

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 599**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4178 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/439 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61K 31/4747 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/538 (2006.01)

A61P 1/08 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2010** **PCT/EP2010/056953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010** **WO10133663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010** **E 10723060 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.02.2018** **EP 2432467**

54 Título: **Antagonistas del receptor 5-HT3 de serotonina para uso en el tratamiento de trastornos vestibulares lesionales**

30 Prioridad:

20.05.2009 EP 09305464

21.10.2009 EP 09305996

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.04.2018

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris Cédex 13, FR**

72 Inventor/es:

**CHABBERT, CHRISTIAN y
VENAIL, FRÉDÉRIC**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 664 599 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

Antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso en el tratamiento de trastornos vestibulares lesionales

Campo de la invención:

- 5 La invención se relaciona con antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina seleccionados del grupo que consiste en azasetrón, tropisetrón, palonosetrón, lerisetron, alosetrón, granisetrón, dolasetrón, bemesetrón, ramosetron, itasetrón, zacoprida y cilansetrón, para uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno vestibular lesional..

Antecedentes de la invención

Introducción sobre los trastornos vestibulares

- 10 Los trastornos vestibulares (oído interno) puede causar mareo, vértigo, desequilibrio, cambios en la audición, náusea, fatiga, ansiedad, dificultad para concentrarse, et al. síntomas, con efectos potencialmente devastadores en el funcionamiento diario de una persona, la capacidad de trabajar, las relaciones con la familia y amigos, y la calidad de vida.

- 15 Por ejemplo, la neuritis vestibular es la primera causa de hospitalización para los vértigos no neurológicos. Debido a que su etiología es ampliamente desconocida, los estudios epidemiológicos son variables dependiendo de la fuente (se cree que su incidencia es entre 3.5 y 50 nuevos casos por 100000 personas/por año). En el pasado, una inflamación del nervio vestibular o isquemia laberíntica se propuso como la causa de la neuritis vestibular. Actualmente, se ve favorecida una causa viral. Una reactivación del virus del herpes simplex tipo 1 explicaría la repetición de la crisis de vértigo bajo una situación tal.

- 20 Los trastornos vestibulares pueden estar involucrados también en la mayoría de las caídas en los ancianos y su prevención se convirtió en una prioridad. De hecho, la caída en los ancianos representa más de 1% del presupuesto total del seguro médico en Francia (INSEE 1990). Esta afecta en Francia el 30% de las personas por encima de 65 y el 50% por encima de 80. La caída en los ancianos está involucrada en 2/3 de las muertes provocadas por accidente por encima de 65, y se multiplica por 4 el riesgo de muerte en el año siguiente.

- 25 1) Los trastornos vestibulares lesionales se refieren a trastornos vestibulares en los que las lesiones en las células del oído interno y/o el nervio vestibular están presentes o aparecerán durante el transcurso del tiempo del trastorno. En este caso, la funcionalidad del vestíbulo se ve afectada, ya que se puede observar mediante pruebas funcionales clínicas (VOR, VNG). Los trastornos vestibulares lesionales incluyen:

trastornos vestibulares en los que una infección inflama el oído interno y/o el nervio vestibular induciendo daños reversibles y/o irreversibles. Un ejemplo de las condiciones de este grupo es la neuritis vestibular.

- 30 trastornos vestibulares en los que los niveles del fluido del oído interno se ven afectados (anomalías en la cantidad, composición y/o presión de la endolinfa). Estos trastornos usualmente desarrollan lesiones durante el curso del tiempo de la enfermedad. Ejemplos de condiciones de este grupo son la enfermedad de Ménière y la hidropesía endolinfática secundaria. Actualmente están asociados con el tinnitus y la pérdida de audición.

- 35 Trastornos vestibulares inducidos por lesiones o lesiones de los endórganos terminales vestibulares. Ejemplos de dichas condiciones son el vértigo causado por la isquemia local, la excitotoxicidad y el trauma que afectan a los huesos temporales.

- 40 2) Los trastornos vestibulares no lesionales se refieren a trastornos vestibulares respaldados por crisis de vértigo transitorias y a menudo iterativas en los que no se puede observar lesión en las células del oído interno y/o el nervio vestibular. En este caso, la funcionalidad del vestíbulo evaluada entre la crisis de vértigo mediante pruebas funcionales (VOR, VNG) no difiere del vestíbulo saludable. Los trastornos vestibulares no lesionales incluyen:

trastornos vestibulares en los que se han recogido restos en una parte del oído interno. Estos restos, llamados otoconias, están formados por pequeños cristales de carbonato de calcio que envían señales falsas al cerebro cuando se desplazan. Ejemplos de dichas condiciones son vértigos posicionales.

Trastornos vestibulares iterativos de origen desconocido sin tinnitus ni pérdida de audición.

- 45 Evaluación de la pérdida funcional del vestíbulo

En humanos, las alteraciones morfofuncionales de los endórganos vestibulares no se pueden evaluar directamente (excepto en el caso de lesiones grandes que pueden detectarse mediante IRM). En cambio, los métodos de evaluación indirectos se utilizan actualmente para evaluar la pérdida de funcionalidad del vestíbulo. Estos métodos de prueba de comportamiento generalmente se llevan a cabo en clínicas/hospitales de ENT. Entre ellos, se pueden

citar la vestibulonistagmografía (VNG) y la evaluación del reflejo vestibulooculomotor (VOR) usando pruebas calóricas o de rotación.

Tratamientos de déficits vestibulares

- 5 Los tratamientos actuales de déficit vestibular se centran principalmente en la reducción de la crisis de vértigo usando fármacos vestibulopléjicos, limitando al mismo tiempo las reacciones neurovegetativas por el uso de fármacos anti-eméticos. Los corticosteroides y fármacos antivirales son la única medicación que trata de limitar la propagación del daño vestibular en caso de neuritis vestibular (que se supone que es debido a infecciones bacterianas o virus). Su efecto sigue siendo objeto de debate en relación con la falta de etiología en la mayoría del déficit vestibular.
- 10 Por ejemplo, la recuperación después de la neuritis vestibular es usualmente incompleta. En un estudio de 60 pacientes, la paresia del canal semicircular horizontal se encuentra en aproximadamente el 90% un mes después de la aparición de los síntomas, y en 80% después de seis meses; y las respuestas calóricas normalizadas en sólo 42%. Sobre la base de la incidencia de esta condición, un déficit dinámico unilateral sustancial y permanente del reflejo vestibulo-ocular, que no puede ser compensado por otros mecanismos, se desarrolla en aproximadamente 4000 personas por año en los Estados Unidos. Este déficit conduce a problemas de visión y el desequilibrio postural durante la marcha y, especialmente, durante el movimiento de la cabeza hacia el oído afectado.
- 15

Por consiguiente, existe la necesidad de una terapia de protección o reparación que prevenga, reduzca o trate la incidencia y/o gravedad de los trastornos vestibulares lesionales, dicha alteración funcional de las células del oído interno y/o el nervio vestibular se debe a una inflamación, lesiones o traumatismos de diversos orígenes.

- 20 Sorprendentemente, los Inventores descubrieron que los antagonistas de los receptores 5-HT₃ de serotonina, tal como el ondansetrón, podían prevenir o tratar las lesiones vestibulares protegiendo las células del oído interno y el nervio vestibular del daño o la degeneración. El ondansetrón es conocido por Jellish et al. (Journal of Clinical Anesthesia 2007, 9: 451-456) para la reducción de náuseas o vómitos postoperatorios después del tratamiento quirúrgico del oído medio. En particular, el ondansetrón era conocido por prevenir los vómitos severos después de la cirugía destructiva (tal como la sección del nervio vestibular o la laberintectomía) en pacientes con enfermedad de Ménière (Brookes GB, Clin Otolaryngol Allied Sci. 1996 Feb; 21 (1): 3-11). El ondansetrón también es conocido de Rice et al. (The Lancet 1995, 345: 1182-1183) para tratar síntomas tales como vértigo, náuseas y vómitos en trastornos del tallo cerebral como la esclerosis múltiple. Finalmente, el ondansetrón también se conoce por US2007265329 para prevenir las náuseas y los vómitos inducidos por la quimioterapia. Se ha informado que las propiedades antieméticas del ondansetrón están mediadas por una antagonización de los receptores 5-HT₃ de serotonina localizados en el centro del vómito (formación reticular lateral del tallo cerebral) que recibe aferentes vestibulares, somáticas, viscerales y límbicas (Tyers MB, Freeman AJ. Oncology, 1992, 49: 263 - 268). Esta acción farmacológica previene el reflejo del vómito usualmente mediado por la serotonina.
- 25
- 30

- 35 Mientras que el ondansetrón se usó para tratar o prevenir los síntomas eméticos asociados con el vértigo, los inventores descubrieron que también es capaz de prevenir y/o tratar los traumatismos directos o las lesiones dentro de los órganos vestibulares.

Resumen de la invención

- 40 La invención se refiere a antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina seleccionados del grupo que consiste en azasetrón, tropisetrón, palonosetrón, lerisetron, alosetrón, granisetrón, dolasetrón, bemesetrón, ramosetrón, itasetrón, zacoprida y cilansetrón, para el tratamiento de un trastorno vestibular lesional. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los temas que no están abarcados por el alcance de las reivindicaciones no forman parte de la presente invención.

En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina es azasetrón. En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina es tropisetrón.

- 45 En una realización, el trastorno vestibular lesional se selecciona del grupo que consiste en neuritis vestibular, neuronitis viral, laberintitis, laberintitis endolinfática viral, ototoxicidad inducida por fármacos, enfermedad de Ménière, hidrops endolinfática, traumatismo craneoencefálico con déficit vestibular lesional, hemorragia laberíntica, infección laberíntica crónica o aguda, laberinto seroso, barotraumatismo, enfermedad autoinmune del oído interno, enfermedad crónica de Ménière, presbivestibulia y alteraciones vestibulares tóxicas.

- 50 En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina debe administrarse por vía oral o parenteral. En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina debe administrarse directamente en el oído interno a través de la membrana timpánica. En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina debe administrarse por vía nasal.

En una realización, el antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina se formula en un dispositivo para administración nasal.

En una realización, el sujeto es humano.

Descripción detallada de la invención

5 Una investigación clínica reciente llevada a cabo por los Inventores demostró un efecto restaurador adecuado de un antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina (es decir, 1,2,3,9-tetrahidro-9-metil-3-[(2-metil-1H-imidazol-1-il)metil]-4H-carbazol-4-ona, también conocido como ondansetrón) en los impedimentos vestibulares que acompañan a la neuritis vestibular. Este antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina reduce eficientemente la alteración funcional de los endórganos vestibulares y subsecuentemente el déficit vestibular encontrado bajo tal patología del oído interno. Este resultado es relevante ya que constituye la primera demostración de que una terapia farmacológica enfocada en la protección y/o la restauración de la funcionalidad vestibular, puede llevar a una solución concreta para rescatar la funcionalidad vestibular después de impedimentos vestibulares lesionales. Además ofrece una oportunidad única para desarrollar la primera terapia curativa contra los déficits vestibulares lesionales.

