flupirtina también es un analgésico relajante muscular, con lo que su administración implicaría unos efectos secundarios no deseados.

30 Wang y col. (2000), en "Evaluating effects of some medicine on tinnitus with animal behavioral model in rats", Zhonghua Er. Bi. Yan. Hou. Ke. Za. Zhi. 35 (5), abstract, proponen la administración de nimodipina para el tratamiento del tinnitus. La nimodipina es un inhibidor del canal de Ca⁺⁺ Cav1.3. Sin embargo, se ha comprobado que el bloqueo del canal Cav1.3 en el sistema auditivo conduciría directamente a la sordera, por lo que la nimodipina es completamente inadecuada para el tratamiento del tinnitus.

35 En el documento WO 2004/022069 A1 se describen receptores de NMDA (N-metil-D-aspartato) aberrantes como una de las posibles causas del tinnitus. Estos denominados canales receptores de glutamato alterados, que son expresados por las células nerviosas auditivas, entre otras, conducen a un aumento de la afluencia de calcio a la célula. En este documento se propone la utilización de antagonistas de los receptores de NMDA para el tratamiento del tinnitus. Sin embargo, sigue sin estar nada claro si con estas sustancias se puede tratar la situación aguda o crónica del tinnitus. Dicho documento tampoco indica cómo se ha de realizar la administración de las sustancias.

40 En el documento DE 101 24 953 A1 se propone un concepto de tratamiento para el tinnitus que consiste en la estimulación de la expresión del factor neurotrófico derivado cerebral BDNF (Brain-derived Nerve Growth Factor). Los autores de dicho documento, basándose en un modelo animal, explican que en el caso del tinnitus crónico predomina una reducción de la expresión del BDNF en la cóclea y en el colículo inferior, por lo que proponen la estimulación de la expresión del BDNF como enfoque terapéutico. Sin embargo, los autores han investigado exclusivamente y de forma muy concreta la situación en caso tinnitus crónico. Las ratas utilizadas en el modelo animal fueron tratadas durante tres
45 meses con salicilatos, con lo que, como es sabido, se induce el tinnitus crónico; véase Penner M. J. y Jastreboff P. J. (1996), Tinnitus: Psycho-physical observations in humans and animal models, en: Van de Water, Popper A. N., Fax, R. R. (Ed.), Clinical aspects of hearing, Springer, Nueva York, Heidelberg, páginas 208 a 304; y Bauer, C. A., y col. (1999), A behavioral model of chronic Tinnitus in rats. Otolaryngol. Head Neck Surg. 121, páginas 457 a 462.

50 Sin embargo, los autores del documento DE 101 24 953 A1 no tuvieron en cuenta que deben existir diferencias significativas entre el tratamiento del tinnitus crónico y del tinnitus agudo.

Por ejemplo, en Waddell, A., Canter, R. (2004), "Tinnitus", Am. Fam. Physician 69, páginas 591 a 592, se puede obtener una idea general del cuadro clínico del tinnitus.

Numerosas publicaciones se refieren a diversas sustancias para el potencial tratamiento del tinnitus.

En la WO 2005/073237 se describen composiciones del principio activo monohidrato de gaboxadol para el tratamiento de enfermedades neurológicas y psiquiátricas, entre otras el tinnitus.

5 Theopold (Laryng. Rhinol. Otol. 64 (1985) 609-613) describe la utilización del compuesto nimodipina como concepto terapéutico potencial de enfermedades del oído interno. La nimodipina es un derivado de la dihidropiridina antagonista del calcio de efecto selectivo sobre el sistema vascular cerebral.

La publicación de Menkes y col. (J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 1998, 65:803) describe la utilización de valproato de sodio para el tratamiento del tinnitus.

10 Szczepaniak y col. (Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 104:1996, páginas 399-404) describen el uso de baclofeno para el tratamiento del tinnitus en un modelo con ratas.

La utilización de agonistas del receptor GABA para el tratamiento del tinnitus se describe en Eggermont y col. ((Trends in Neurosciences, Vol. 27, N° 11, 2004).

15 En Guitton y col. (The Journal of Neuroscience, 2003, 23(9): 3944-3952) se describe el uso de antagonistas NMDA para el tratamiento de tinnitus inducido por salicilato. En particular, se examina la utilización de antagonista del receptor NMDA MK-801.

En Ciocon y col. (Journal of the American Geriatrics Society 45, nº 9, 1997, página 41) se describe expresamente el uso de oxazepam para el tratamiento del tinnitus.

20 Así, la invención tiene por objeto proporcionar una sustancia para la terapia del tinnitus agudo que permita solventar las desventajas del estado de la técnica anterior. En particular, proporcionar una sustancia con la que se puede tratar selectivamente el fenómeno fantasma del tinnitus agudo.

Este objetivo se resuelve mediante la preparación de una sustancia que interactúa con la cascada de transducción de señales BDNF.

25 El BDNF ("Brain-derived Nerve Growth Factor") es una proteína básica producida por las neuronas del sistema nervioso central que incluye 252 aminoácidos. El BDNF es un factor de crecimiento que interviene en el desarrollo del sistema nervioso y desempeña un papel en el desarrollo de la plasticidad de las sinapsis. El efecto del BDNF se transmite a través de receptores especiales, por ejemplo a través del receptor de BDNF trkB, que a su vez regula la actividad o el efecto de factores posteriores, como la MAP quinasa o la Cam quinasa. Por otra parte, el BDNF se autorregula, por ejemplo a través del calcio.

30 Todos los factores que regulan o influyen en la actividad, expresión, efecto o similares del BDNF, o todos los factores regulados o así influidos por el BDNF, constituyen la llamada "cascada de transducción de señales del BDNF".

35 La cascada de transducción de señales del BDNF se puede dividir en una cascada previa al receptor de BDNF trkB y otra cascada posterior a dicho receptor. La cascada de transducción de señales posterior al trkB se inicia mediante la unión del BDNF y otros miembros de la familia de las neurotrofinas al receptor trk. Esto conduce a una dimerización del trk y a la activación de la actividad de la tirosina-quinasa del receptor. A través de esta agregación de los receptores mediante ligandos se produce una autofosforilación de dominios intracelulares, que conduce a una activación de moléculas señal, como la fosfolipasa C (PLC), la fosfatidil-inositol-3-quinasa (PI3-quinasa) y la proteína adaptadora Shc (proteína que contiene SH-2). Finalmente, las demás señales, sobre todo a través de la MAP-quinasa dependiente de ras, influyen en la transcripción genética celular y la síntesis proteínica.

40 La cascada previa al trkB afecta a la regulación del BDNF. Por ejemplo, es sabido que la expresión del BDNF está regulada por diferentes estímulos en función de la actividad, por ejemplo por estimulación eléctrica o lesión, por puro movimiento físico o también por el ritmo circadiano. Estos estímulos regulan la expresión de diferentes exones de BDNF no traducidos, que finalmente forman diferentes transcripciones de BDNF junto con el exón 5' común. Los estímulos actúan evidentemente a través de diferentes cascadas de señales inducidas por Ca⁺⁺ en los promotores de los diferentes exones de BDNF.

