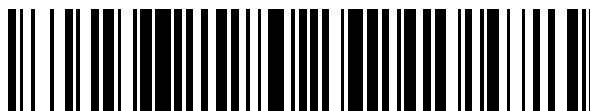


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 785 303**

51 Int. Cl.:

A61K 31/16 (2006.01)

A61P 3/02 (2006.01)

A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.07.2013 PCT/US2013/050511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14014828**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.07.2013 E 13820653 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2872128**

54 Título: **Nicotinamida ribósido para tratar la pérdida auditiva**

30 Prioridad:

16.07.2012 US 201261672169 P

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

06.10.2020

73 Titular/es:

**CORNELL UNIVERSITY (100.0%)
Cornell Center for Technology Enterprise &
Commercialization, 395 Pine Tree Road, Suite 310
Ithaca, NY 14850, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, KEVIN;
SAUVE, ANTHONY y
JAFFREY, SAMIE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 785 303 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

Nicotinamida ribósido para tratar la pérdida auditiva

Antecedentes de la invención

5 La exposición al ruido es una causa importante de pérdida auditiva en todo el mundo. Después de la exposición al ruido, se observan daños a diversas estructuras de la cóclea, incluidas las fibras nerviosas de los ganglios espirales que normalmente forman contactos sinápticos con las células ciliadas de la cóclea. Estas sinapsis permiten que los ganglios espirales transmitan información acústica desde la cóclea a estructuras de orden superior en el tronco encefálico. Después de la exposición al ruido, las células ciliadas liberan neurotransmisores que conducen a daños excitotóxicos en las neuritas, lo que resulta en interrupción sináptica y retracción de las neuritas (Kujawa, S.G. et al., J. Neuroscience, 29, 14077-14085 (2009); Lin, H.W. et al., Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 12, 605-616 (2011); Spoendlin, H., Acta Oto-Laryngologica, 79, 266-275 (1975)). Después de una exposición moderada al ruido y la retracción de las neuritas, se puede ver cierta regeneración de neuritas, que restaura la conectividad sináptica y la capacidad auditiva (Puel, J.L. et al., Neuroreport, 9, 2109-2114 (1998)). Sin embargo, la exposición persistente al ruido o el trauma acústico intenso pueden provocar una degeneración neurítica permanente.

10 Paddock, C., Medical News Today, 19 de junio de 2012, enseña que la nicotinamida ribósido aumenta los niveles de NAD⁺ en las mitocondrias de células cultivadas de mamífero.

Harris, K.C. et al., Hearing Research, 208, 14-25 (2005) divulga un procedimiento para determinar si un compuesto actúa como un agente protector de la audición. El procedimiento comprende administrar un agente a un mamífero, exponer al mamífero al ruido y determinar si el compuesto actúa como un agente protector en las células del mamífero relacionadas con la audición.

20 El documento WO 2007/008548 A2 divulga activadores de sirtuina, que incluyen un compuesto que abarca genéricamente nicotinamida ribósido, y enseña su uso en enfermedades que se beneficiarían de una mayor actividad mitocondrial, incluida la sordera neurosensorial.

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de nuevos procedimientos para prevenir y/o tratar la pérdida auditiva inducida por el ruido.

Breve resumen de la invención

La invención proporciona nicotinamida ribósido para su uso en la prevención, mitigación o tratamiento de la pérdida auditiva en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 1 o 3.

30 La divulgación también proporciona un procedimiento para determinar si un compuesto actúa como agente neuroprotector. El procedimiento comprende (a) proporcionar un mamífero, (b) administrar un agente al mamífero, (c) exponer al mamífero al ruido y (d) determinar el nivel de NAD⁺ en las células del mamífero relacionadas con la audición, determinando así si el compuesto actúa como un agente neuroprotector en base al nivel de NAD⁺ en las células del mamífero relacionadas con la audición.

Breve descripción de varias vistas del dibujo o dibujos

35 Las Figuras 1A-1C representan tinciones representativas de NF-200 de neuritas no tratadas (control), neuritas tratadas con rotenona y neuritas tratadas con rotenona y NAD⁺, respectivamente.

La Figura 2 es una representación gráfica del porcentaje de neuritas en perlas en neuritas no tratadas (control), neuritas tratadas con rotenona y neuritas tratadas con rotenona y NAD⁺.

40 Las Figuras 3A-3C representan cambios de umbral en ratones WldS expuestos al ruido y ratones de tipo salvaje que se midieron usando estallidos de tonos de 8.000 Hz, 16.000 Hz y 32.000 Hz, respectivamente.

Las Figuras 4A-4C representan la pérdida de audición en ratones C57BL6 que eran ratones de control sin tratar o ratones tratados con nicotinamida ribósido antes, después y antes y después de la exposición a estallidos de tonos de 8.000 Hz, 16.000 Hz y 32.000 Hz, respectivamente.

45 La figura 5 es una representación esquemática de la relación espacial de las neuritas de los ganglios espirales con la base de las células ciliadas internas.