10 Además, los Inventores hicieron por primera vez la observación de que las proteínas del receptor 5-HT3 de serotonina se expresan en varias partes del vestíbulo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para uso en el tratamiento de trastorno vestibular lesional.

20 Como se usa en este documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" se refieren a terapia curativa. Por consiguiente, el objetivo de la invención es proporcionar un final permanente de los trastornos vestibulares o una mejora de la condición del sujeto restaurando la funcionalidad o parte de la funcionalidad de los órganos terminales vestibulares y, por lo tanto, restaurando la funcionalidad vestibular. La invención no proporciona un método para controlar los síntomas indeseables asociados con el déficit vestibular, tales como vómitos y náuseas, pero proporciona un método para curar el déficit vestibular. La invención también tiene como objetivo prevenir la aparición de cualquier lesión o prevenir que la lesión ya presente aumente.

25 La presente invención proporciona composiciones (tales como composiciones farmacéuticas) para uso en un método para proteger/restaurar la red neuronal vestibular y en consecuencia para proteger/restaurar la funcionalidad vestibular en un sujeto afectado con un trastorno vestibular lesional.

30 Como se usa en el presente documento, el término "trastorno o déficit vestibular lesional" se refiere a trastornos vestibulares en los que las lesiones en las células del oído interno y/o el nervio vestibular están presentes o aparecerán durante el transcurso del tiempo del trastorno. En este caso, la funcionalidad del vestíbulo está deteriorada. Los trastornos vestibulares lesionales incluyen:

- trastornos vestibulares en donde una infección inflama el oído interno y/o el nervio vestibular induciendo daños reversibles y/o irreversibles. Un ejemplo de las condiciones de este grupo es la neuritis vestibular.
- 35 • trastornos vestibulares en donde los niveles de fluido del oído interno se ven afectados (anomalías en la cantidad, composición y/o presión de la endolinfa). Estos trastornos usualmente desarrollan lesiones durante el curso del tiempo de la enfermedad. Ejemplos de condiciones de este grupo son la enfermedad de Ménière e hidrops endolinfático secundario.
- Trastornos vestibulares inducidos por traumatismos o lesiones de los endórganos vestibulares. Ejemplos de dichas condiciones son las causas de vértigo por isquemia local, excitotoxicidad, trauma que afecta los huesos temporales.

40 Ejemplos de trastorno vestibular lesional que se contemplan por la invención incluyen neuritis vestibular, neuronitis viral, laberintitis, laberintitis endolinfática viral, ototoxicidad inducida por fármacos, enfermedad de Ménière, hidrops endolinfático, traumatismo de cabeza con déficit vestibular lesional, hemorragia laberíntica, infección laberíntica crónica o aguda, laberinto seroso, barotraumatismo, enfermedad del oído interno autoinmune, presbivestibulia, alteraciones vestibulares tóxicas.

45 De acuerdo con la invención, los trastornos vestibulares lesionales pueden identificarse usando IRM para lesiones grandes o mediante métodos de evaluación indirectos que permiten la evaluación de la pérdida de funcionalidad del vestíbulo. Estos métodos generalmente se llevan a cabo en clínicas/hospitales ENT e incluyen la vestibulonistagmografía (VNG) y la evaluación del reflejo vestibulooculomotor (VOR) usando pruebas calóricas o de rotación. La función del reflejo vestibulo-ocular (VOR) es estabilizar la imagen visual en la retina durante el desplazamiento. La medición de este VOR proporciona un método conveniente para investigar la funcionalidad del sistema vestibular. Básicamente, el paradigma se basa en monitorizar los movimientos de los ojos mediante la técnica de proyección de luz infrarroja (Fetoni et al., 2003, Hearing Research 2003, 182: 56-64). Los pacientes oscilan sinusoidalmente en la oscuridad alrededor de sus ejes vertical y longitudinal para evocar respuestas oculares horizontales y verticales. Cualquier deterioro funcional del vestíbulo se asocia con alteraciones en la ganancia del VNG evocado. Además de VOR y VNG, los métodos de posturografía se utilizan para detectar desviaciones

posturales del cuerpo que también están relacionadas con alteraciones del vestíbulo. Las investigaciones morfofuncionales, tal como las imágenes funcionales (IRM o CAT (tomografía axial computarizada) y derivadas) se pueden utilizar para detectar lesiones profundas dentro de los endórganos vestibulares. VNG, VOR y pruebas posturales adaptadas específicamente se usan en modelos animales de déficits vestibulares para evaluar la amplitud de los traumatismos o lesiones en el vestíbulo. Los estudios histológicos también son posibles usando microscopía de luz o electrónica convencional en tejido fijo (ganglios vestibulares y endórganos vestibulares). Tales investigaciones se realizan principalmente en roedores.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino, y un primate. Preferiblemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un humano.

- 10 De acuerdo con un aspecto, la invención se relaciona con un antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso en el tratamiento de un trastorno vestibular lesional,

De acuerdo con otro aspecto, la invención se refiere a un antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso en un método para restaurar la funcionalidad vestibular en un sujeto afectado con un trastorno vestibular lesional. Dicha restauración puede evaluarse utilizando el VNG o la evaluación del VOR como se menciona aquí anteriormente.

- 15 Como se usa en este documento, el término "receptor 5-HT₃ de serotonina" tiene su significado general en la técnica y se refiere al receptor 5-hidroxitriptamina (serotonina) subtipo 3. El término puede incluir el receptor 5-HT₃ de serotonina de origen natural y variantes y formas modificadas del mismo. El receptor 5-HT₃ de serotonina puede ser de cualquier fuente, pero típicamente es un receptor 5-HT₃ de serotonina de mamífero (por ejemplo, primate humano y no humano), particularmente un receptor 5-HT₃ de serotonina humano.

- 20 Como se usa en el presente documento, el término "antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina" incluye cualquier entidad química que, tras la administración a un paciente, da como resultado la inhibición o subregulación de una actividad biológica asociada con la activación del receptor 5-HT₃ de serotonina en el paciente, incluyendo cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo que de otro modo resultarían de la unión al receptor 5-HT₃ de serotonina de su ligando natural (es decir, serotonina). Tales antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina incluyen cualquier agente que pueda bloquear la activación del receptor 5-HT₃ de serotonina o cualquiera de los efectos biológicos aguas abajo de la activación del receptor 5-HT₃ de serotonina. Por ejemplo, dicho antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina puede actuar ocupando el sitio de unión del ligando o una porción del mismo del receptor 5-HT₃ de serotonina, haciendo que el receptor sea inaccesible a su ligando natural para evitar o reducir su actividad biológica normal. La actividad antagonista de los compuestos hacia los receptores 5-HT₃ de serotonina puede determinarse usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad antagonista de 5-HT₃ puede evaluarse en un ensayo de unión de radioligando y en el reflejo de von Bezold-Jarisch inducido por 5-HT en la rata tal como se describe por Turconi M. et al. (1990).

En una realización, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina puede ser una molécula orgánica pequeña.

- 35 El término "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula de un tamaño comparable a las moléculas orgánicas generalmente usadas en productos farmacéuticos. El término excluye macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). Las moléculas orgánicas pequeñas preferidas varían en tamaño hasta aproximadamente 5000 Da, más preferiblemente hasta 2000 Da, y lo más preferiblemente hasta aproximadamente 1000 Da.

- 40 Ejemplos de antagonistas 5-HT₃ de serotonina incluyen las pequeñas moléculas orgánicas descritas en las patentes US Nos. 4,695,578; 4,906,755; 4,886,808; 5,677,326; 5,202,333; 5,225,407; 5,360,800; 6,770,655; solicitudes de patente del Reino Unido Nos. 2100259, 2125398, 2153821, 2160871 y 2202530; solicitudes de patente europea publicadas Nos. 94724, 99789, 200444, 242973, 247266, 266730, 302699, 306323, 307172, 309423, 313393, 337547, 339950, 353983, 356098, 358903, 381422, 397364 y 397365; y solicitud de patente PCT No. 88/01866.

- 45 Los antagonistas 5-HT₃ de serotonina particularmente adecuados para uso de acuerdo con la invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en palonosetrón, tropisetron, lerisetron, alosetron, granisetron, dolasetron, bemisetron, ramosetron, azasetron, itasetron, zacoprida y cilansetrón.

Palonosetrón es (3aS)-2-[(S)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il]-2,3,3a,4,5,6-hexahidro-1-oxo-1H-benz[de]isoquinolina y se describe en la Patente U.S. No. 5,202,333.

- 50 Tropisetron es (3-endo)-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-il éster de ácido (+-)-1H-indol-3-carboxílico y se describe en la Patente U.S. No. 4,789,673.

Lerisetron es (1-(fenilmetil)-2-(1-piperazinil)-1H-benzimidazol) y se describe en la Patente U.S. No. 5,256,665.

Alosetron es 2,3,4,5-tetrahydro-5-metil-2-[(5-metil-1H-imidazol-4-il)metil]-1H-pirido[4,3-b]indol-1-ona y se describe en la Patente U.S. No. 5,360,800.

Granisetron es *endo*-N-(9-metil-9-azabicyclo[3.3.1]non-3-il)-1-metil-1*H*-indazol-3-carboxamida y se describe en la Patente U.S. No. 4,886,808.

Dolasetron es (2[alfa],6[alfa],8[alfa],9[alfa][beta])-octahidro-3-oxo-2,6-metano-2*H*-quinolizin-8-il-1*H*-indol-3-carboxilato, y se describe en la Patente U.S. No. 4,906,755.

- 5 Ramosetron es (1-metil-1*H*-indol-3-il)[(5*R*)-4,5,6,7-tetrahidro-1*H*-benzimidazol-5-il]metanona y se describe en la solicitud de patente europea No. 381422 A1.

Azasetron es clorhidrato de N-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il-6-cloro-3,4-dihidro-4-metil-3-oxo-2*H*-1,4-benzoxazin-8-carboxamida.

Itasetron es clorhidrato de (3-alfa-tropanil)1*H*-benzimidazol-3-carboxamida.

- 10 Zacopride es 4-amino-N-(1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-5-cloro-2-metoxibenzamida y se describe en la solicitud de patente europea No. 099789 A1.

Cilansetron es *R*-(-)-5,6,9,10-tetrahidro-10-[(2-metil-imidazol-1-il)metil]-4*H*-pirido[3.2.1-*jk*]carbazol-11(8*H*)-ona, y se describe en la Patente U.S. No. 4,939,136.