45 De acuerdo con la invención, el concepto "cascada de transducción de señales del BDNF" se refiere al bloqueo o la inhibición de los receptores BDNF y a estos receptores. Se entiende que el propio trkB también forma parte de la cascada de transducción de señales del BDNF.

En Gabellini, N. (2004), "Transcriptional regulation by cAMP and Ca⁺⁺ links the Na⁺/Ca⁺⁺ exchanger 3 to memory and sensory pathways", Mol. Neurobiol. 30, páginas 91 a 116; West y col. (2001), "Calcium Regulation of Neuronal Gene

Expression", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, páginas 11024-11031, se puede obtener una idea general de la cascada de transducción de señales del BDNF. El contenido de estas publicaciones forma parte de la presente solicitud por referencia.

5 Como es sabido, el BDNF interviene en numerosas enfermedades, véase Binder, D.K. (2004), "The role of BDNF in epilepsy and other diseases of the mature nervous system", Recent Advances in Epilepsy Research, páginas 34 a 56.

10 De acuerdo con la invención, se puede obtener un efecto de bloqueo o inhibición de los receptores de BDNF o de una sustancia similar que interactúe con la cascada de transducción de señales del BDNF en cualquier configuración; es decir, se puede tratar de una sustancia definida tanto química como bioquímica o biológicamente, siendo, por consiguiente, un compuesto sintetizado químicamente de cualquier característica consistente en una molécula, un ión, un átomo, una proteína, un péptido, un anticuerpo, un ácido nucleico, un aptámero, un virus, una bacteria, etc.

Por el concepto "interacción" se entiende la acción recíproca directa o indirecta entre esta sustancia y un factor de la cascada de transducción de señales del BDNF similar que resulta en una modificación de la transducción fisiológica de las señales dentro de dicha cascada. Estas sustancias interactuantes ya están suficientemente descritas en el estado actual de la técnica.

15 Con la preparación de esta sustancia se resuelve por completo el objetivo de la presente invención. En particular, los inventores han propuesto por primera vez la administración de tal sustancia para la terapia del fenómeno fantasma del tinnitus agudo.

20 Gracias a la invención se puede tratar selectivamente la forma aguda del tinnitus y, por consiguiente, evitar con antelación la problemática cronicación de este fenómeno fantasma. Con frecuencia, en el estado actual de la técnica no se hace ningún tipo de distinción entre el tinnitus crónico y el agudo y a menudo sólo se proponen enfoques para el tratamiento del tinnitus crónico, como en el caso del documento DE 101 24 953 A1 antes mencionado.

De acuerdo con la invención se prevé una sustancia interactuante de este tipo que provoca el bloqueo o la inhibición de los receptores de BDNF o similares a estos receptores de la cascada de transducción de señales del BDNF.

25 En este sentido, de acuerdo con la invención, por el concepto "bloqueo o inhibición" se entiende que la transmisión de señales dentro de la cascada de transducción de señales del BDNF se ralentiza, se degrada, se reduce o se suprime por completo en comparación con la situación fisiológica.

30 Esta conclusión de los inventores fue totalmente sorprendente y es contraria a las conclusiones descritas en el documento DE 101 24 953 A1 con respecto al tinnitus crónico. En dicho documento se plantea una estimulación de la expresión del BDNF, mientras que, de acuerdo con la invención, se plantea una inhibición de la expresión del BDNF o de la transducción de señales del BDNF para el tratamiento de fenómenos fantasma tales como el tinnitus agudo. Por ello, los inventores se han dado cuenta de que en el caso del tinnitus agudo se ha de aplicar una terapia configurada exactamente al contrario que la propuesta para el tinnitus crónico de acuerdo con el documento arriba mencionado. Por consiguiente, el traslado de este concepto conocido al estado agudo tendría consecuencias fatales.

35 Los inventores han inducido el tinnitus agudo en ratas mediante una breve administración de salicilatos y han detectado una intensificación de la expresión del BDNF en los ganglios cocleares. Los inventores han podido demostrar que la situación es exactamente a la inversa en la inducción del tinnitus crónico, es decir, en ese caso se produce una reducción de la expresión del BDNF en los ganglios cocleares.

40 Por consiguiente, sorprendentemente, se ha comprobado que es esencial hacer una diferenciación entre el tinnitus agudo y el crónico para elegir el método de tratamiento correcto, y esta diferenciación no se ha realizado o no se ha realizado suficientemente hasta la fecha en el estado actual de la técnica. Por ello, de acuerdo con la invención, el tinnitus agudo se ha de tratar mediante una inhibición o bloqueo de la cascada de transducción de señales del BDNF, por ejemplo mediante la inhibición de la expresión del BDNF. Por el contrario, de acuerdo con el documento DE 101 24 953 A1, en el caso del tinnitus crónico se ha de realizar una estimulación de la expresión del BDNF.

45 Los inventores presentan aquí por primera vez datos moleculares que muestran los mecanismos de la patología del tinnitus, y de este modo enriquecen las ciencias básicas y la medicina para una mejor comprensión de estos fenómenos fantasma y al mismo tiempo presentan una terapia causal.

De acuerdo con la invención, se prevé el uso de una sustancia de este tipo que provoca un bloqueo o una inhibición de la cascada de transducción de señales aguas abajo del trkB.

50 Las sustancias, los factores inhibidores de la cascada de transducción de señales de BDNF, permiten fácilmente disminuir la actividad o diseñar ensayos de inhibición para el trabajo rutinario de los biólogos moleculares o los químicos clínicos, así como de los farmacólogos.

De acuerdo con un enfoque alternativo se prevé una sustancia que provoca un bloqueo o una inhibición del receptor de BDNF (trkB) o de la cascada de transducción de señales aguas abajo de éste.

5 Con esta medida se aprovecha otro punto de acción adecuado para una intervención terapéutica. Por ejemplo, mediante sustancias adecuadas conocidas en el estado actual de la técnica se puede bloquear el propio trkB y, con ello, toda la cascada de transducción de señales del BDNF subsiguiente. Además, mediante el diseño molecular de medicamentos ("molecular drug design") y en base a datos cristalográficos del trkB se pueden desarrollar sustancias adecuadas que interactúan con este receptor y que constituyen principios activos ventajosos para un medicamento destinado al tratamiento del tinnitus agudo o del dolor fantasma. Otros puntos de acción adecuados son factores posteriores al trkB de la cascada de transducción de señales, por ejemplo PLC, PI3 quinasa o Shc. Una inmovilización o inhibición de estos factores también conduce a un bloqueo adecuado de la cascada de transducción de señales del BDNF.

10 La sustancia prevista también puede consistir alternativamente en un inhibidor de MAP quinasa, un inhibidor de Cam quinasa o un antagonista de trkB. De acuerdo con la invención, las sustancias U 0126 o PD 98058 son inhibidores de MAP quinasa especialmente adecuados.