La Figura 6 es una comparación gráfica de la distancia entre las neuritas de los ganglios espirales y las células ciliadas internas entre los ratones expuestos al ruido que eran ratones control tratados con vehículo o ratones tratados con nicotinamida ribósido a las 24 horas y 2 semanas después de la exposición.

Descripción detallada de la invención

50 El agente que aumenta el NAD⁺ intracelular es la nicotinamida ribósido.

La pérdida de audición puede ser causada por la exposición al ruido. El agente puede administrarse al mamífero antes, durante y/o después de la exposición al ruido.

5 La pérdida auditiva puede estar asociada con la enfermedad de Meniere. La enfermedad de Meniere es un trastorno del oído interno que puede afectar la audición y el equilibrio en un grado variable. Se caracteriza por episodios de vértigo, tinnitus de tono grave y pérdida de audición. Se ha sugerido que la pérdida auditiva asociada con la enfermedad de Meniere implica daño excitotóxico a las neuronas de los ganglios espirales.

Los implantes auditivos, como los implantes cocleares, intentan preservar la audición nativa mientras colocan un dispositivo implantable en el oído. Esta preservación auditiva puede verse acentuada por aplicaciones del agente que aumentan el NAD+ intracelular.

10 Las condiciones comórbidas con pérdida de audición, que incluyen vértigo (mareos), tinnitus (zumbido en el oído) e hiperacusia (sensibilidad a los ruidos fuertes) también pueden tratarse eficazmente con el agente que aumenta el NAD+ intracelular.

15 En cualquiera de las realizaciones anteriores, el agente aumenta el NAD+ intracelular en una o más células seleccionadas del grupo que consiste en células nerviosas de ganglios espirales, células ciliadas, células de soporte y células de Schwann. En ciertas realizaciones, el agente suprime el daño oxidativo en la célula. En ciertas realizaciones, el agente activa SIRT3. La SIRT3 endógena es una proteína soluble ubicada en la matriz mitocondrial. La sobreexpresión de SIRT3 en células cultivadas aumenta la respiración y disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, se cree que la activación de SIRT3 está implicada en la supresión del daño oxidativo en las células mencionadas anteriormente.

20 En ciertas realizaciones, el tratamiento del mamífero con el agente da como resultado la prevención de la pérdida auditiva. En otras realizaciones, el tratamiento del mamífero con el agente da como resultado la mitigación de la pérdida auditiva.

25 El agente que aumenta el NAD+ intracelular puede administrarse usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, el agente que aumenta el NAD+ intracelular puede administrarse por vía oral, por inyección o por inyección intratimpánica en el espacio del oído medio.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un componente que es suficiente para producir una respuesta terapéutica deseada sin efectos secundarios adversos indebidos (como toxicidad, irritación o respuesta alérgica) proporcional a una proporción beneficio/riesgo razonable cuando se usa de la manera de esta invención. Por ejemplo, una cantidad efectiva del agente que aumenta el NAD+ intracelular puede ser una cantidad efectiva para inhibir, atenuar o revertir los síntomas de pérdida auditiva. La cantidad efectiva específica puede variar con factores como la condición particular que se está tratando, la condición física del paciente, el tipo de mamífero que se está tratando, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si la hay), las formulaciones específicas empleadas y la estructura del agente.

35 Las dosis del agente administrado a un mamífero, particularmente a un humano, de acuerdo con la invención deberían ser suficientes para efectuar la respuesta deseada. Dichas respuestas incluyen la reversión o prevención, total o parcial, de la pérdida auditiva. Una persona experimentada en la técnica reconocerá que la dosificación del agente y el régimen de administración dependerán de una variedad de factores, que incluyen la edad, condición y peso corporal del mamífero, así como el tipo particular de la causa de la pérdida auditiva y el alcance de la pérdida auditiva en el mamífero. El tamaño de las dosis también estará determinado por las rutas, el momento y la frecuencia de administración, así como la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración del agente que aumenta el NAD+ intracelular y el deseado efecto fisiológico. El tratamiento de la pérdida auditiva puede requerir un tratamiento prolongado que implique múltiples administraciones del agente al mamífero.

45 Las dosis de agente y los regímenes de administración adecuados se pueden determinar mediante técnicas convencionales de búsqueda de intervalos conocidas por las personas de experiencia ordinaria en la técnica. En general, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son menores que la dosis óptima del agente que aumenta el NAD+ intracelular. A partir de entonces, la dosificación se incrementa en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. El procedimiento inventivo típicamente implicará la administración de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 300 mg del agente que aumenta el NAD+ intracelular descrito anteriormente por kg de peso corporal del mamífero.

50 El agente que aumenta el NAD+ intracelular puede administrarse al mamífero por sí mismo o en forma de una composición farmacéutica que comprende el agente y un portador farmacéuticamente aceptable.