- 15 Los antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso de acuerdo con la invención pueden identificarse adicionalmente por métodos de selección descritos en el estado de la técnica. Los métodos de selección de la invención se pueden llevar a cabo de acuerdo con métodos conocidos. El método de selección puede medir la unión de un compuesto candidato al receptor 5-HT₃, o a células o membranas que portan el receptor 5-HT₃, o una proteína de fusión del mismo por medio de una etiqueta asociada directa o indirectamente con el compuesto candidato. Alternativamente, un método de selección puede implicar medir o, cualitativa o cuantitativamente, detectar la competencia de unión de un compuesto candidato al receptor 5-HT₃ con un competidor marcado (por ejemplo, antagonista o agonista). Además, los métodos de selección pueden probar si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por un antagonista del receptor, usando sistemas de detección apropiados para las células que portan el receptor. Los antagonistas pueden analizarse en presencia de un agonista conocido (por ejemplo, serotonina) y se observa un efecto sobre la activación por el agonista mediante la presencia del compuesto candidato. La unión competitiva usando agonistas conocidos tales como serotonina también es adecuada. La actividad antagonista de los compuestos hacia los receptores 5-HT₃ de serotonina puede determinarse usando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la actividad antagonista de 5-HT₃ puede evaluarse en un ensayo de unión de radioligando y en el reflejo de von Bezold-Jarisch inducido por 5-HT en la rata tal como se describe por Turconi M. et al. (1990).

- 30 Otro objeto de la invención se refiere a un antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para restaurar la funcionalidad vestibular en un sujeto afectado con un trastorno vestibular lesional.

Antagonistas del receptor 5-HT de serotonina pueden administrarse en forma de una composición farmacéutica, como se define más abajo.

Preferiblemente, dicho antagonista se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz.

- 35 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad suficiente del antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para tratar o prevenir déficit vestibular en una relación razonable de riesgo/beneficio aplicable a cualquier tratamiento médico.

- 40 Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención serán decididos por el médico que lo atiende dentro del alcance del criterio médico. El nivel de dosis específica terapéuticamente eficaz para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidencia con el polipéptido específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. Por ejemplo, es correcto para los expertos en la técnica comenzar con dosis del compuesto a niveles inferiores que aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosis diaria de los productos puede variar a lo largo de un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferiblemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del ingrediente activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que se va a tratar. Un medicamento típicamente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del ingrediente activo, preferiblemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. La composición de la invención puede comprender el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina en un rango de 0,01 mg a 500 mg, preferiblemente de 0,05 mg a 250 mg, de 0,1 mg a 100 mg, de 0,5 mg a 50 mg, de 1 mg a 25 mg, de 2,5 mg a 15 mg, de 5 mg a 15 mg, de 8 mg a 12 mg. Una cantidad eficaz de un fármaco se administra comúnmente a un nivel de dosificación de 0.0002 mg/kg a

aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0.001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

El antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina puede combinarse con excipientes farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente matrices de liberación sostenida, tales como polímeros biodegradables, para formar composiciones terapéuticas.

Los términos "farmacéuticamente" o "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones y entidades moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción inapropiada cuando se administran a un mamífero, especialmente un humano, de manera adecuada. Un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable se refiere a una carga líquida, semisólida o sólida no tóxica, diluyente, material de encapsulación o auxiliar de formulación de cualquier tipo.

En las composiciones farmacéuticas de la presente invención, el principio activo, solo o en combinación con otro principio activo, puede administrarse en una forma de administración unitaria, como una mezcla con soportes farmacéuticos convencionales, a animales y seres humanos. Las formas de administración unitaria adecuadas comprenden formas de la vía oral tales como tabletas, cápsulas de gel, polvos, gránulos y suspensiones o soluciones orales, formas de administración sublingual y bucal, formas de administración en aerosoles, implantes, subcutánea, transdérmica, tópica, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, subdérmica, transdérmica, intratecal e intranasal y formas de administración rectal.

Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas contienen vehículos que son farmacéuticamente aceptables para una formulación que se puede inyectar. Estos pueden estar en soluciones salinas estériles, isotónicos particulares (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio o mezclas de estas sales), o composiciones secas, especialmente liofilizadas las que tras la adición, dependiendo del caso, de agua o solución salina fisiológica esterilizada, permite la constitución de soluciones inyectables.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen las dispersiones o soluciones acuosas estériles, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de dispersiones o soluciones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.

Las soluciones que comprenden los compuestos de la invención como una base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua adecuadamente mezcladas con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones se pueden preparar además en glicerina, polietilenglicoles líquidos y mezclas de estos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Los antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina de la invención pueden formularse en una composición en una forma de sal o neutra. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición ácidas (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, tartárico oxálico, mandélico. Las sales con los grupos carboxilo libres se pueden derivar además de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína.

El portador puede ser además un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de éstos, y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión, y por el uso de surfactantes. La prevención de la acción de microorganismos puede proporcionarse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal. En muchos casos se preferirá incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse por el uso en las composiciones de agentes absorción retardada, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar los ingredientes activos en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requieran, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de este

Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación en cantidades tales que sean terapéuticamente eficaces. Las formulaciones se administran fácilmente

en una variedad de formas de dosificación, tal como el tipo de soluciones inyectables descritas anteriormente, pero también pueden emplearse las cápsulas de liberación del fármaco y similares.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe estar adecuadamente tamponada si es necesario y el diluyente líquido se hace primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade a 1000 ml de fluido de hipodermoclastia o se inyecta en el sitio propuesto de infusión. Algunas variaciones en la dosificación ocurrirán necesariamente dependiendo de la condición del sujeto que se va a tratar. La persona responsable de la administración determinará en cualquier caso la dosis adecuada para el sujeto individual.

El antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina de la invención puede formularse dentro de una mezcla terapéutica para comprender aproximadamente 0.0001 a 1.0 miligramos, o aproximadamente 0.001 a 0.1 miligramos, o aproximadamente 0.1 a 1.0 o incluso aproximadamente 10 miligramos por dosis más o menos. Pueden administrarse además múltiples dosis.

Además de los compuestos de la invención formulados para la administración parenteral, tal como la inyección intravenosa o intramuscular, otras formas farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, tabletas u otros sólidos para la administración oral; formulaciones liposomales; cápsulas de liberación en el tiempo; y cualquier otra forma usada actualmente.

En una realización particular, el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina se administra directamente en el oído interno a través de la membrana timpánica. Este modo de administración puede preferirse para introducir un efecto directo y a largo plazo en el vestíbulo. En consecuencia, en una realización preferida, los antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina se administran en una formulación de gel para permitir una liberación a largo plazo de dicho antagonista o inhibidor en el oído interno.

En otra realización de la invención, la composición de la invención se formula para administración nasal. La administración nasal ofrece varias ventajas:

- la dosis del compuesto activo puede reducirse ya que la mucosa lo absorbe rápidamente y la biodisponibilidad es alta;
- el inicio de la acción terapéutica es rápido;
- se evita el metabolismo de primer paso hepático;
- se puede evitar un metabolismo en el tracto gastrointestinal;
- se mejora el cumplimiento del paciente.

La vía de administración nasal del antagonista del receptor 5-HT₃ de la serotonina proporciona un suministro rápido del fármaco activo a la sangre a través de la mucosa nasal altamente permeable y evita el efecto de primer paso hepático. La ventaja de esta vía de administración es que no es agresiva y permite la autoadministración. Otra ventaja es el rápido inicio de acción después de la inhalación y la mayor biodisponibilidad en comparación con la administración oral, lo que conduce a anticipar una eficacia mejorada. Esta vía también es muy conveniente para tratar a los pacientes que se reciben en la sala de emergencias. Usualmente están estresados por los vértigos y la vía nasal es más fácil de administrar que la vía intravenosa y es más relevante que la administración oral, especialmente cuando los pacientes sufren de náuseas o vómitos.

Otra ventaja consiste en evitar la ingesta oral adicional (tabletas/cápsulas), que es interesante en pacientes de edad avanzada, que están recibiendo medicamentos múltiples para otras enfermedades y aprovecharían la vía nasal. En pacientes con insuficiencia hepática, la vía nasal de ondansetrón debe recomendarse y preferirse a la vía oral o intravenosa. El riesgo de sobredosis accidental es limitado con la formulación nasal.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es un antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso en el tratamiento de un trastorno vestibular lesional como se describió anteriormente, en donde la composición que comprende el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina está en una forma adecuada para la administración nasal. Otro objeto de la invención es un dispositivo para administración nasal de un antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina para uso en el tratamiento de un trastorno vestibular lesional.

Dicha ruta de administración permite una mejor biodisponibilidad del agente activo en comparación con otra vía de administración y es de interés para tratar sujetos que pueden sufrir vómitos.

Las formas adecuadas para administrar el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina en la cavidad nasal son gotas o aerosoles. Los dispositivos de aspersión pueden ser sistemas de dosis única (unidad) o de dosis múltiples, por ejemplo que comprenden una botella, bomba y accionador.

Los dispositivos de aspersión generalmente dispensan entre 0.04 y 0.25 mL en una sola actuación. Los regímenes de dosificación nasal típicos van desde una sola aspersión en una fosa nasal hasta dos aspersiones en cada orificio nasal.

- 5 La composición que comprende el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina puede comprender además vehículos o bases, ajustadores de pH, conservantes, estabilizantes, aromatizantes y absorbentes.

Ejemplos de vehículos o bases incluyen agua, hidroxipropilcelulosa, ácido alginico, quitosano o gamma poliglutamato. Ejemplos de reguladores de pH incluyen fosfato de sodio dibásico, ácido cítrico o citrato de sodio. Ejemplos de conservantes incluyen cloruro de sodio o sorbato de potasio. Ejemplos de sabores incluyen D-sorbitol, glicirrhiza, sacarina o estevia. Ejemplos de absorbentes incluyen ácido biliar.

- 10 La composición de la invención para administración nasal puede comprender el antagonista del receptor 5-HT₃ de serotonina en un rango de 0,01 mg a 500 mg, preferiblemente de 0,05 mg a 250 mg, de 0,1 mg a 100 mg, de 0,5 mg a 50 mg, de 1 mg a 25 mg, de 2,5 mg a 15 mg, de 5 mg a 15 mg, de 8 mg a 12 mg.

Un ejemplo de una composición de acuerdo con la invención para la administración nasal es una composición a base de agua que comprende ondansetrón base, cloruro de sodio, sorbato de potasio y citrato.