15 Las sustancias de este tipo son adecuadas para el tratamiento del tinnitus agudo. Los productos U 0126, un inhibidor de MEK1/2, y PD 98058, un inhibidor de MEK1, se pueden obtener en Cell Signalling Technology, Inc. Beverly, MA, EE.UU. Los especialistas deben elegir la concentración utilizada y ésta depende de la intensidad de la enfermedad, del resto de la terapia conceptual y de diferentes factores individuales del paciente a tratar. Los especialistas determinan sobre esta base la concentración utilizada para cada caso individual mediante la aplicación de medidas rutinarias.

En una forma ventajosa de acuerdo con la invención, la sustancia se administra localmente en o al oído.

20 Esta medida tiene la ventaja de que la sustancia se administra selectivamente en el lugar de actuación, por lo que sólo se requieren pequeñas cantidades de principio activo. Además, de este modo el cuerpo del paciente tratado se somete a un menor esfuerzo y los efectos secundarios se reducen considerablemente. En el caso del tratamiento del tinnitus agudo es adecuado el sistema de microdosificación descrito por Lehner, R. y col. (1996), "A new implantable drug delivery system for local therapy of the middle and inner ear", Ear. Nose Throat 76, páginas 567 a 570.

25 La administración local de la sustancia también puede tener lugar alternativamente mediante el uso de un hidrogel biodegradable que sirve como matriz de soporte para la sustancia. Ya se ha utilizado con éxito un hidrogel biodegradable en un modelo animal para la administración local de BDNF en la ventana redonda del oído interno; Ito y col. (2005), "A new method for drug application to the inner ear", J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec., páginas 272-275.

30 Los inventores han descubierto que resulta especialmente ventajoso administrar localmente una sustancia que provoca el bloqueo o la inhibición de los receptores BDNF o que interactúa con la cascada de transducción de señales del BDNF aguas abajo, ya que, como han podido determinar los inventores en otros experimentos, en el caso del tinnitus agudo sorprendentemente se reduce la expresión del BDNF en la corteza auditiva, al contrario de lo que ocurre en los ganglios cocleares. Por consiguiente, una administración sistémica de sustancias que inhiben la cascada de transducción de señales del BDNF conduciría a una reducción adicional de la expresión del BDNF en la corteza y tendría efectos nocivos en el organismo. En consecuencia, una administración sistémica de la sustancia que inhibe la cascada de transducción de señales de BDNF estaría contraindicada en el caso del tinnitus agudo.

Otro objeto de la presente exposición se refiere a una sustancia para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico del fenómeno fantasma del tinnitus agudo en un organismo humano o animal, seleccionada de entre el grupo consistente en inhibidores de la MAP quinasa, en particular U 0126 o PD 98058, inhibidores de Cam quinasa y antagonistas de trkB.

40 Los inventores han reconocido y propuesto por primera vez una aplicación médica concreta de las sustancias arriba mencionadas en relación con fenómenos fantasma, a saber el tinnitus agudo.

Otro objeto no reivindicado se refiere a un procedimiento para el diagnóstico del tinnitus agudo en un organismo animal o humano que incluye los siguientes pasos: (a) preparación de una muestra biológica del organismo, (b) determinación del nivel de la expresión del BDNF en la muestra biológica, (c) comparación del nivel medido en el paso (b) con un valor de referencia de un organismo sano, y (d) correlación de un nivel superior al de un organismo sano con un diagnóstico positivo.

45 La muestra biológica procede del oído, por ejemplo una muestra de tejido, células, por ejemplo ganglios cocleares o neuronas. En caso de una toma de muestras de tejido del oído se ha de tener cuidado de no dañar el aparato auditivo. Esta medida de precaución no es necesaria si se trata de un tinnitus que se desarrolla centralmente en un oído que ya no está intacto. En este caso, la toma de muestras para determinar el nivel de la expresión del BDNF también se puede aprovechar al mismo tiempo para medir la funcionalidad de la transmisión y el uso de nervios orientados hacia el centro, por ejemplo para optimizar la eficacia de la implantación de un implante coclear.

5 El procedimiento no reivindicado se lleva a cabo en un sistema biológico adecuado, pudiendo utilizarse tampones habituales como tampones Tris o HEPES. La determinación del nivel de expresión del paso (b) se lleva a cabo con métodos biológicos moleculares o celulares habituales, como técnicas ELISA y Westernblot en el ámbito de las proteínas, o Northernblot en el ámbito del ARNm. Por ejemplo en Sambrook, J. y Russel, D.W. (2001), "Molecular Cloning - A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, se describen métodos biológicos moleculares adecuados. El contenido de dicha publicación forma parte de la presente descripción por referencia.

Se puede establecer y proponer un diagnóstico biológico molecular del tinnitus agudo.

10 Se han desarrollado un tratamiento de los fenómenos fantasma del tinnitus agudo en un organismo humano que puede incluir los siguientes pasos de ejecución: (a) preparación de un medicamento que incluye una sustancia que bloquea o inhibe los receptores de BDNF o que interactúa con la cascada de transducción de señales del BDNF y también un soporte farmacéutico aceptable y en caso dado otras sustancias auxiliares y/o principios activos, y (b) administración, en caso dado local, del medicamento al organismo, y en caso dado (c) repetición de los pasos (a) y (b).

15 Los soportes farmacéuticamente aceptables y las otras sustancias auxiliares son suficientemente conocidos en el estado actual de la técnica, véase por ejemplo Kibbe, A.H. (2000), "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Press. El contenido de esta publicación forma parte de la presente descripción por referencia.

Como principios activos adicionales entran en consideración por ejemplo remedios contra el tinnitus clásicos.

20 Se entiende que las características anteriormente mencionadas y las características explicadas más abajo no sólo se pueden utilizar en la combinación indicada en cada caso, sino también en otras combinaciones o de forma individual.

La invención se explica más detalladamente a continuación por medio de ejemplos de realización.

En las figuras adjuntas se muestra lo siguiente:

- Figura 1: La operación y el suministro local de salicilato no modifican significativamente los umbrales de audición.
- 25 Figura 2: La administración aguda sistémica y local de salicilato conduce, después de un tiempo determinado, a un aumento de la expresión de c-fos en la cóclea.
- Figura 3: Análisis de hibridación *in situ* de c-fos y variantes *splice* exón III y exón IV de BDNF en la cóclea de ratas adultas después de la administración local y sistémica de salicilato.
- 30 Figura 4: El análisis RT-PCR muestra una modificación diferencial dependiente de la dosis de la expresión de c-fos y de la expresión del exón III y el exón IV de BDNF en la cóclea después de la administración local y sistémica de salicilato.
- Figura 5: La administración local de salicilato reduce la expresión de c-fos, el exón III y el exón IV de BDNF en la corteza auditiva.
- 35 Figura 6: El aumento de la expresión de BDNF en las neuronas cocleares provocado por salicilato se inhibe mediante el antagonista del canal de Ca⁺⁺ de tipo nifedipina.
- Figura 7: El aumento de la expresión del BDNF en las neuronas cocleares provocado por salicilato se inhibe mediante la benzodiazepina midazolam.