55 El agente que aumenta el NAD+ intracelular puede administrarse en una composición farmacéutica, es decir, en mezcla con uno o más diluyentes, extendedores, excipientes o portadores farmacéuticos adecuados (denominados colectivamente en la presente memoria como portador farmacéuticamente aceptable) adecuadamente seleccionados con respecto a la forma de administración pretendida y de acuerdo con las prácticas farmacéuticas convencionales. La composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo, en una forma adecuada para

inyección oral, inyección directa o administración intratimpánica. El portador puede ser un sólido o líquido, y el tipo de portador generalmente se elige en función de la ruta de administración contemplada. El agente que aumenta el NAD⁺ intracelular puede coadministrarse junto con el portador farmacéuticamente aceptable en forma de comprimido o cápsula, liposoma, como un polvo aglomerado, o en forma líquida. Los ejemplos de portadores sólidos adecuados incluyen lactosa, sacarosa, gelatina y agar. Las cápsulas o comprimidos se pueden formular fácilmente y se pueden tragar o masticar fácilmente; otras formas sólidas incluyen gránulos y polvos a granel. Los comprimidos pueden contener aglomerantes, lubricantes, diluyentes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes inductores de flujo y agentes de fusión adecuados. Los ejemplos de formas de dosificación líquidas adecuadas incluyen (a) soluciones o suspensiones en agua, grasas y aceites farmacéuticamente aceptables, alcoholes u otros disolventes orgánicos (incluidos ésteres), (b) emulsiones, (c) jarabes, (d) elixires, (e) tinturas, suspensiones, (f) suspensiones reconstituidas a partir de gránulos no efervescentes y preparaciones efervescentes reconstituidas a partir de gránulos efervescentes. Dichas formas de dosificación líquidas pueden contener, por ejemplo, disolventes, conservantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, diluyentes, edulcorantes, espesantes y agentes de fusión adecuados. Las formas de dosificación oral opcionalmente contienen aromatizantes y agentes colorantes. Las formas parenterales e intravenosas también pueden incluir minerales y otros materiales para hacerlos compatibles con la vía de administración contemplada, por ejemplo, en bolo o infusión. Las formas inyectables pueden incluir, por ejemplo, formas intraperitoneales, subcutáneas o intramusculares. En algunas realizaciones, el agente que aumenta el NAD⁺ intracelular puede administrarse en forma de un nutracéutico, es decir, mezclado con alimentos o bebidas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir el agente que aumenta el NAD⁺ intracelular, puede incluir otros compuestos también utilizados para tratar el daño neurítico.

La divulgación también proporciona un procedimiento para determinar si un compuesto actúa como un agente de protección auditiva. El procedimiento comprende (a) proporcionar un mamífero, (b) administrar un agente al mamífero, (c) exponer al mamífero al ruido y (d) determinar el nivel de NAD⁺ en las células del mamífero relacionadas con la audición, determinando así si el compuesto actúa como un agente protector auditivo en base al nivel de NAD⁺ en las células del mamífero relacionadas con la audición.

Puede ser difícil saber si un compuesto será útil como agente de protección auditiva. Como se describe aquí, se ha encontrado que la pérdida auditiva es una vía sensible a sirtuina y NAD⁺ y que la nicotinamida ribósido protege contra y trata la pérdida auditiva, especialmente la pérdida auditiva inducida por el ruido. Por lo tanto, se puede determinar si un compuesto puede prevenir y/o tratar la pérdida auditiva evaluando si el compuesto actúa en las neuronas usando paradigmas de pérdida auditiva inducida por ruido. Si el compuesto puede aumentar el NAD⁺ en las células relacionadas con la audición, entonces esos compuestos exhibirán protección contra y podrán tratar la pérdida auditiva, especialmente la pérdida auditiva inducida por el ruido.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, pero, por supuesto, no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de su alcance.

Las siguientes abreviaturas se usan aquí: HBSS^{-/-}, solución salina equilibrada de Hanks; DMEM, medio águila modificado de Dulbecco; PBS, solución salina tamponada con fosfato; BSA, albúmina de suero bovino; DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol.

La nicotinamida ribósido se sintetizó como se describió previamente en Yang, T. et al., J. Med. Chem 50, 6458-6461 (2007). Otros productos químicos y reactivos se compraron de Sigma, excepto que se indique lo contrario a continuación.

Se compraron ratones C57/BL6J machos y hembras de Laboratorios Jackson. Los ratones WldS^{+/+} fueron un amable regalo del Dr. Michael Coleman (Instituto Babraham, Universidad de Cambridge).

Cultivo de neuronas de ganglios espirales

Se recolectaron neuronas de ganglios espirales disociadas de ratas P5. Brevemente, las crías se decapitaron rápidamente y se diseccionó la cóclea. El modiolos se diseccionó y se digirió (tripsina al 0,1 %, colagenasa al 0,1 %, HBSS^{-/-}) durante 45 minutos a 37 ° C. La trituración secuencial se realizó con pipetas pulidas al fuego para liberar células del tejido, y las células se transfirieron a placas de 24 pocillos recubiertas con laminina/pollisina. Las neuronas se incubaron durante la noche en medios de cultivo (DMEM con alto contenido de glucosa, suplemento de N2, 10 µg/ml de insulina, 25 µg/ml de BDNF, 25 µg/ml de NT3). Para provocar la degeneración de neuritas, los cultivos se incubaron con rotenona (10 µM) durante 2 horas en presencia/ausencia de 10 mM de NAD⁺.