- 15 La invención se ilustrará adicionalmente por las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras:

- Figura 1: Ilustración de los efectos clínicos del ondansetrón versus metoclopramida en una muestra de 20 pacientes. La ilustración de los efectos clínicos de cinco días de tratamiento con ondansetrón (8 mg/día, n=10) versus metoclopramida (30 mg/día, n=10) en una muestra de 20 pacientes. Las dos moléculas se administraron junto con fármacos vestibulopléjicos, corticosteroides y antivirales, en pacientes que presentan una sospecha de neuritis vestibular. La nistagmografía vestibular se usó 48 horas y 1 mes después del tratamiento (5 días duración) para evaluar la evolución del déficit vestibular (A). En las primeras pruebas calóricas, el déficit vestibular fue menos pronunciado (56,53% versus 84,38%, p=0,03) en pacientes tratados con ondansetrón versus metoclopramida. Después de un mes, la diferencia no fue significativa ya en nuestra muestra (43,0% ondansetrón versus 63,4% metoclopramida, p=0,07). El tiempo de los primeros pasos (B) y la duración de hospitalización (C) también se redujeron significativamente en pacientes administrados con ondansetrón.

- Figura 2: Expresión de los receptores 5HT-3 en el vestíbulo del mamífero. (A) detección inmunocitológica de los receptores 5HT-3A en el ganglio de Scarpa (A) y del epitelio sensorial vestibular (B-D). En A, se observó que las células de Schwann y las células endoteliales no estaban marcadas. En B-D, se observó que los receptores 5HT-3A se expresaron específicamente por las células de transición (flechas grandes) que rodean el epitelio sensorial y en pocas fibras nerviosas (puntas de flecha).

- Figura 3: Evaluación conductual del efecto del ondansetrón sobre los déficits vestibulares inducidos por excitotóxicos (cainato). (A) protocolo utilizado para inducir un déficit vestibular lesional unilateral. Se inyectó ondansetrón por vía intraperitoneal (ip) a 4 mg/kg. 1 hora después de la inyección de KA, se probó el comportamiento vestibular de los animales seguido de la inyección de ondansetrón en el grupo de tratamiento. Los animales de control no recibieron una inyección de ondansetrón. Posteriormente, los animales se probaron a las 2 horas, 6 horas, 24 horas y 48 horas después de la inyección de KA. (B) Expresión conductual del déficit vestibular inducido por kainita. Después de la inyección transtimpánica de ácido kaínico, las ratas muestran fuertes déficits vestibulares excitotóxicamente inducidos que disminuyen gradualmente en 48 horas. Este curso de tiempo de déficits vestibulares disminuidos se ve alterado cuando los animales son tratados con ondansetrón, con déficits vestibulares significativamente reducidos a las 24 horas (*p = 0,022, prueba de Mann Whitney, n≥8). Posteriormente, tanto los animales tratados como los no tratados se recuperan a niveles de déficit vestibular similares debido a los mecanismos compensatorios endógenos.

- Figura 4: Evaluación histológica de las lesiones vestibulares inducidas excitotóxicamente (kainato). KA induce una gran lesión excitotóxica de las aferentes vestibulares en el epitelio sensorial 2 horas después de su inyección transtimpánica (A), en oposición a la oreja contralateral no lesionada (C). Se observaron grandes terminaciones sinápticas hinchadas a lo largo de las células ciliadas en lugar de las típicas terminaciones nerviosas tipo calizo I y tipo botón II. 24 horas después de la lesión, se observaron terminaciones del nuevo cáliz y de los botones con (B) y sin (D) ondansetrón.

- Figura 5: Análisis morfométrico de las lesiones vestibulares inducidas excitotóxicamente (kainato). La inyección transtimpánica de KA no indujo pérdida de cabello o células de soporte. Por el contrario, el número de células ciliadas tipo I identificadas con su cáliz circundante se redujo en gran medida y de forma significativa por KA (P <0,001), confirmado por el aumento en el número de células ciliadas no determinadas (P <0,01). Cuando se contaron 24 horas después de la lesión excitotóxica, el número de células ciliadas tipo I recientemente identificadas aumentó significativamente (p <0,01), pero el número de células ciliadas no determinadas no se redujo significativamente. Para el tratamiento con ondansetrón, se observó un número significativamente mayor de células

ciliadas tipo I 24 horas después de la lesión KA ($p < 0,01$). El número de células ciliadas no determinadas se redujo significativamente con el tratamiento con ondansetrón ($P < 0,01$).

Figura 6: Evaluación conductual del efecto del ondansetrón sobre el déficit vestibular bilateral (nitrilo). (A) protocolo utilizado para inducir déficit vestibular lesional bilateral. (B-E) Curso temporal de la expresión de déficits vestibulares en presencia o ausencia de tratamiento con ondansetrón. El aumento de los déficits vestibulares no se altera significativamente cuando los animales recibieron ondansetrón simultáneamente (B), 24 horas (C) o 48 horas (D) después de la inyección de IDPN. Por el contrario, se produjo una modificación significativa del curso temporal del aumento del déficit vestibular ($p = 0,029$) cuando se inyectó ondansetrón a las 24 y 48 horas (E) después de la inducción del déficit vestibular.

10 Ejemplos

Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferidos de hacer y poner en práctica la presente invención. Además, a menos que la descripción de un Ejemplo se presente en el tiempo pasado, el texto, al igual que el resto de la descripción, no pretende sugerir que los experimentos se llevaron a cabo en realidad o los datos se obtuvieron realmente.

15 Ejemplo 1: Reducción de déficit vestibular seguido de neuritis aguda vestibular por ondansetrón

Métodos

Se llevó a cabo un estudio clínico realizado por los Inventores en el Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Montpellier. Se realizaron pruebas clínicas aleatorias en 20 pacientes. Los pacientes se seleccionaron bajo la sospecha de neuritis vestibular comenzada menos de 24 horas antes de la hospitalización. Todos los pacientes fueron administrados con metilprednisolona y valaciclovir, y con 5 días de tratamiento con metoclopramida (30 mg/día, $n=10$) o con ondansetrón (8 mg/día, $n=10$). La evaluación funcional se basó en una prueba temprana de VNG (nistagmografía vestibular) (realizada 24 a 48 horas después de comenzar el déficit vestibular) y una VNG en 1 mes. La duración de la hospitalización y la fecha de los primeros pasos se registraron además.

Resultados

Con respecto a la VNG temprana, el déficit vestibular fue menos pronunciado en pacientes administrados con ondansetrón (56,53% versus 84,38%, $p=0,03$). En 1 mes, el déficit vestibular no se diferenció en los dos grupos de pacientes (43% O versus 63,4% M, $p=0,07$). La duración de la hospitalización se redujo significativamente en el grupo de ondansetrón (2,88 versus 4,5 días, $p=0,03$). Además, el tiempo de los primeros pasos se acortó significativamente (1,25 versus 2,25 días, $p=0,001$).

Este estudio clínico demostró que el ondansetrón muestra efecto significativo en la reducción del déficit vestibular después de la neuritis vestibular aguda en humanos (Figura 1A). Las investigaciones clínicas de la función vestibular usando la prueba calórica sugiere una protección directa o efecto restaurador en los endórganos vestibulares periféricos. Ese efecto farmacológico no interfiere con la compensación central a largo plazo. Su consecuencia es un alivio significativo del mareo y una reducción de la duración de la hospitalización (Figura 1B-C). Estas observaciones clínicas indican que el ondansetrón y sus derivados pueden ser útiles en el mantenimiento y la restauración de la inervación dentro del vestíbulo.

Ejemplo 2: Las dianas celulares del antagonista de 5-HT₃ de serotoninas se expresa en los endórganos vestibulares

El supuesto efecto directo de los antagonistas del receptor 5-HT₃ de serotonina en el vestíbulo se soporta en reportes previos que los receptores de serotonina se expresan en el oído interno y específicamente en los endórganos vestibulares (Johnson and Heinemann, 1995; Gil-Loyzaga et al., 1997), y el reciente experimento histológico de los Inventores que las proteínas de los receptores 5-HT₃ están presentes en el epitelio vestibular.

Métodos

Localización inmunohistoquímica de dianas farmacológicas en el vestíbulo.

Se anestesiaron ratas hembras adultas (Wistar, 200-220 g, $n = 2$) con pentobarbital (0,4%). Los animales se perfundieron transcárdialmente con heparina PBS (0,01 M) seguido de una solución de fijación (4% de paraformaldehído, 1% de ácido pícrico, 5% de sacarosa) y muestras post-fijadas. Se incorporaron ganglios vestibulares y epitelios en agarosa al 4% y se cortaron secciones de 40 μ m de grosor. La preincubación en solución bloqueante (0,5% de gelatina de pescado, 0,5% de Triton X-100 y 1% de BSA en PBS) evitó la unión no específica. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios: receptores anti-5HT-3A de anticuerpos policlonales de conejo (1: 200; AB5657; Millipore, Billerica, MA). Para el control, Se omitió el anticuerpo primario investigado. Los anticuerpos secundarios revelaron marcado específico con sueros anti-conejo de burro conjugados con Alexa 594 (1: 200, Molecular Probes, Eugene, OR). El microscopio confocal Zeiss 5 live dúo de escaneo láser (imágenes RIO, Montpellier, Francia) permitió la observación de muestras montadas en portaobjetos.

Resultados

Como se muestra en la Figura 2, los receptores 5HT-3 se expresan en el ganglio de Scarpa (Figura 2A). Todas las neuronas vestibulares primarias (flechas) se tiñeron para los receptores 5HT-3A, tanto el soma grande como el de tamaño pequeño eran inmunofluorescentes. La célula de Schwann y las células endoteliales no fueron marcadas. En el epitelio sensorial vestibular (Figuras 2B-D), los receptores 5HT-3A se expresaron específicamente por las células de transición (flechas grandes) que rodean el epitelio sensorial y en pocas fibras nerviosas (puntas de flecha). La co-tinción con neurofilamentos y proteínas de unión a calcio (datos no mostrados) sugiere fuertemente una expresión muy restringida a fibras eferentes distintas.

Ejemplo 3: Validación del efecto restaurador del ondansetrón.

El presente ejemplo pretende validar en modelos animales de déficit vestibular el efecto restaurador en los endórganos vestibulares de un antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina que puede seleccionarse del grupo que consiste de ondansetrón, granisetron, tropisetron, o palonosetrón observado en humanos. También tiene la intención de determinar el proceso biológico (protección/repación) involucrado en ese proceso. Esto se evalúa mediante la comparación de la evolución temporal de los daños histológicos y el déficit vestibular en ambos modelos de déficit vestibular unilateral y bilateral bajo la aplicación de dichos antagonistas del receptor 5-HT3 de serotonina. La combinación de los dos modelos animales distintos de déficit vestibular permite determinar el beneficio de usar dicho antagonista de 5-HT3 de serotonina en condiciones de déficit vestibular unilateral o bilateral. Para nuestro conocimiento, son los primeros paradigmas centrados en el sistema vestibular mamífero. La determinación del proceso biológico involucrado en el efecto restaurador de dicho antagonista de 5-HT3 de serotonina en el vestíbulo permite definir la ventana terapéutica que se usará en las futuras pruebas clínicas.