Ejemplo de realización

Materiales y métodos

40 Animales

Para los experimentos se utilizaron ratas hembra Wistar adultas que pesaban entre 280 y 300 gramos. El tratamiento y el manejo de estos animales se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Universidad de Tübingen, Instituto de Investigación Animal.

45 Las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal de acuerdo con el procedimiento de Guitton, M.J. y col. (2003), "Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors", J. Neurosci. 23, páginas 3944 a 3952, para

colocar el llamado Gelfoam (Gelita Tampon; B Braun Medical, Melsungen, Alemania) sobre la ventana redonda de los dos oídos. El Gelfoam se impregnó de acuerdo con las indicaciones con salicilato diluido en solución perilinfática artificial (70 mg/ml) o con el volumen correspondiente de perilinfa artificial sola. El Gelfoam se colocó en el nicho de la ventana redonda de acuerdo con la descripción; Guitton J. y col. (ídem). De este modo se administró localmente el salicilato a lo largo de 20 horas. Una vez transcurrido este tiempo, los animales fueron sacrificados y se les extirpó la cóclea y la corteza auditiva.

Preparación del tejido

Los animales fueron sometidos a anestesia profunda con dióxido de carbono y a continuación decapitados. Se aislaron las cócleas y se prepararon como se ha descrito previamente; véase Knipper, M. y col. (2000), "Thyroid hormone deficiency before the onset of hearing causes irreversible damage to peripheral and central auditory systems", J. Neurophysiol. 83, páginas 3101 a 3112. En pocas palabras, las cócleas se fijaron por inmersión en un 2% de paraformaldehído, sacarosa 125 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 100 mM, pH 7,4, durante dos horas; después de la fijación se descalcificaron durante 45 minutos en un "Rapid bone decalcifier" (#904687, Eurobio, Fisher-Scientific, 61130 Nidderau, Alemania) y a continuación se incubaron a lo largo de la noche en sacarosa al 25%, inhibidor de proteasa 1 mM (Pefabloc, Roche) en solución salina tamponada de Hank. Después de la incubación a lo largo de la noche, las cócleas se alojaron en un compuesto O.C.T. (Miles Laboratories, Elkhart, Ind., EE.UU.). A continuación, los tejidos se sometieron a criocorte con un espesor de 10 µm para la hibridación *in situ*, se colocaron sobre portaobjetos SuperFrost*/plus y se guardaron a -20°C antes de su utilización.

Las cortezas auditivas se identificaron de acuerdo con las descripciones dadas en Paxinos, G. & Watson, C. (1998), "The rat brain in stereotaxic coordinates", Academic Press, Inc. Para los preparados de ARN, los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaron a -70°C antes de su utilización.

Síntesis de ribosondas e hibridación *in situ*

Se aisló ADN genómico del tejido hepático de la rata mediante el kit Easy-DNA de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa para amplificar los cuatro exones 5' no codificadores del gen de BDNF.

Para amplificar la sonda específica del exón 3 se utilizó un cebador sentido (sense) (5' acc cac ttt ccc att cac cg 3') y un cebador antisentido (antisense) (5' cct ttt tca gtc act act tg 3') en cada caso correspondientemente a las posiciones de los nucleótidos 536 a 555 y 957 a 976 del fragmento genómico B (Timmusk, T. y col. (1995), "Identification of brain-derived neurotrophic factor promoter regions mediating tissue-specific, axotomy-, and neuronal activity-induced expression in transgenic mice", J. Cell. Biol. 128, páginas 185 a 199). Para la sonda específica del exón 4 se utilizaron un cebador sentido (5' cca atc gaa gct caa ccg aa 3') y un cebador antisentido (5' tca ggg tcc aca caa agc tc 3') correspondientemente a las posiciones de los nucleótidos 1732 a 1751 y 2059 a 2078 del fragmento genómico B (Timmusk, T. y col., ídem). Para amplificar la ribosonda común para el exón 5 codificador se utilizó un cebador sentido (5' gag gac cag aag gtt cg 3') y un cebador antisentido (5' ttt atc tgc cgc tgt gac 3') correspondientemente a las posiciones de los nucleótidos 309 a 325 y 534 a 551 (número de acceso M61175). Para sintetizar la sonda c-fos se utilizó un cebador sentido (5' gac ttt tgc gca gat ctg tc 3') y un cebador antisentido (5' ctg ctc tac ttt gcc cct tc 3') correspondientemente a las respectivas posiciones de los nucleótidos 276 a 295 y 508 a 527 del ADNc (número de acceso X06769).

En la reacción PCR el ADN genómico primero se desnaturalizó durante cuatro minutos a 94°C, seguido de 30 ciclos de un minuto a 94°C, un minuto a 55°C y un minuto a 72°C. La reacción de prolongación se llevó a cabo a 72°C durante diez minutos. Los fragmentos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 1% en 1 x tampón TAE. Los fragmentos que correspondían a las longitudes esperadas de las sondas específicas del gen se extrajeron utilizando el kit QIAquick-Gel-Extraction de Qiagen. Las longitudes esperadas de los fragmentos amplificados eran de 351 nucleótidos (exón III), 347 nucleótidos (exón IV), 243 nucleótidos (exón V) y 252 nucleótidos (c-fos). Estos fragmentos se clonaron en un pCR II Topo-Vektor (Invitrogen) y sus secuencias de nucleótidos se verificaron mediante un secuenciador automático.

Los plásmidos se aislaron utilizando un kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen. Con el fin de sintetizar plásmidos linealizados para la síntesis de las ribosondas sentido, los plásmidos primero se linealizaron con las enzimas de restricción adecuadas. Se sintetizaron las ribosondas utilizando las ARN polimerasas Sp6, T3 o T7 y se marcaron empleando rNTP-Mix, que contiene trifosfatos de uridina marcados con digoxigenina. Todas las enzimas de restricción, ARN polimerasas y rNTP marcados con digoxigenina se obtuvieron de Roche Diagnostics. La hibridación *in situ* se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Wiechers, B. y col. (1999), "A changing pattern of brain-derived neurotrophic factor expression correlates with the rearrangement of fibers during cochlea development of rats and mice", J. Neurosci. 19, páginas 3033 a 3042). Las secciones se cubrieron con Moviol (Sigma) y se examinaron utilizando un microscopio Olympus AX70.

Transcripción inversa, PCR semicuantitativa

Utilizando el kit Total-RNeasy de Qiagen se aisló ARN total tanto de la cóclea como del tejido cerebral y se trató con DNasa (Ambion) para eliminar contaminantes de ADN. A continuación se purificó el ARN y se determinaron las concentraciones mediante mediciones espectrométricas. La transcripción inversa del tejido cerebral se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µl utilizando 1 µg de ARN total como molde y transcriptasa inversa SUPERScript II Rnase H de acuerdo con el protocolo de Invitrogen. Debido a la cantidad limitada de ARN en los tejidos cocleares, se utilizó transcriptasa inversa Qiagen Senscript empleando 50 ng de ARN total como molde, tal como se describe en el protocolo de Qiagen. Para la PCR se optimizó la cantidad de los ciclos y la temperatura de adición con el fin de que las señales obtenidas para BDNF, c-fos y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) no estuvieran saturadas.