Inmunohistología celular

Los cultivos de neuronas de ganglios espirales se fijaron con paraformaldehído al 4 % y se permeabilizaron con Triton X-100TM/PBS al 0,5 % durante 10 minutos. Después del lavado, las células se bloquearon con suero de burro al 4 % y se incubaron con anti-NF200 de ratón (1:1.000) durante la noche a 4 ° C. Luego se midieron las neuritas en perlas usando un protocolo computarizado imparcial previamente descrito (Sasaki, Y. et al., J. Neuroscience, 29, 5525-5535 (2009)).

Histología Coclear/Inmunohistología

La cóclea de ratón se preparó como se describe en Whitlon, D.S. y et al., Brain Research Protocols, 6, 159-166 (2001). La cóclea de ratón se diseccionó rápidamente del hueso temporal después de una decapitación rápida. Una vez separada, el ápice de la cóclea se fenestró delicadamente, y las cócleas se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % durante la noche a 4 ° C. Luego, las cócleas se lavaron con tres cambios de PBS y se incubaron en una solución de descalcificación (EDTA/PBS al 10 % pH 7,4) bajo rotación constante a 4 ° C durante 1 semana. La solución de descalcificación se cambió diariamente. La cóclea se lavó en 3 cambios de PBS y luego se trató con concentraciones progresivamente crecientes de sacarosa del 10-30 %. La cóclea se incubó durante la noche en sacarosa al 30 % a 4 ° C. La cóclea se incubó 24 horas más en compuesto OCT (Tissue-Tek). Después de la incubación final, la cóclea se transfirió a moldes criogénicos, alineando cuidadosamente el modiolio paralelo al fondo del molde, y se congeló sobre hielo seco. Luego se cortaron muestras de modiolio medio con un grosor de 10 µm y se montaron en portaobjetos de vidrio (VWR SUPERFROST™ Plus). Las secciones se secaron luego durante 2 horas antes de la tinción.

Los portaobjetos se fijaron posteriormente con paraformaldehído al 1,5 % durante 5 minutos. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con Triton X-100/PBS al 0,5 % durante 15 minutos. Los portaobjetos se lavaron nuevamente y luego se bloquearon con BSA/PBS al 2 %. Las secciones fueron incubadas con ALEXA FLUOR™ 488 (faloidina-488) (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante durante 20 minutos. Los portaobjetos se lavaron y luego se incubaron con anticuerpo de neurofilamento antipesado de conejo 1:1.000 durante la noche a 4 ° C. Luego, los portaobjetos se lavaron e incubaron con anticuerpo anticonejo de cabra ALEXA FLUOR™ 546 1:1.000 (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado final, las secciones se montaron con el reactivo antidesvanecimiento ProLong™ Gold con DAPI (Life Technologies). La imagen de epifluorescencia de tres colores se realizó usando un microscopio Nikon Eclipse Ti con una cámara Coolsnap HQ2.

Prueba auditiva

La prueba de respuesta auditiva del tronco encefálico se realizó como se describió anteriormente (Willott, JF, Current Protocols in Neuroscience, 8.21B, B1-B12 (2005)). Los animales se analizaron después de la sedación con ketamina y xilazina (40 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente). Se utilizaron estímulos de estallido de tono a 8, 16 y 32 kHz durante 0,5 msegundos para obtener respuestas evocadas auditivas utilizando un sistema de registro auditivo del tronco encefálico (Intelligent Hearing Systems, Miami, FL). Se determinó una respuesta evocada identificando formas de onda en intervalos de tiempo adecuados que aumentaron en magnitud al aumentar el volumen como lo describió anteriormente Willott.

Exposición al ruido

Los animales fueron expuestos a una banda de octava de 90 dB durante 2 horas en una jaula colocada en una cámara insonorizada (MAC-2, Industrial Acoustics Company, Bronx NY). Los ratones pudieron moverse libremente por la jaula. La banda de octava se generó utilizando el software ToneGen (software NCH, Greenwood Village, CO) enviado a través de un amplificador Audiosource Amp100 que conduce dos altavoces Fostex FT-96H orientados hacia abajo. El nivel de presión sonora se confirmó a los 0, 30, 60 y 90 min, y nuevamente justo antes de completar la exposición al sonido utilizando un micrófono Extech 407736.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra que la neuritis de los ganglios espirales posee la vía de señalización regulada por NAD que previamente se ha demostrado que previene la degeneración axonal.