Déficits vestibulares unilaterales (Figuras 3-5)

La validación del efecto restaurador de dichos antagonista de 5-HT3 de serotonina se evaluó analizando el curso de tiempo de llegada y eliminación de ambas lesiones excitotóxicas y el consiguiente déficit vestibular que se producen dentro de endórganos vestibulares durante la aplicación intra auricular de agonistas de glutamato. En los endórganos vestibulares, la aplicación masiva de ácido kaínico induce impedimentos excitotóxicos de la red neuronal en los órganos de los sentidos (hinchamiento de los terminales que contactan las células ciliadas, - Brugeaud et al., 2007). Los estudios histológicos de la expansión y la reducción de las lesiones excitotóxicas se llevan a cabo mediante microscopía óptica y electrónica. La evaluación del comportamiento de déficit vestibular se lleva a cabo usando pruebas de comportamiento específicas de la función vestibular. Bajo el paradigma desarrollado en rata, la aplicación transtimpánica de ácido kaínico permite su difusión en el oído interno. En la mayoría de los casos, las lesiones excitotóxicas culminan después de 12 horas y desaparecen en 2-3 días. La protección se investiga después de la administración de dicho antagonista 5-HT3 de serotonina por inyección intraperitoneal de dicho antagonista 5-HT3 de serotonina 1 hora después del traumatismo de ácido kaínico.

Métodos

Inducción del déficit vestibular unilateral

El ácido kaínico (KA), un agonista glutamatérgico, se inyectó transtimpánicamente en el oído medio, después de lo cual se difunde a través de la ventana redonda hacia el oído interno (vestíbulo y cóclea) donde actúa sobre las fibras nerviosas aferentes. Esto emula los mecanismos de lesión excitotóxica de origen patológico que conducen a déficits vestibulares. Se evalúa el efecto de la inyección de KA usando pruebas de comportamiento de déficits vestibulares y cuantificación histológica de la lesión inducida.

Se inyectó ondansetrón por vía intraperitoneal (ip) a 4 mg/kg (Figura 3A).

1 hora después de la inyección de KA, se probó el comportamiento vestibular de los animales seguido de la inyección de ondansetrón en el grupo de tratamiento. Los animales de control no recibieron una inyección de ondansetrón. Posteriormente, los animales se probaron a las 2 horas, 6 horas, 24 horas y 48 horas después de la inyección de KA. El análisis histológico y morfométrico se realizó a las 2 y 24 horas después de la inyección de KA en presencia y ausencia de tratamiento con ondansetrón.

Evaluación conductual del déficit vestibular

La puntuación de calificación vestibular se estimó como se describió previamente (Brugeaud et al., 2007; Boadas-Vaello et al., 2005). Los animales se puntuaron entre 0 y 4, respectivamente, que corresponde a la conducta normal hasta el déficit vestibular máximo. La calificación 1 significa que el comportamiento no es normal, pero no se determina de manera efectiva ningún déficit vestibular específico; la calificación 2 corresponde a un déficit vestibular identificado pero leve y la calificación 3 describe un déficit identificado y evidente. Se analizaron secuencialmente seis pruebas diferentes y se totalizaron para clasificar el déficit vestibular: 1-el cabeceo de la cabeza, cuando se observó una extensión anormal intermitente hacia atrás del cuello; 2-el movimiento estereotipado circulando desde ninguno hasta círculos compulsivos alrededor de las caderas de los animales; 3-retropulsion, una caminata hacia atrás típica que refleja una alteración vestibular; 4-el reflejo colgando de la cola, que normalmente induce una

extensión normal de la extremidad anterior para llegar al suelo, da como resultado la inclinación ventral del cuerpo y el agarre de la cola cuando el déficit vestibular es máximo; 5-el reflejo de inhibición de contacto normalmente lleva al animal a una rejilla metálica en posición supina para regresar cuando su espalda toca el suelo; en caso de déficit vestibular con una falta en la orientación del cuerpo referencial, este reflejo es abolido, el animal permanece pegado a la cuadrícula en una posición supina; 6-el reflejo de enderezamiento del aire es necesario para que los animales aterricen sobre sus patas cuando caen de una posición supina; La disfunción vestibular afecta esta reversión normal, un déficit máximo lleva al animal a aterrizar sobre su espalda cuando se deja caer desde una altura de 40 cm sobre un cojín de espuma. Los puntajes de calificación vestibular se expresaron para cada punto de tiempo como un porcentaje del puntaje.

10 Evaluación histológica de lesiones vestibulares

Preparación de secciones semifina del epitelio sensorial. Se anestesiaron ratas hembras adultas (Wistar, 200-220 g, n = 3 para cada tratamiento) con pentobarbital (0,4%). Los animales se perfundieron transcárdialmente con heparina PBS (0,01 M) seguido de una solución de fijación (paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 2,5%, ácido pícrico al 1%, sacarosa al 5%) y muestras post-fijadas. Se embebieron los epitelios vestibulares en órganos vestibulares enteros, se fijaron en OsO₄ al 2%, se deshidrataron, se embebieron en Araldite y se cortaron secciones de 1 µm de grosor. Un escáner de diapositivas Nanozoomer (RIO Imaging, Montpellier, Francia) permitió la observación y el escaneo de muestras montadas en portaobjetos.

Se analizaron las selecciones de secciones semifinas adquiridas con el escáner de diapositivas Nanozoomer. La cuantificación de las células ciliadas en los utrículos se realizó con el software Metamorph (Universal Imaging). Para cada oreja lesionada y contralateral, se analizaron 3 secciones distantes de 20 a 25 µm cada una. Por lo tanto, se contaron 400 células para cada epitelio para cada tratamiento en 3 animales diferentes con la oreja contralateral como control agrupado. Las células se contaron como 1) células ciliadas de tipo I cuando se observó una célula en forma de pera con su cáliz circundante; 2) células ciliadas tipo II cuando se observó una célula alargada con un núcleo altamente posicionado; 3) célula ciliada de tipo no determinado cuando el terminal sináptico hinchado alrededor de la célula impide determinar un tipo de célula en función de su forma, cuando el cáliz no se veía alrededor de las células en forma de pera, cuando una célula alargada tiene un núcleo en una posición baja; 4) células de soporte que forman la parte basal del epitelio. ANOVA se utilizó para buscar diferencias estadísticas, seguido de Prueba de Tukey para comparar tratamientos.

Resultados

Después de la inyección transtimpánica de ácido kaínico, las ratas exhiben déficits vestibulares inducidos excitotóxicamente fuertes que disminuyen gradualmente en 48 horas (Figura 3B). Este tiempo de déficits vestibulares disminuidos se ve alterado cuando los animales son tratados con ondansetrón, con déficits vestibulares significativamente reducidos a las 24 horas (*p= 0,022, prueba de Mann Whitney, n≥8). Posteriormente, tanto los animales tratados como los no tratados se recuperan a niveles similares de déficit vestibular debido a los mecanismos compensatorios endógenos.

Como se muestra en la Figura 4A, KA induce una gran lesión excitotóxica de las aferentes vestibulares en el epitelio sensorial 2 horas después de su inyección transtimpánica. En comparación con la oreja contralateral no lesionada (Figura 4C), se observaron grandes terminaciones sinápticas hinchadas a lo largo de las células ciliadas en lugar de las terminaciones nerviosas típicas tipo I de calizo y tipo II botón. Cuando se observó 24 horas después de la lesión, se observaron terminaciones del nuevo calizo y botones con (Figura 4B) y sin (Figura 4D) ondansetrón. En el nivel microscópico fotónico, el ondansetrón pareció potenciar la maduración de estos terminales sinápticos "neo-formados".

Como se muestra en la Figura 5, el análisis morfométrico determinó que no se indujo pérdida de pelo o células de soporte mediante la inyección transtimpánica de KA. A la inversa, el número de células ciliadas tipo I identificadas con su cáliz circundante se redujo en gran medida y de manera significativa por KA (P <0,001), confirmado por el aumento del número de células ciliadas no determinadas (P <0,01). Cuando se contaron 24 horas después de la lesión excitotóxica, el número de células ciliadas tipo I recientemente identificadas aumentó significativamente (p <0,01), pero el número de células ciliadas no determinadas no se redujo significativamente. Este resultado demostró la capacidad de reparación de los terminales sinápticos después de una lesión excitotóxica. Para el tratamiento con ondansetrón también, observamos un número significativamente mayor de células ciliadas tipo I 24 horas después de la lesión KA (p <0,01). Lo que es más interesante, el número de células ciliadas no determinadas se redujo significativamente con el tratamiento con ondansetrón (P <0,01), lo que refleja una protección y/o la facilitación de la reparación de los terminales sinápticos lesionados excitotóxicos.

Las observaciones del comportamiento actual de que los déficits vestibulares inducidos por kainato se reducen significativamente (24 horas después del traumatismo excitotóxico) tras el tratamiento con ondansetrón, pueden interpretarse o bien mediante la prevención de la extensión de las lesiones o una potenciación de los procesos de recuperación en las ratas tratadas. En cualquier caso, se puede postular que el mejor estado vestibular observado en los animales tratados con ondansetrón se ve respaldado por una mejor eficiencia de la función del vestíbulo. Las

observaciones histológicas apoyan la idea de que el patrón de ramificación de las células ciliadas se conserva mejor o se repara mejor en los animales tratados.

Déficits vestibulares bilaterales (Figura 6)

- 5 La validación del efecto restaurador de dicho antagonista de 5-HT3 de serotonina se evalúa además en un modelo animal de déficit vestibular bilateral analizando el curso de tiempo de llegada y eliminación de ambas lesiones excitotóxicas y asegurando el déficit vestibular después de la intoxicación con nitrilos (Inyección IP - Seoane et al., J. Comp. Neurol. 2001, 439:385-399). Después de su metabolización, los nitrilos inducen daños ototóxicos/excitotóxicos y déficits vestibulares identificables dentro de los 3 días posteriores a su aplicación aguda. La protección se evalúa mediante la administración de dicho antagonista 5-HT3 de serotonina siguiendo diferentes programas (al comienzo de la intoxicación crónica, 24 y 48 horas después)

Método

- 15 IDPN (1 g/kg; ip) induce daño vestibular bilateral y permanente a través de la destrucción del epitelio sensorial vestibular. Esta lesión progresiva alcanza su extensión máxima después de 72 horas. Se evalúa el efecto de la inyección de IDPN usando pruebas de comportamiento de déficits vestibulares. Se evalúa el efecto protector de las inyecciones simples o dobles de ondansetrón a lo largo del curso temporal de la progresión de la lesión luego de la inyección de IDPN para determinar el potencial vestibuloprotector del ondansetrón. Cada dosis de ondansetrón se inyectó por vía intraperitoneal (ip) a 4 mg/kg.