Las secuencias de cebador de PCR para arc eran 5' caa tgt gat cct gca gat tg 3' y 5' tgt tgg cat agg ggc taa ca 3'; para BDNF eran 5' ttc gac ccc gcc cgc cgt gg 3' y 5' ccc ctt tta atg gtc agt gt 3'; para c-fos eran 5' gac ttt tgc gca gat ctg tc 3' y 5' att cct ttc cct gat tc 3'; para GAPDH eran 5' tct act gc gtc ttc ac acc a 3' y 5' agg aga caa cct ggt cct cag t 3'. La PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 µl utilizando simultáneamente los dos cebadores para GAPDH y los genes dependientes de la actividad. En esta reacción PCR doble, un gen doméstico constituye un control interno en la misma reacción PCR, de modo que la intensidad del gen dependiente de la actividad se puede comparar inequívocamente con el control y las muestras tratadas. Para asegurar una normalización de las condiciones PCR y reducir las contaminaciones durante el pipeteado se utilizaron perlas PCR-ready-to-go-Beads de Amershan Pharmacia. Por último, los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2%, que se visualizó mediante una tinción con bromuro de etidio y análisis densiométrico utilizando un Alpha-Imagers 2200 de Biometra. La intensidad del gen dependiente de la actividad amplificado se normalizó para cada reacción al nivel del GAPDH coamplificado. Las condiciones de amplificación para arc, BDNF, c-fos y GAPDH fueron para la fase de desnaturalización inicial de 94°C durante tres minutos, 30 ciclos de un minuto de desnaturalización cada uno (94°C), un minuto de adición (54°C) 1,5 minutos de prolongación (72°C) y una fase de prolongación final de diez minutos a 72°C. Los fragmentos de PCR se clonaron y secuenciaron, tal como se ha descrito previamente.

25 Screening de ABR (ABR = "Auditory brainstem response" - "respuesta auditiva del tronco encefálico")

La anestesia de los animales y el screening de ABR se llevaron a cabo tal como ya se ha descrito previamente; véase Knipper, M. y col. (2000), ídem; Schimmang, T. y col. (2003), "Lack of BDNF and trkB signalling in the postnatal cochlea leads to a spatial reshaping of innervation along the tonotopic axis and hearing loss", *Development* 130, páginas 4741 a 4750.

30 Resultados

Tal como se describe más arriba, a unas ratas hembra que tenían aproximadamente el mismo peso se les administró salicilato localmente en el nicho de la ventana redonda. Para excluir cualquier efecto postraumático en la expresión de los genes dependientes de la actividad en las neuronas cocleares se utilizaron únicamente individuos que no presentaban ningún cambio en la capacidad auditiva después de la administración de Gelfoam. Como muestra la figura 1, no se observó ningún cambio significativo en el screening de ABR dependiente de clic antes de la operación o 20 horas después de la misma.

Los umbrales en el screening de ABR eran en gran medida idénticos antes y después de la operación (OP) y no se observaron diferencias esenciales ni en el caso de la administración de salicilato (n = 13; 5 µl; 70 mg/kg; salicilato) ni en el caso de la administración de perilinfa artificial (n = 9; 5 µl; control); véase la figura 1 (A). Un screening de ABR específico de la frecuencia antes y 20 horas después de la administración local de salicilato (n = 5; 5 µl; 70 mg/kg; salicilato) o perilinfa artificial (n = 6; 5 µl; control) en el nicho de la ventana redonda muestra que no se produce ninguna pérdida de audición; véase la figura 1 (B).

En un primer ensayo para determinar el momento adecuado en el que el salicilato administrado local o sistémicamente llega a la cóclea y modifica la excitabilidad neuronal, en diferentes momentos después de la administración de salicilato se llevó a cabo un examen de la expresión de c-fos en el tejido coclear mediante análisis RT-PCR. Se comprobó que la administración de salicilato (5 µl, 70 mg/ml) en Gelfoam no influye en la expresión de c-fos antes de aproximadamente 20 horas, posiblemente debido a un retardo en la segregación del líquido desde el Gelfoam. Se observó un aumento significativo de la expresión de c-fos 20 horas después de la administración, pero no tres horas después la misma (figura 2A). Por el contrario, en el caso de la administración sistémica de salicilato (350 mg/kg de peso corporal) por inyección intraperitoneal ya se observó aumento de la expresión de c-fos después de tres horas, sin que se produjera ningún cambio significativo durante los tiempos más largos, de hasta 20 horas. La expresión de GAPDH es igual tanto en el grupo control como en el grupo tratado con salicilato, con lo que se demuestra que en estos experimentos se utilizaron cantidades iguales de ARN (50 ng) (figura 2B). Posteriormente, para comparar los efectos agudos correspondientes, los efectos del salicilato aplicado localmente se analizaron 20 horas después de la administración y los efectos del salicilato inyectado sistémicamente se analizaron tres horas después de la administración.

5 En otro paso se analizó mediante hibridación *in situ* el efecto del salicilato administrado local y sistémicamente en la expresión de determinadas variantes *splice* del BDNF en los ganglios espirales (DG) de la cóclea de la rata. Para comparar se observó la expresión de c-fos. Como muestra el ejemplo de la figura 3 en tres experimentos individuales por duplicado, las señales de hibridación para c-fos (figura 3A), exón III de BDNF (figura 3B) y exón IV de BDNF (figura 3C) en la espira coclear basal media eran considerablemente mayores (coloración oscura) en comparación con la aplicación del mismo volumen de perilinfa artificial (figura 3, control) después de una administración tanto local (izquierda, 5 μ l; 70 mg/ml; administración local) como sistémica (derecha, 350 mg/kg de peso corporal, administración sistémica) de salicilato. Al utilizar muestras sentido (*sense*) no se observó ninguna señal de hibridación (datos no mostrados). La expresión del BDNF mostraba a lo largo del eje tonotópico una disminución característica desde las espiras cocleares basales/basales medias hacia las espiras cocleares más apicales (Schimmang, T. y col. (2003), ídem) y el aumento del patrón de expresión inducido por salicilato influía fundamentalmente en las espiras cocleares situadas en una posición más basal.

15 Para examinar posibles diferencias en los patrones de activación de determinados productos de transcripción de BDNF frente a diferentes niveles de excitación, se analizó el efecto de distintas dosificaciones de salicilato que podían influir de forma diferente en la excitabilidad neuronal; véase Kumagai (1992), "Effect of intravenous injection of aspirin on the cochlea", Hokkaido Igaku Tasshi 67 (2), páginas 216 a 233; Stypulkowski (1990), "Mechanisms of salicylate ototoxicity", Hear Res. 46 (1-2), páginas 113 a 145. Para ello se examinó el efecto del Gelfoam aplicado localmente, impregnado con diferentes volúmenes (5, 10, 20 μ l) de 70 mg/ml de salicilato y paralelamente el efecto de diferentes concentraciones de salicilato administrado sistémicamente (250 mg/kg, 350 mg/kg, 500 mg/kg de peso corporal). En el tejido coclear se analizaron los productos de transcripción de c-fos, exón III de BDNF y exón IV de BDNF utilizando análisis RT-PCR semicuantitativo de los ARN totales (figura 4).