La degeneración axonal en una variedad de neuronas puede bloquearse mediante el tratamiento con concentraciones milimolares de NAD+ (Avery, M.A., et al., Current Biology, CB 22, 596-600 (2012)). Para determinar si las neuritas de los ganglios espirales también poseían esta vía sensible a NAD, se provocó la degeneración axonal usando rotenona, que es un inhibidor del complejo I mitocondrial que previamente se ha demostrado que induce la degeneración axonal en los axones de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Press, C. et al., J. Neuroscience, 28, 4861-4871 (2008)). El tratamiento de las neuronas de los ganglios espirales de rata P5 DIV3 con 10 µM de rotenona dio como resultado una degeneración de neuritas en tan pronto como 2 horas, medida por la presencia de bulas de neuritas. Este efecto fue bloqueado por el tratamiento simultáneo de neuronas con NAD+ 10 mM. Las manchas representativas de NF-200 de neuritas no tratadas (control), neuritas tratadas con rotenona y neuritas tratadas con rotenona y NAD+ se representan en las Figuras 1A-1C, respectivamente. El porcentaje de neuritas en perlas en neuritas no tratadas (control), neuritas tratadas con rotenona y neuritas tratadas con rotenona y NAD+ se ilustran gráficamente en la Figura 2. Estos datos indican que las neuritas de los ganglios espirales poseen la vía de señalización regulada por NAD+ que se ha mostrado previamente para prevenir la degeneración axonal.

Ejemplo 2

Este ejemplo demuestra que la mejora genética de las vías biosintéticas NAD+ endógenas reduce la pérdida auditiva inducida por el ruido. La degeneración walleriana lenta (WldS) de ratón expresa una repetición por triplicado de una fusión génica de la enzima biosintética NAD Nicotinamida mononucleótido adenilil transferasa 1 y Ube4a (Coleman,

MP, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 95, 9985-9990 (1998)). WldS se expresa altamente en las neuronas, y su expresión retrasa notablemente la degeneración del fragmento axonal distal después de la transacción axonal (Araki, T. et al., Science, 305, 1010-1013 (2004)). La expresión W1dS^{+/+} también mitiga los fenotipos de enfermedades de ratones que son susceptibles a diversas enfermedades neurodegenerativas (Samsam, M., et al., J. Neuroscience, 23, 2833-2839 (2003); Kaneko, S. et al., J. Neuroscience, 26, 9794-9804 (2006); Sajadi, A. et al., Current Biology, CB 14, 326-330 (2004)). WldS actúa en los axones para mantener la biosíntesis axonal de NAD después de lesiones axonales (Wang, J, et al., J. Cell Biol. 170, 349-355 (2005)), lo que generalmente resulta en la pérdida de enzimas biosintéticas endógenas de NAD (Gilley, J. et al., PLoS Biology, 8, e1000300 (2010)). Por lo tanto, el ratón WldS proporciona una prueba genética de si la biosíntesis aumentada de NAD puede usarse para interferir con los procesos de degeneración axonal.

Para probar si la biosíntesis de NAD aumentada protege contra la pérdida auditiva inducida por el ruido, se midieron las respuestas auditivas del tronco encefálico (ABR) provocadas por estímulos de estallido de tono después de medir el trauma acústico. Una ABR ocurre cuando un ratón escucha el estímulo de estallido de tono. En estos experimentos, el trauma acústico fue provocado en ratones por una exposición al ruido de banda de octava de 90 dB durante 120 minutos. Para cuantificar el grado de pérdida auditiva, se midieron los "cambios de umbral". Estos cambios se refieren al nivel aumentado de intensidad del sonido que se requiere para provocar una ABR. El umbral para detectar estímulos sonoros se determina exponiendo a los ratones a ráfagas de tono de 0,5 msegundos a una frecuencia y volumen específicos. La intensidad de sonido mínima que evoca una ABR que muestra una magnitud aumentada con una intensidad de sonido creciente se designa como umbral de sonido para la frecuencia probada (Willott et al.). Los cambios de umbral transitorios (TTS) se refieren a una pérdida auditiva temporal 24 horas después de la exposición al ruido, y los cambios de umbral permanentes (PTS) se refieren a la pérdida de audición que permanece 2 semanas después de la exposición.

A continuación, los cambios de umbral en ratones WldS expuestos al ruido se midieron usando ráfagas de tonos de 8.000 Hz, 16.000 Hz y 32.000 Hz. En ratones de tipo salvaje, el cambio de umbral transitorio a 32.000 Hz fue de 38 dB (Figura 3C). A 16.000 Hz, se observó un cambio de umbral de 21 dB (Figura 3B). Se observó un cambio menor de 10 dB a 8.000 Hz (Fig. 3A). Estos cambios de umbral persistieron a los 14 días. La persistencia de estos cambios de umbral indica que los ratones tienen pérdida auditiva permanente. La pérdida auditiva más prominente a frecuencias más altas después de la exposición al ruido es consistente con hallazgos previos (Wang, Y. et al., Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 3, 248-268 (2002)).

En contraste, los ratones WldS exhibieron una protección pronunciada contra la pérdida auditiva inducida por el ruido. A las 24 horas después del trauma acústico, los ratones no mostraron un cambio de umbral a 8.000 y 16.000 Hz, y un cambio de umbral leve de 10dB a 32.000 Hz (Figuras 3A-3C). A los 14 días, no se observó cambio de umbral en ninguna frecuencia. Tomados en conjunto, estos datos muestran que los animales WldS exhiben una resistencia marcada a las pérdidas de audición transitorias y permanentes después de un trauma acústico.