Se usaron 4 paradigmas de tratamiento (Figura 6A):

- 20 A. Inyección simultánea de ondansetrón (1 dosis) e IDPN.
B. Inyección de ondansetrón (1 dosis) 24 horas después de la inyección de IDPN.
C. Inyección de ondansetrón (1 dosis) 48 horas después de la inyección de IDPN.
D. 2 inyecciones de ondansetrón (un total de 2 dosis) 24 horas y 48 horas después de la inyección de IDPN.

Las pruebas conductuales se realizaron a las 6, 24, 30, 48, 54, 72 y 96 horas después de la inyección de IDPN.

Resultados

- 25 El curso temporal del aumento de los déficits vestibulares no se altera significativamente cuando los animales recibieron ondansetrón simultáneamente con IDPN ($p \leq 0,05$ prueba de Mann Whitney, $n \geq 5$) (Figura 6B).

El curso temporal del aumento de los déficits vestibulares no se altera significativamente cuando los animales se tratan con ondansetrón, 24 horas después de la inyección de IDPN ($p \leq 0,05$ prueba de Mann Whitney, $n \geq 7$) (Figura 6C).

- 30 El curso temporal del aumento de los déficits vestibulares no se altera significativamente cuando los animales se tratan con ondansetrón 48 horas después de la inyección de IDPN ($p \leq 0,05$ prueba de Mann Whitney, $n \geq 6$) (Figura 6D).

- 35 Se inyectó ondansetrón a las 24 y 48 horas (2 dosis) después de la inducción del déficit vestibular con IDPN ($t = 0$ h). Las pruebas conductuales han demostrado una modificación significativa del curso temporal del aumento del déficit vestibular a las 54 horas ($p \leq 0,05$ prueba de Mann Whitney; $n \geq 7$). Los animales tratados con ondansetrón a las 24 y 48 horas mostraron déficits vestibulares significativamente menos graves a las 54 horas después de la segunda inyección de ondansetrón (figura 6E).

- 40 Las observaciones del comportamiento actual de que los déficits vestibulares inducidos por nitrilo se reducen significativamente (24 y 48 horas después del traumatismo tóxico) tras el tratamiento con ondansetrón, pueden interpretarse mediante una prevención temprana de la extensión de las lesiones, en lugar de una potenciación de los procesos de recuperación en las ratas tratadas. De hecho, los nitrilos matan las células ciliadas en 3 días, impidiendo así cualquier reconexión de las aferentes nerviosas como se postula que ocurre en los animales tratados con kainato. En cualquier caso, se puede postular que el mejor estado vestibular observado en los animales tratados con ondansetrón se ve respaldado por una mejor eficiencia de la función del vestíbulo. Las investigaciones histológicas futuras permitirán determinar si el patrón de ramificación de las células ciliadas se conserva mejor a las 24 horas, 48 horas después del traumatismo al nitrilo en los animales tratados.

Referencia

Ejemplo 4: Ejemplos de composición que comprende ondansetrón para administración nasal

	Composición 1	Composición 2	Composición 3
Base de ondansetrón	8 mg/mL	10 mg/mL	6 mg/mL
Cloruro de sodio	0.9%	0.9%	0.9%
Sorbato de potasio	0.125%	0.125%	0.125%
Citrato	qsp pH 4.5	qsp pH 4.5	qsp pH 4.5
Agua purificada	q.s.	q.s.	q.s.

Estabilidad de la solución que comprende base de ondansetrón

Se encontró que una solución que comprendía aproximadamente 8 mg/ml de base de ondansetrón era físicamente estable después de 1 mes de almacenamiento a 25 ° C y 1 mes de almacenamiento a 4 ° C.

- 5 La estabilidad química de la solución también se evaluó:

Pruebas	Especificaciones	T ₀	T= 1 mes a 25°C	T = 1 mes a 4°C
Aspecto de la solución	Clara	Clara	Clara	Clara
Coloración	> o = JB7	ok	ok	Ok
pH	3.30-4.5	4.44	5.35	4.95
Partículas				
> o = 10 µm	< o = 6000/botella	52	338	65
> o = 25 µm	< o = 600/botella	5	75	10
Dosificación	95-105%	100%	101.4%	102.9%
Impurezas totales	< o = 0.5%	0.02%	0.12%	0.13%

Estas observaciones muestran que la modificación del pH no está asociada con la degradación química significativa de ondansetrón. No se puede observar precipitación. La estabilización del pH puede realizarse usando un regulador de citrato.

10 Referencias

A lo largo de esta solicitud varias referencias describen el estado de la técnica con la cual se relaciona esta invención.

Brugeaud A, Travo C, Demêmes D, Lenoir M, Llorens J, Puel JL, Chabbert C. Control of hair cell excitability by vestibular primary sensory neurons. J Neurosci. 2007; 27(13):3503-11.

- 15 Gil-Loyzaga P, Bartolomé MV, Vicente-Torres MA. Serotonergic innervation of the organ of Corti of the cat cochlea. Neuroreport. 1997;8(16):3519-22.

Johnson DS, Heinemann SF. Embryonic expression of the 5-HT₃ receptor subunit, 5-HT_{3R}-A, in the rat: an in situ hybridization study. Mol Cell Neurosci. 1995; 6(2):122-38.

- 20 Seoane A, Demêmes D, Llorens J. Relationship between insult intensity and mode of hair cell loss in the vestibular system of rats exposed to 3,3'-iminodipropionitrile. J Comp Neurol. 2001; 439(4):385-99.

Turconi M, Nicola M, Quintero MG, Maiocchi L, Micheletti R, Giraldo E, Donetti A. Synthesis of a new class of 2,3-dihidro-2-oxo-1H-benzimidazol-1-carboxílico acid derivatives as highly potent 5-HT₃ receptor antagonists. J Med Chem. 1990 Ago;33(8):2101-8.

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para usar en el tratamiento de un trastorno vestibular lesional en un sujeto en necesidad del mismo, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina se selecciona del grupo que consiste de azasetrón, tropisetrón, palonosetrón, lerisetron, alosetrón, granisetrón, dolasetrón, bemeseetrón, ramosetron, itasetrón, zacoprida y cilansetrón
2. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina es azasetrón.
3. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina es tropisetrón.
4. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho trastorno vestibular lesional se selecciona del grupo que consiste en neuritis vestibular, neuronitis viral, laberintitis, laberintitis endolinfática viral, ototoxicidad inducida por fármacos, enfermedad de Ménière, hidrops endolinfático, traumatismo craneoencefálico con déficit vestibular lesional, hemorragia laberíntica, infección laberíntica crónica o aguda, laberinto seroso, barotraumatismo, enfermedad autoinmune del oído interno, enfermedad de Ménière crónica, presbivestibulia y deficiencias vestibulares tóxicas.
5. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina debe administrarse por vía oral o parenteral.
6. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina debe administrarse directamente en el oído interno a través de la membrana timpánica.
7. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina debe administrarse por vía nasal.
8. El antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 7, en donde dicho antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina se formula en un dispositivo para administración nasal.
9. El Antagonista del receptor 5-HT3 de serotonina para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el sujeto es un humano.

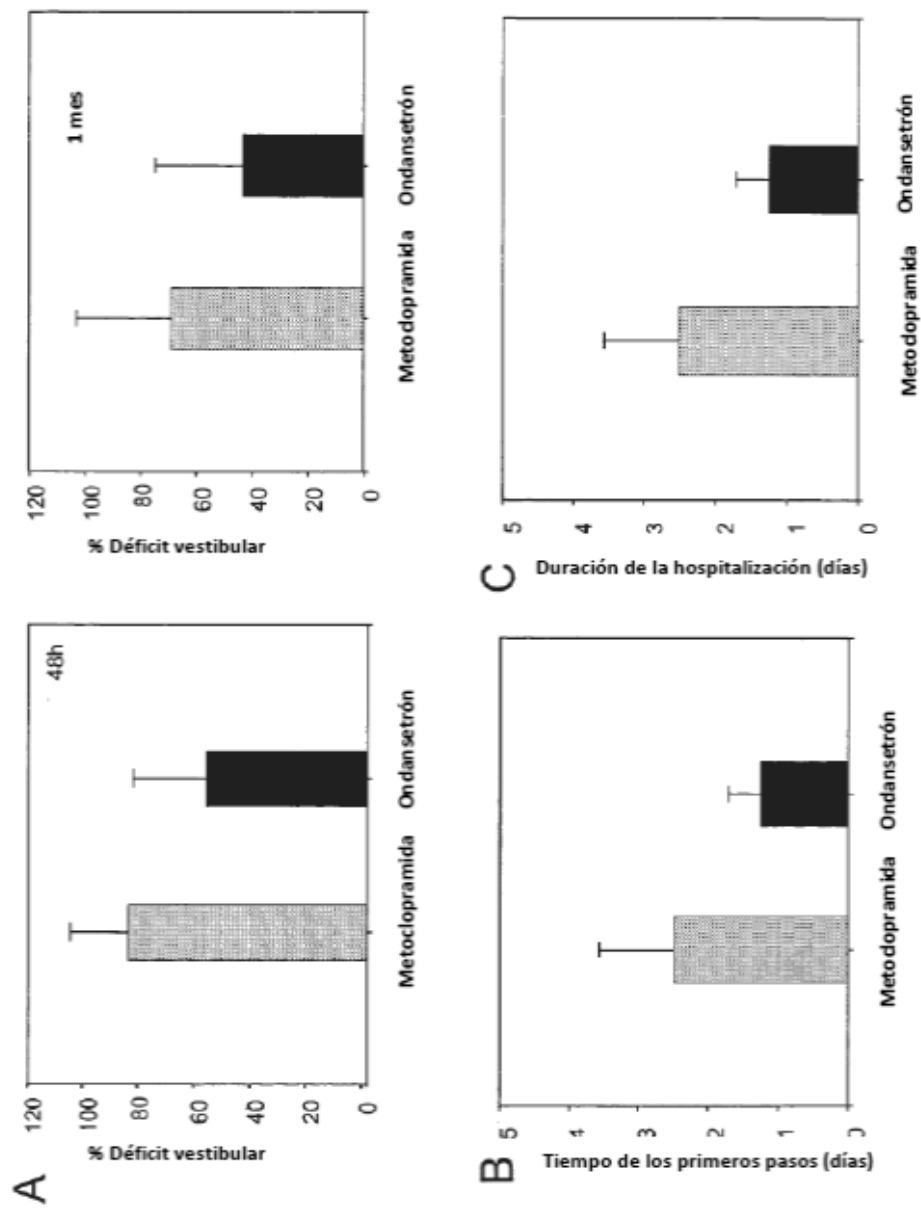
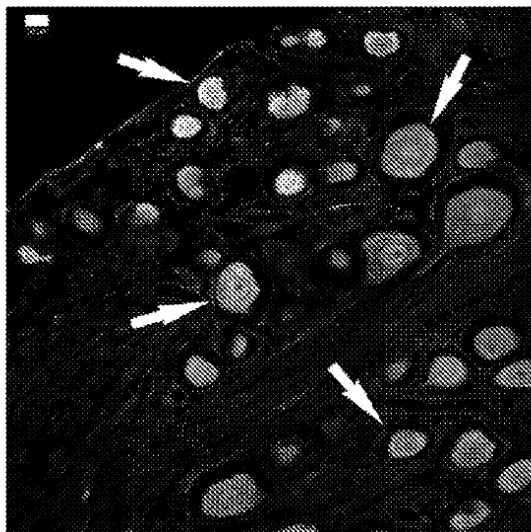
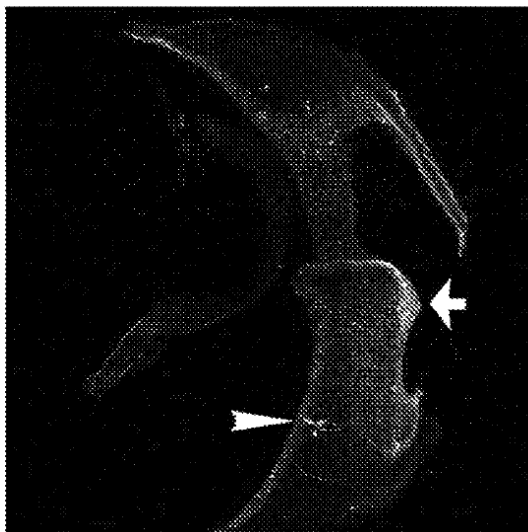