25 De forma interesante, con los dos métodos de aplicación se determinó un efecto del salicilato dependiente de la dosis que, en comparación con GADPH, condujo a ligeras modificaciones del aumento de la expresión de c-fos. Los mayores efectos se observaron a una administración de 5 μ l o 10 μ l de salicilato en la ventana redonda o con una inyección de 250 mg/kg o 350 mg/kg de salicilato, mientras que con concentraciones mayores en los dos métodos de administración se observaron menos efectos evidentes (figura 4A).

Utilizando el mismo molde para amplificar el exón III o el exón IV de BDNF se observó una clara diferencia en el patrón de activación de los diferentes genes dependientes de la actividad.

30 Independientemente del método de aplicación, el exón III de BDNF se activó con algo de retraso después del exón IV de BDNF, lo que en caso de concentraciones mayores de salicilato resulta en un pico de la expresión del exón III de BDNF (figura 4), mientras que tanto el c-fos (figura 4A) como el exón IV de BDNF (figura 4C) reaccionan ya frente a dosis menores de salicilato. En tres experimentos por duplicado se obtuvieron resultados comparables que confirman el análisis densitométrico mostrado en la figura 4B, de acuerdo con el cual se produce un aumento significativo de la expresión del exón IV de BDNF ($49 \pm 12\%$, $n = 8$, $p < 0,05$) y de c-fos ($69 \pm 11\%$, $n = 8$, $p < 0,05$).

35 En la corteza auditiva se amplificaron las variantes *splice* del exón III y exón IV de BDNF, el exón V de BDNF común y productos de transcripción de c-fos (datos no mostrados). Se examinaron cortezas auditivas obtenidas de animales en los que se analizaron las cócleas en cuanto al efecto dependiente de la dosis del salicilato, se aisló en ARNm y se llevó a cabo una RT-PCR tal como se describe en la sección "Materiales y métodos".

40 Mientras la administración local o sistémica de salicilato conduce a un aumento de la expresión de los genes dependientes de la actividad analizados en la cóclea (figura 4), en tres experimentos independientes por duplicado se comprobó que en la corteza auditiva los dos métodos conducen a efectos contrarios en los genes dependientes de la actividad. A diferencia del efecto obtenido en las neuronas cocleares, la administración local de todas las dosificaciones de salicilato condujo a la reducción de la expresión de c-fos (figura 5A, izquierda), del exón III de BDNF (figura 5B, izquierda) y del exón IV de BDNF (figura 5C, izquierda).

45 Mientras que en la cóclea se detectaron distintos patrones de activación con dosificaciones diferentes y productos de transcripción de BDNF diferentes, el efecto de disminución en caso de concentraciones superiores no era tan claro en la corteza auditiva (figuras 5A-C). Mediante análisis densitométrico se confirmó que se produce una disminución significativa de la expresión del exón IV de BDNF ($49 \pm 12\%$, $n = 8$, $p < 0,05$) y de c-fos ($69 \pm 11\%$, $n = 8$, $p < 0,05$).

50 Los inventores han examinado en otro experimento si el fenómeno del aumento de la expresión del BDNF detectado por primera vez en el tinnitus agudo se puede eliminar utilizando israpidina, un antagonista del canal de Ca^{++} de tipo L, el cual influye sobre el receptor BDNF de la cascada de transducción de señales conectada en serie.

Para ello, 22 horas antes de la toma del tejido se administraron 10 μ l de una solución de cloruro sódico al 0,9% (figura 6A, solución salina) y 10 μ l de una solución de israpidina 10 mM (figura 6B, israpidina) localmente en el nicho de la ventana redonda, es decir, delante de la membrana de la ventana redonda. Tres horas antes de la toma de tejido de la

cóclea se inyectó sistémicamente un volumen idéntico de la solución de cloruro sódico (C) o 350 mg de salicilato por kg de peso corporal (Scy). Después de la toma del tejido se analizó la expresión de BDNF en los dos ensayos.

5 En la figura 6 se muestra la expresión del exón IV de BDNF bajo las condiciones arriba mencionadas. Como ya se ha indicado, el salicilato produce un aumento de la expresión del BDNF en las neuronas cocleares (figura 6A, pista derecha), mientras que dicho aumento de la expresión del BDNF se inhibe en el ensayo realizado idénticamente en el grupo de animales a los que se les había administrado isradipina en lugar de cloruro sódico.

10 El experimento anteriormente descrito y representado en la figura 6 también se llevó a cabo bajo condiciones idénticas con un antagonista del canal de Ca^{++} de tipo L: nifedipina. En este caso también se detectó un efecto inhibitor del aumento de la expresión del BDNF en las neuronas cocleares después de la inducción del tinnitus agudo, aunque menos intenso que en el caso de la isradipina (datos no mostrados).

15 Los inventores también han investigado si el aumento de la expresión del BDNF que acompaña al tinnitus agudo se puede inhibir mediante la administración de agonistas del receptor GABA, el cual interactúa en serie con la cascada de transducción de señales, tales como benzodiazepinas. Como ya se ha descrito anteriormente, a ratas hembra se les administraron cantidades crecientes de salicilato (Scy) localmente en el nicho de la ventana redonda. Como ya se esperaba por los experimentos arriba descritos, se observó un aumento de la expresión del producto de transcripción del exón IV de BDNF en las neuronas cocleares y una disminución de la expresión de la proteína citoesquelética dependiente de la actividad Arc en la corteza auditiva. La figura 7A muestra el resultado de una RT-PCR representativa para $n = 3$ con resultados comparables.

20 En otro ensayo experimental, a las ratas se les administraron sistémicamente 350 mg/kg de salicilato. Como muestra la figura 7A en relación con la administración local en la ventana redonda, la administración sistémica de salicilato también conduce a un aumento de la expresión del exón IV de BDNF (figura 7B, arriba) y, conforme a lo esperado, del c-fos (figura 7C, arriba) en las neuronas cocleares, mientras que en la corteza auditiva primaria se puede observar una disminución de la expresión de Arc (figura 7B, abajo) y del exón IV de BDNF (no mostrado) y ocasionalmente del c-fos (figura 7C, abajo).

25 Dos horas y media después de la inducción del tinnitus agudo por la inyección de 350 mg/kg de salicilato, los animales recibieron una administración sistémica de midazolam (Dormicum, Roche, Grenzach-Wyhlen, Alemania) (0,5 mg/kg de peso corporal) y después de la extracción del órgano se analizó la expresión génica con ayuda de una RT-PCR. Se comprobó que el midazolam (MDZ) conduce a una reducción significativa del efecto del salicilato en la expresión del exón IV de BDNF ($n = 7$) en las neuronas cocleares y de Arc en la corteza auditiva (figura 7B, barra derecha, $n = 12$), pero la expresión de c-fos permanece inalterable (figura 7C, barra derecha, $n = 7$ a 12). La evaluación estadística se llevó a cabo mediante un Test-T de Student; * = $p < 0,05$.