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra que una ruta farmacológica para aumentar los niveles de NAD⁺ usando nicotinamida ribósido como agente activo da como resultado la protección contra la pérdida auditiva.

La nicotinamida ribósido (NR) es un precursor bien tolerado de NAD⁺. En estos experimentos, se administró NR por inyección intraperitoneal dos veces al día a 1.000 mg/kg, una dosis que aumenta los niveles de NAD en los tejidos en un 50 %, ya sea durante 5 días antes de la exposición al ruido y 14 días después de la exposición al ruido (NR antes + después), 5 días antes de la exposición al ruido (NR antes), o 14 días después de la exposición al ruido (NR después). En comparación con los ratones tratados con vehículo, los ratones tratados con NR mostraron cambios de umbral transitorios insignificantes a las 24 horas a 8.000 Hz y 16.000 Hz (6 y 8 dB respectivamente), y un cambio de umbral reducido a 32.000 Hz (16 dB). La pérdida auditiva a 8.000 Hz, 6.000 Hz y 32.000 Hz se establece en la Tabla y se representa gráficamente en las Figuras 4A-4C, respectivamente. Los ratones se protegieron de manera similar de la pérdida auditiva permanente en las 3 frecuencias. Estos datos indican que el tratamiento NR reduce notablemente la pérdida auditiva inducida por el ruido.

Tabla

Grupo	Frecuencia (kHz)	Línea base			Pre-ruido			24 horas después del ruido			1 semana después del ruido			2 semanas después del ruido		
		8	16	32	8	16	32	8	16	32	8	16	32	8	16	32

(continuación)

		Línea base			Pre-ruido			24 horas después del ruido			1 semana después del ruido			2 semanas después del ruido		
Solo vehículo	Pérdida auditiva promedio	13	23	23	13	23	23	37	60	67	20	43	60	20	37	60
	Desv. est.	6	6	6	6	6	6	6	10	6	10	15	0	10	12	10
NR antes y después	Pérdida auditiva promedio	16	13	19	16	18	28	22	26	44	15	25	40	20	20	20
	Desv. est.	8		11	5	13	8	8	11	9	6	6	8	8	14	8
NR antes	Pérdida auditiva promedio	14	16	21	13	18	17	18	25	38	15	23	23	18	18	23
	Desv. est.	5	8	11	5	8	5	13	10	15	8	10	10	4	4	5
NR después	Pérdida auditiva promedio	14	19	31	14	21	16	23	23	37	17	220	28	18	15	28
	Desv. est.	5	4	17	8	11	5	8	10	8	5	9	10	4	5	12

Ejemplo 4

5 Este ejemplo demuestra el efecto de la nicotinamida ribósido en la retracción de las neuritas de los ganglios espirales de las células ciliadas internas.

10 La pérdida auditiva inducida por el ruido está asociada con la retracción de las neuritas de los ganglios espirales de las células ciliadas internas. Como las pérdidas auditivas más prominentes se observan en la porción del espectro auditivo que contiene las frecuencias audibles más altas, se enfocó en el giro basal de la cóclea donde se detecta esta porción del espectro auditivo. En esta parte de la cóclea, el daño celular inducido por el ruido es mayor. El marcado de inmunofluorescencia de la cóclea puede mostrar fácilmente si las neuritas de los ganglios espirales están formando sus contactos adecuados con la base de las células ciliadas internas. La base de las células ciliadas internas está delimitada por la ubicación del núcleo en estas células, ya que descansa sobre la base de la célula. En animales no expuestos al ruido, se ven neuritas de ganglios espirales adyacentes a la base de las células ciliadas internas. Como se esperaba, en los animales tratados con ruido, las neuritas de los ganglios espirales se retrajeron de las células ciliadas internas en $29,5 \pm 12,9 \mu\text{m}$ 24 horas después de la exposición al ruido. Las neuritas permanecieron retraídas ($23 \pm 3,6 \mu\text{m}$) 14 días después de la exposición al ruido. La retracción persistente indica una pérdida permanente de conectividad sináptica entre las células ciliadas y las neuritas de los ganglios espirales en animales tratados con vehículo después de la exposición al ruido.

20 A continuación, se examinaron las neuritas de los ganglios espirales en animales tratados con NR. La exposición al ruido en animales tratados con NR dio como resultado una retracción mínima de las neuritas después de 24 horas ($4,3 \pm 4,5 \mu\text{m}$) y 14 días ($2,5 \pm 3,5 \mu\text{m}$). La relación de las neuritas de los ganglios espirales con las células ciliadas internas se muestra esquemáticamente en la Figura 5. Las distancias entre las neuritas de los ganglios espirales y las células ciliadas internas después de la exposición al ruido en animales de control y animales tratados con NR se ilustran gráficamente en la Figura 6. En conjunto, estos datos indican que la administración continua de NR antes y después del trauma acústico previene la pérdida auditiva y la retracción de las neuritas después de la exposición al ruido.