FIGURA 1

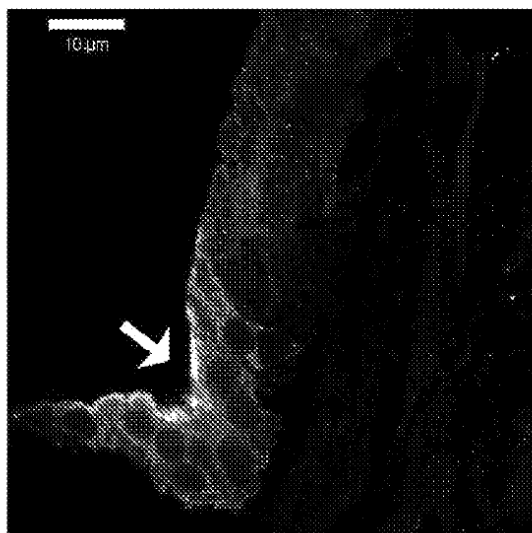
A. Ganglio de Scarpa



B. Cresta completa



C. Sección transversal de la Cresta



D. Pila de sección óptica de la Cresta

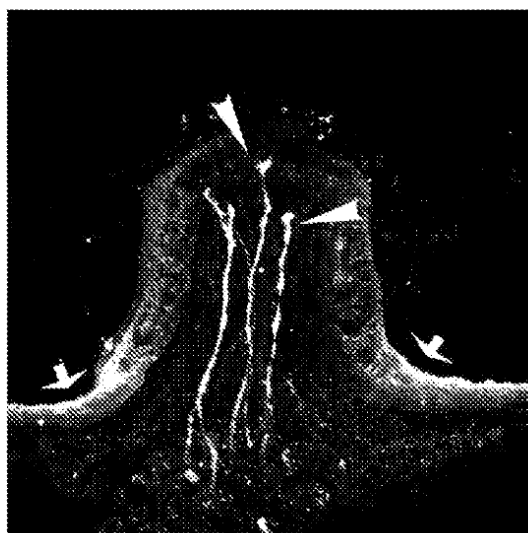


Figura 2

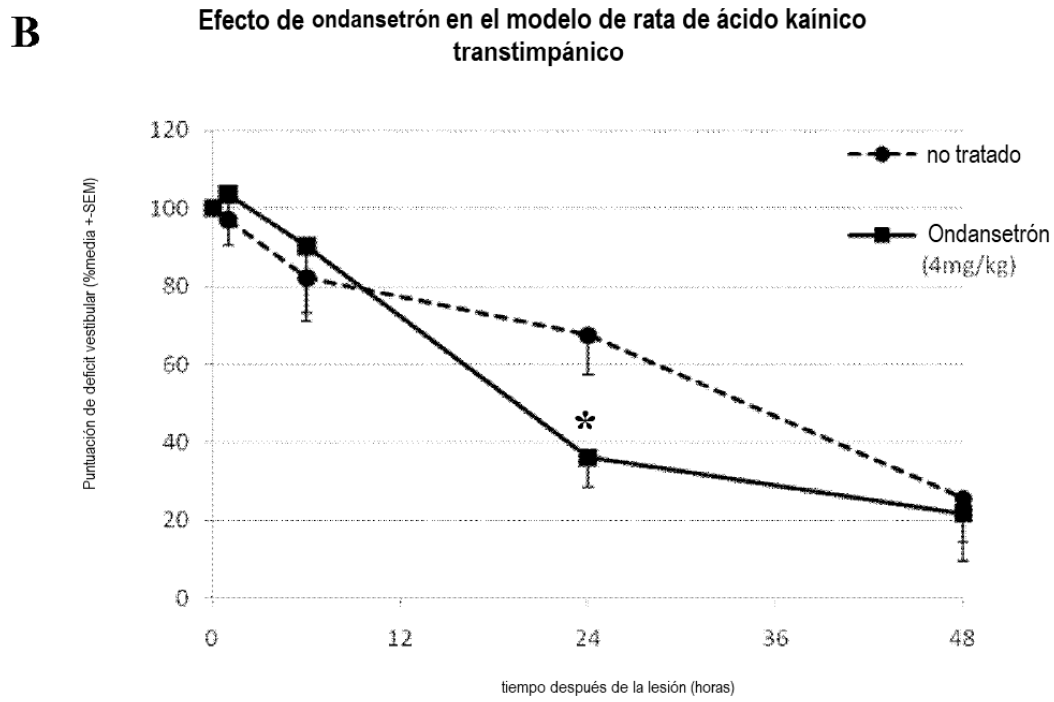
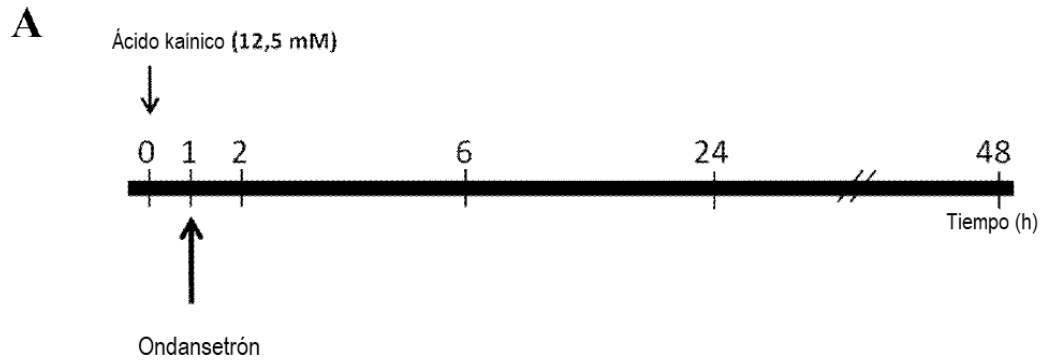