35 En otro experimento, correspondiente al anterior, se administró un agonista del receptor GABA pero no sistémicamente, sino localmente en el nicho de la ventana redonda, bajo condiciones por lo demás idénticas. En este experimento se comprobó que el aumento de la expresión del exón IV de BDNF en las neuronas cocleares relacionado con el tinnitus agudo se inhibía de forma todavía más intensa y que los efectos en la expresión del exón IV de BDNF en la corteza auditiva se reducían claramente.

40 Por consiguiente, la administración local de un antagonista de BDNF elimina la regulación errónea patológica de la expresión del BDNF en el caso del tinnitus agudo. Por consiguiente, los inventores han podido demostrar que los antagonistas de BDNF según la invención son sustancias que en principio son adecuadas para el tratamiento del tinnitus agudo.

Los inventores han podido demostrar por primera vez que el tinnitus agudo se puede tratar eficazmente con sustancias que bloquean o inhiben los receptores BDNF o que interactúan aguas abajo con la cascada de transducción de señales del BDNF o que la inhiben.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que induce un bloqueo o una inhibición del receptor de BDNF (trkB) como antagonista de trkB o de su cascada de transducción de señales aguas abajo, para su uso en el tratamiento del fenómeno fantasma de, tinnitus agudo en un ser humano o animal.
- 5 2. Compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto a emplear es un inhibidor de MAP-quinasa, un inhibidor de Cam-quinasa, un inhibidor de MAP-quinasa, un inhibidor de Pi3-quinasa, un inhibidor de PLC o un inhibidor de Shc.
3. Compuesto para su uso según la reivindicación 2, caracterizado porque el compuesto a emplear es un inhibidor de MAP-quinasa U 0126 o PD 98058.
- 10 4. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el compuesto se administra localmente en o al oído.
5. Compuesto para su uso según la reivindicación 4, caracterizado porque la administración local se lleva a cabo mediante la utilización de un hidrogel biodegradable, que sirve como matriz vehículo para el compuesto.
- 15 6. Compuesto para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico del fenómeno fantasma del tinnitus agudo en un ser humano o animal, seleccionado den grupo consistente en inhibidores de MAP-quinasa, preferentemente U 0126 o PD 98058, inhibidores de PLC, inhibidores de Pi3-quinasa, inhibidores de Shc e inhibidores de Cam-quinasa.