25 Todas las referencias, incluidas las publicaciones, las solicitudes de patentes y las patentes citadas en la presente memoria, se incorporan aquí por referencia en la misma medida que si cada referencia se indicara individual y específicamente para ser incorporada por referencia y se estableciera en su totalidad en la presente memoria.

30 El uso de los términos "un/una" y "el/la" y "al menos uno" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) debe interpretarse para cubrir tanto el

5 singular y plural, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso del término "al menos uno" seguido de una lista de uno o más elementos (por ejemplo, "al menos uno de A y B") debe interpretarse como un elemento seleccionado de los elementos enumerados (A o B) o cualquier combinación de dos o más de los elementos enumerados (A y B), a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "incluyendo, pero no limitándose a"), a menos que se indique lo contrario. La recitación de intervalos de valores en la presente memoria tiene el único propósito de servir como un procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo, a menos que se indique lo contrario en la presente memoria, y cada valor por separado se incorpora a la especificación como si se mencionara individualmente en la presente invención. Todos los procedimientos descritos en la presente memoria pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") provisto en la presente memoria, está destinado simplemente a iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicativo de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

10 Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en la presente memoria, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de esas realizaciones preferidas pueden hacerse evidentes para las personas de experiencia ordinaria en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que las personas con experiencia en la técnica empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores tienen la intención de que la invención se practique de otra manera que la descrita específicamente en la presente memoria. Además, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está incluida en la invención a menos que se indique lo contrario en la presente memoria o que el contexto lo contradiga claramente.

25

REIVINDICACIONES

1. Nicotinamida ribósido para su uso en la prevención, mitigación o tratamiento de la pérdida auditiva en un mamífero, en el que la pérdida auditiva se debe a exposición al ruido.
- 5 2. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la nicotinamida ribósido se administra al mamífero antes, durante o después de la exposición al ruido.
3. Nicotinamida ribósido para su uso en la prevención, mitigación o tratamiento de la pérdida auditiva en un mamífero, en el que la pérdida auditiva está asociada con la enfermedad de Meniere.
- 10 4. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la nicotinamida ribósido aumenta el NAD⁺ intracelular en una o más células seleccionadas del grupo que consiste en células nerviosas de los ganglios espirales, células ciliadas internas y externas, células de soporte y células de Schwann.
- 5 6. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la nicotinamida ribósido suprime el daño oxidativo en la célula.
- 15 7. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la nicotinamida ribósido activa SIRT3.
8. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el uso da como resultado la prevención o mitigación de la pérdida auditiva.
- 20 9. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la nicotinamida ribósido es para ser administrada por vía oral, por inyección o por inyección intratimpánica en el espacio del oído medio.
9. Nicotinamida ribósido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el mamífero es un ser humano o un perro.