Figura 3

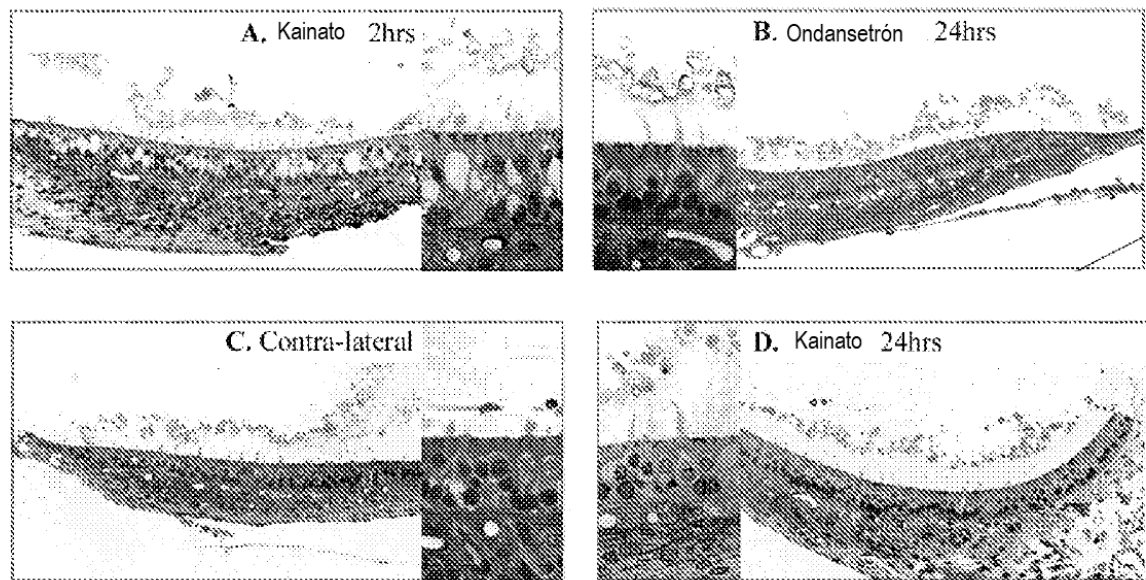


Figura 4

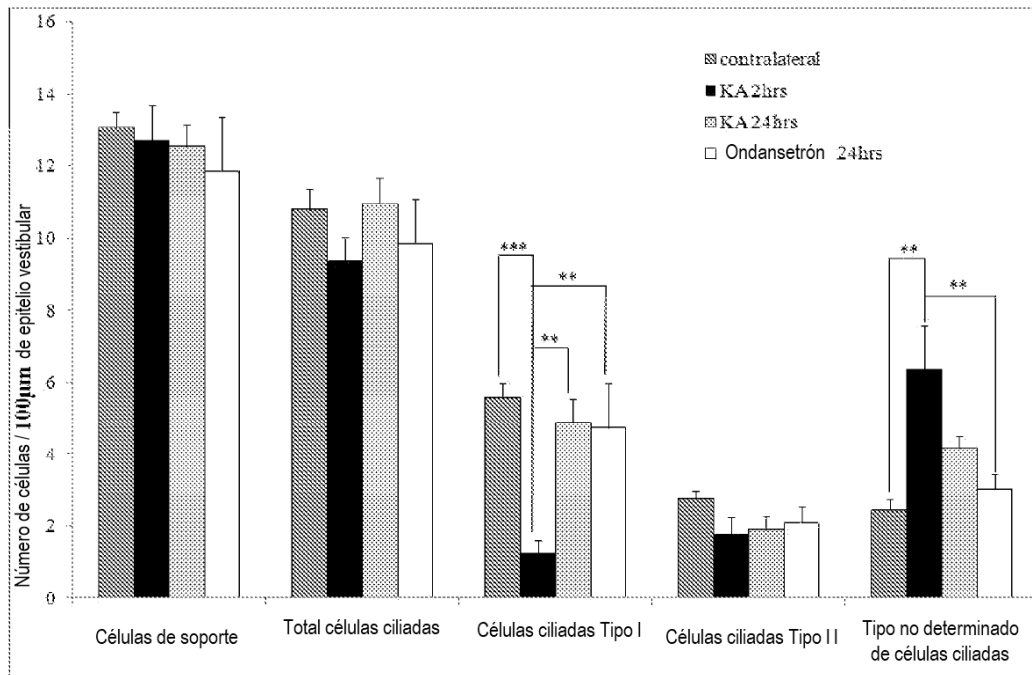


Figura 5

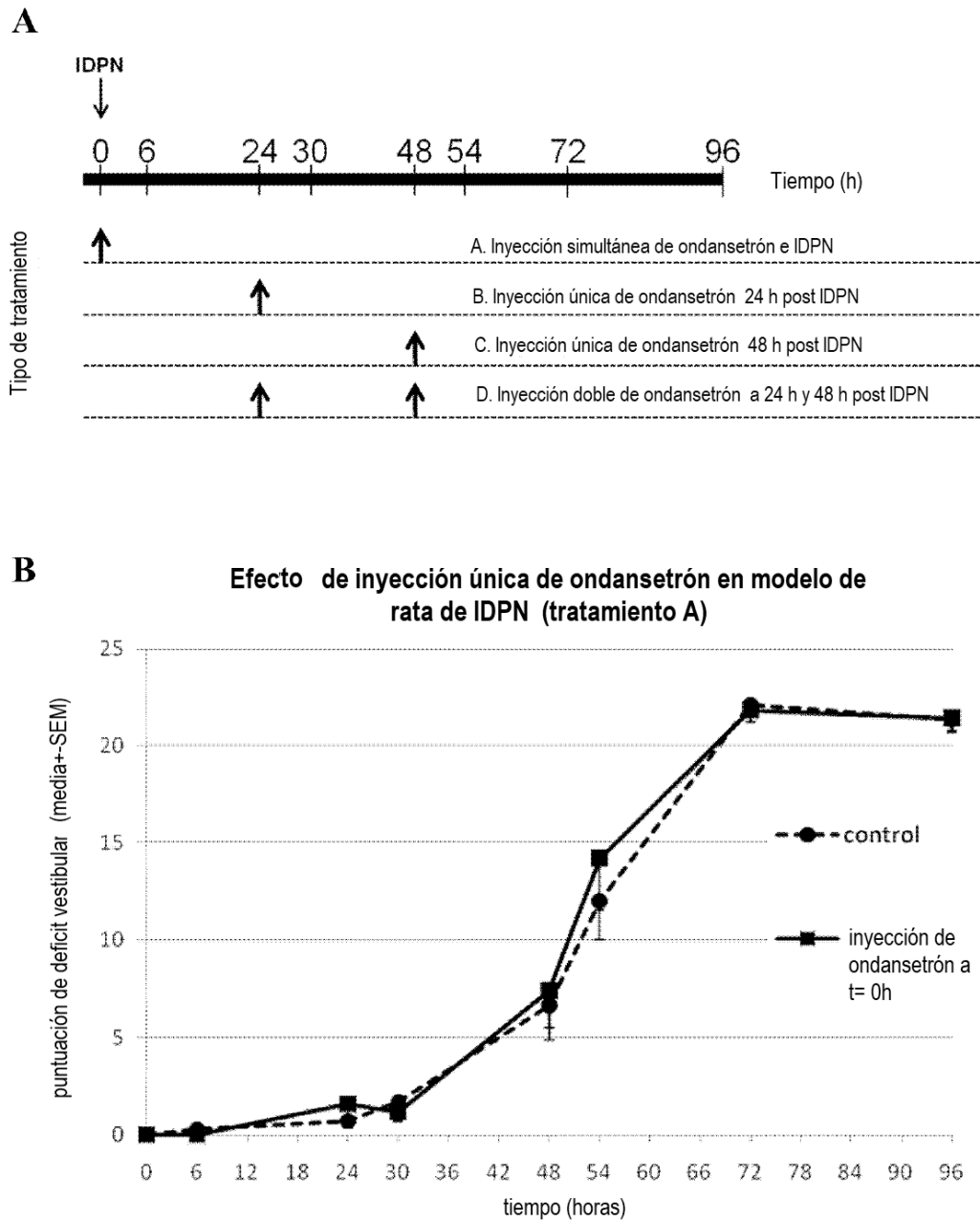
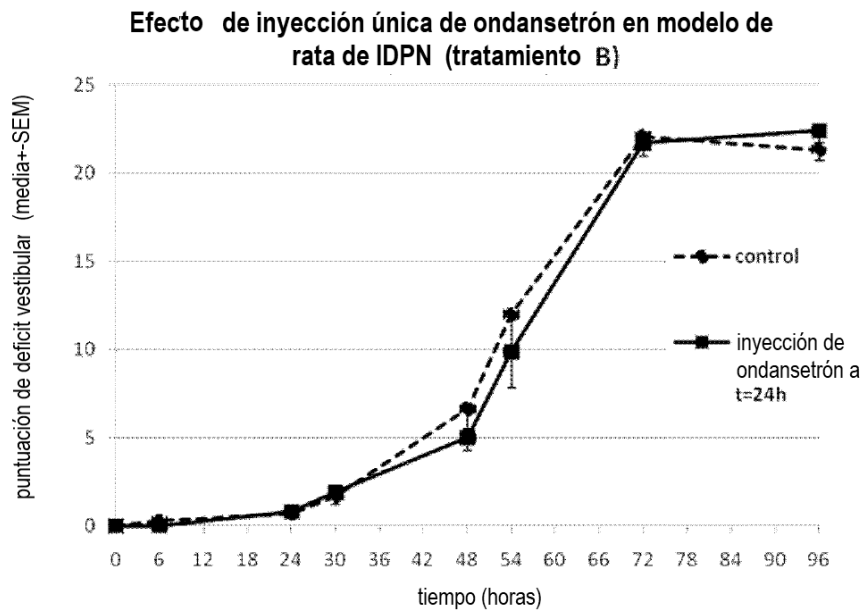


Figura 6

C



D

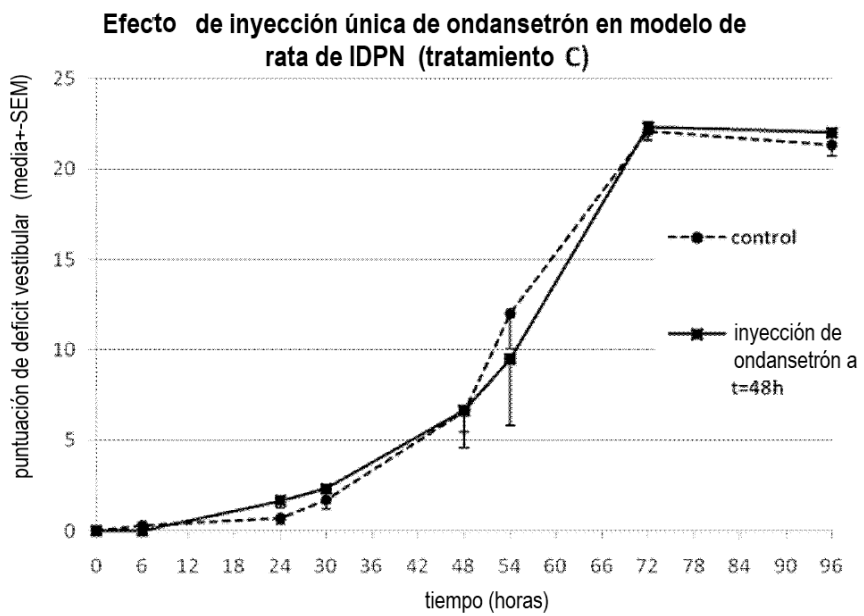


Figura 6

E

Efecto de inyección doble de ondansetrón en modelo de rata de IDPN (tratamiento D)

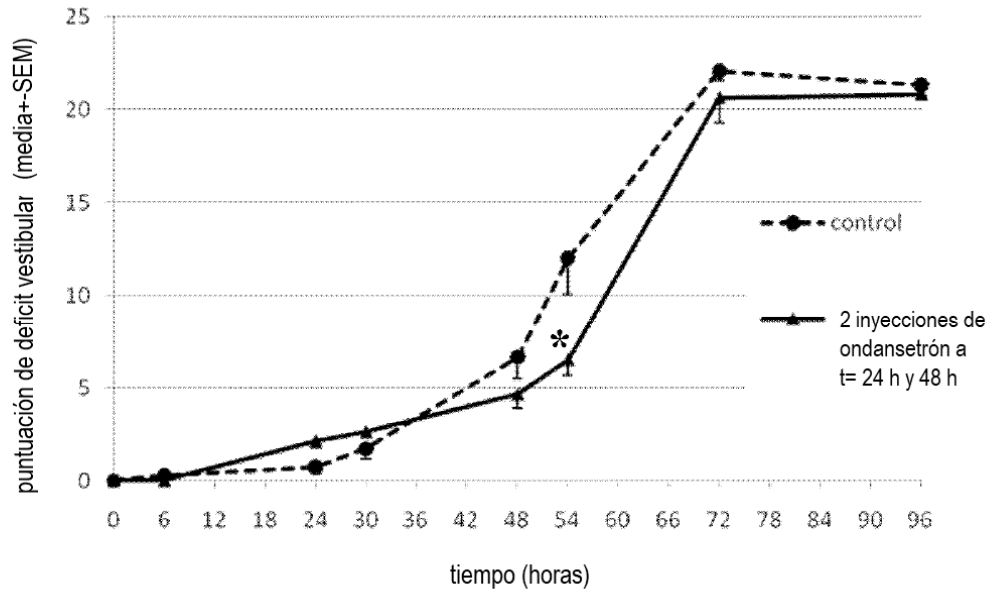


Figura : 6