Figura 1

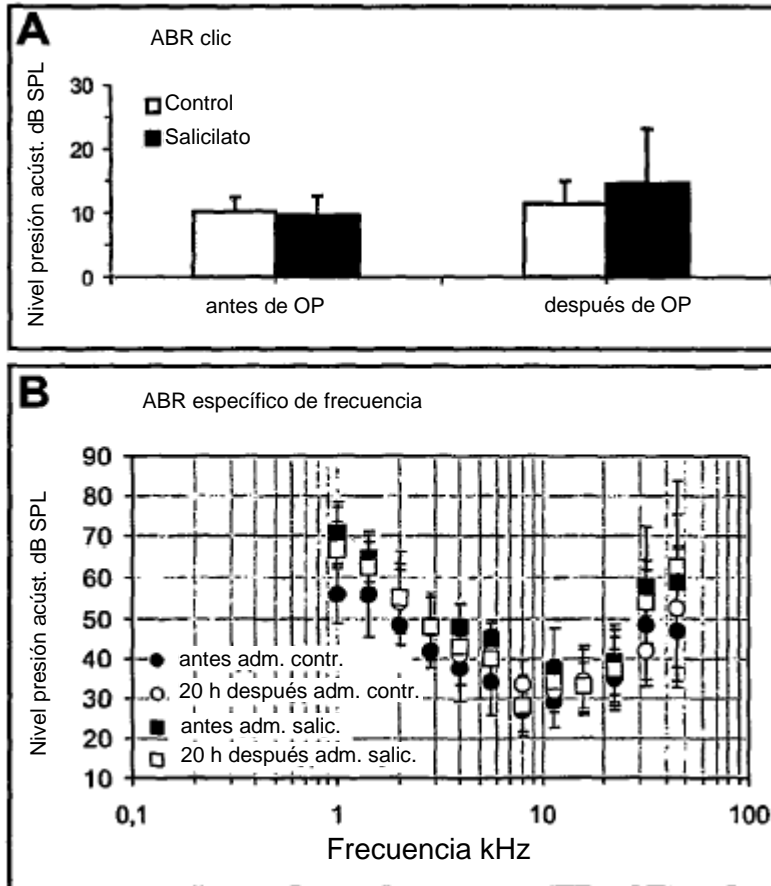


Figura 2

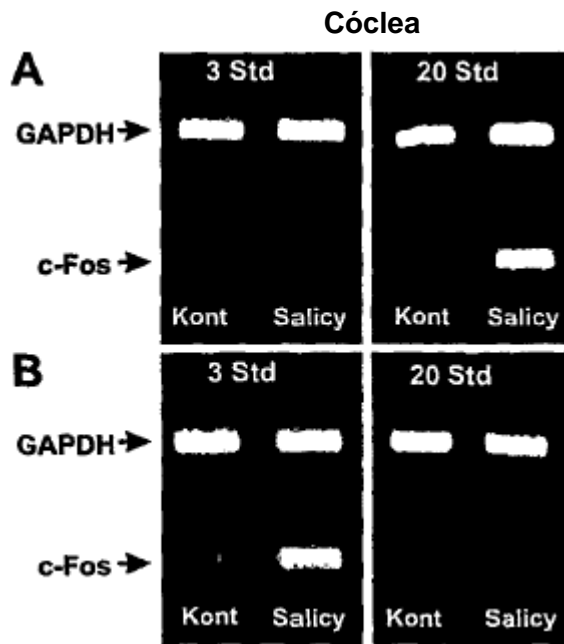


Figura 3

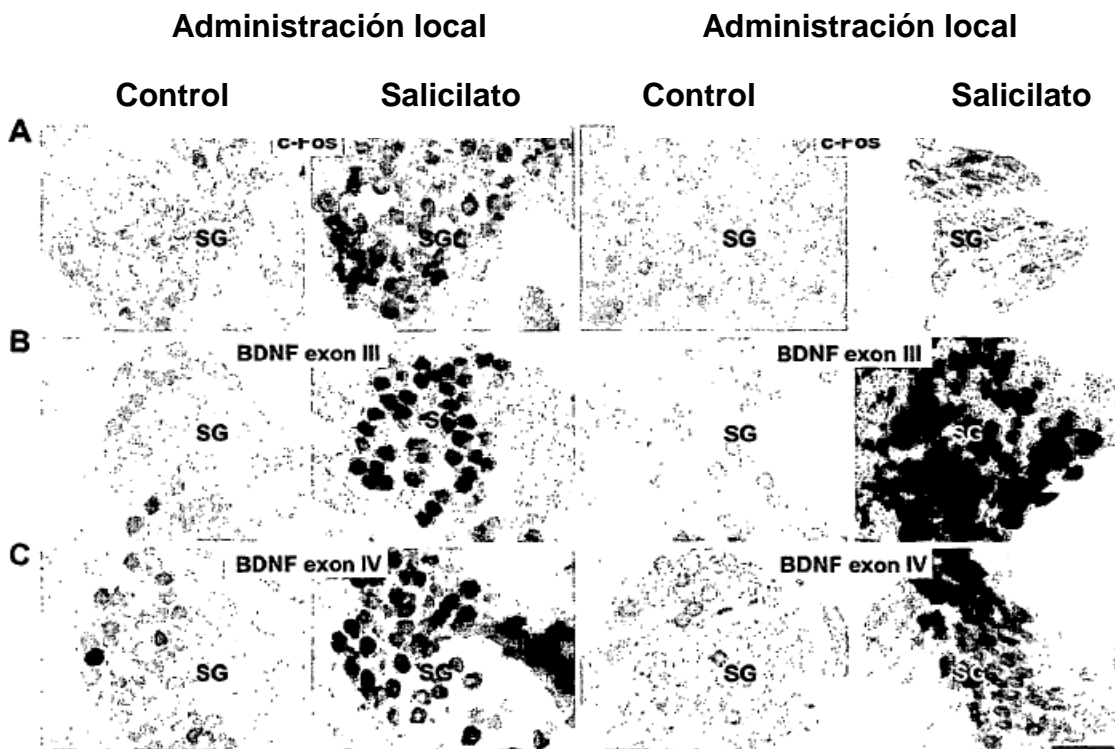


Figura 4

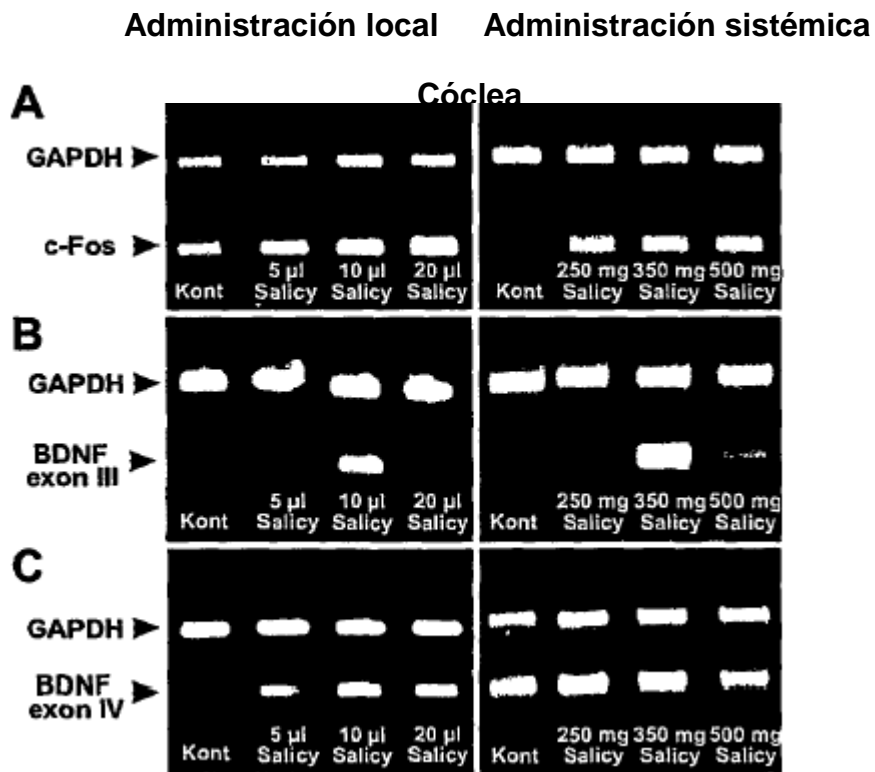


Figura 5

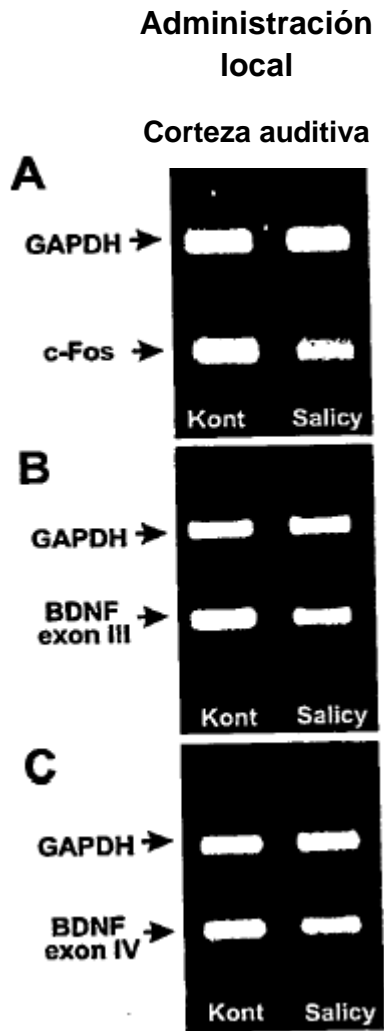


Figura 6

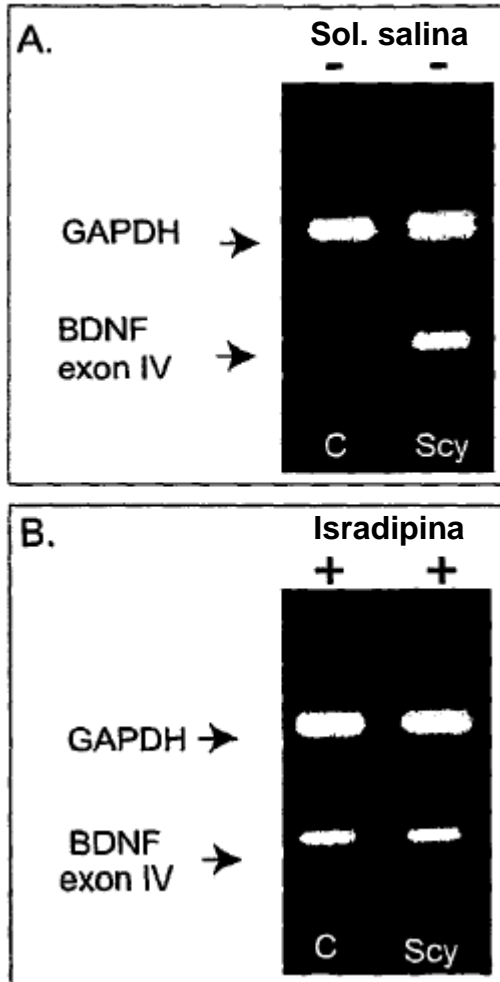


Figura 7

Administración local