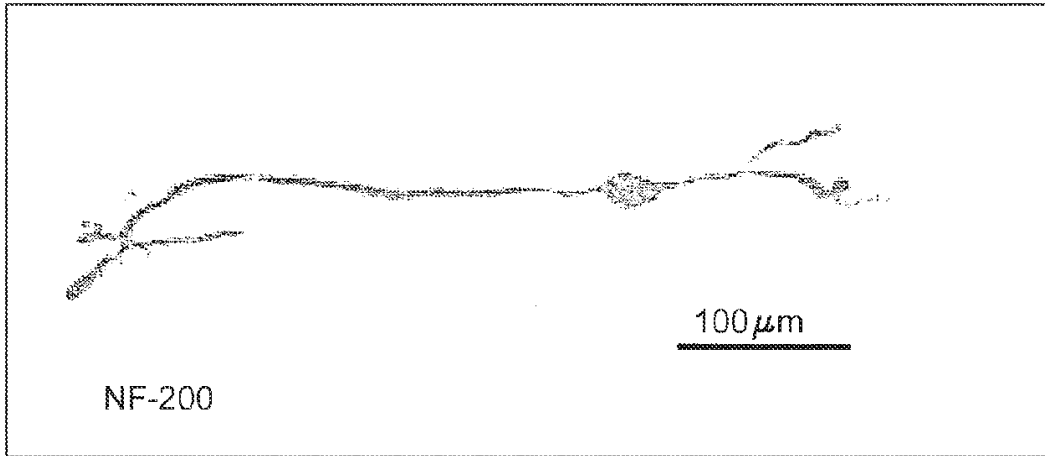


FIG. 1A

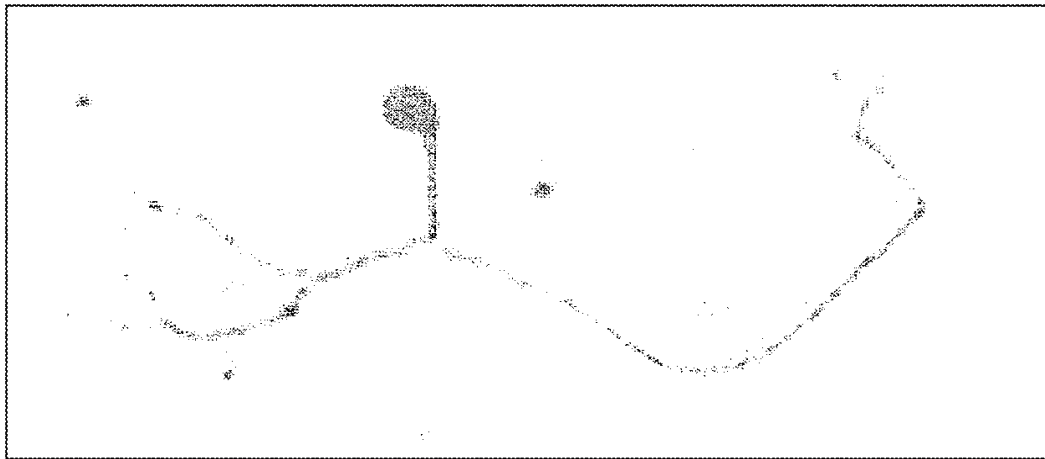


FIG. 1B

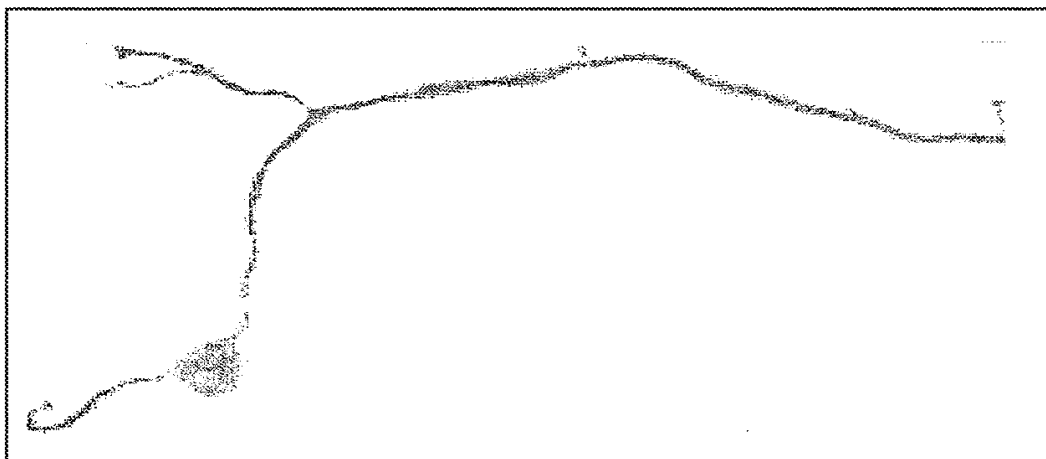


FIG. 1C

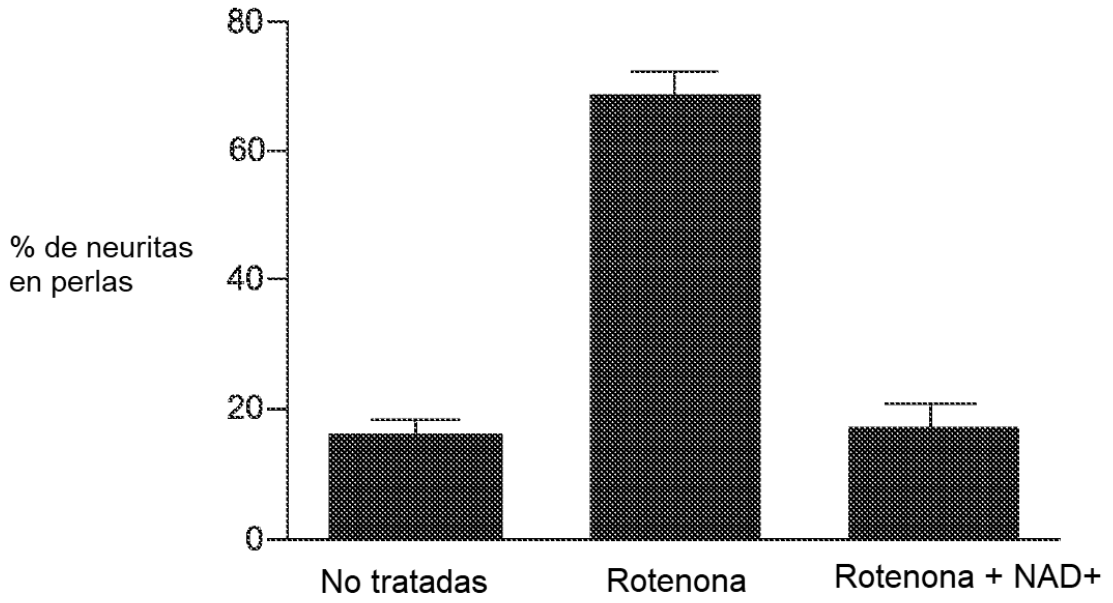


FIG. 2

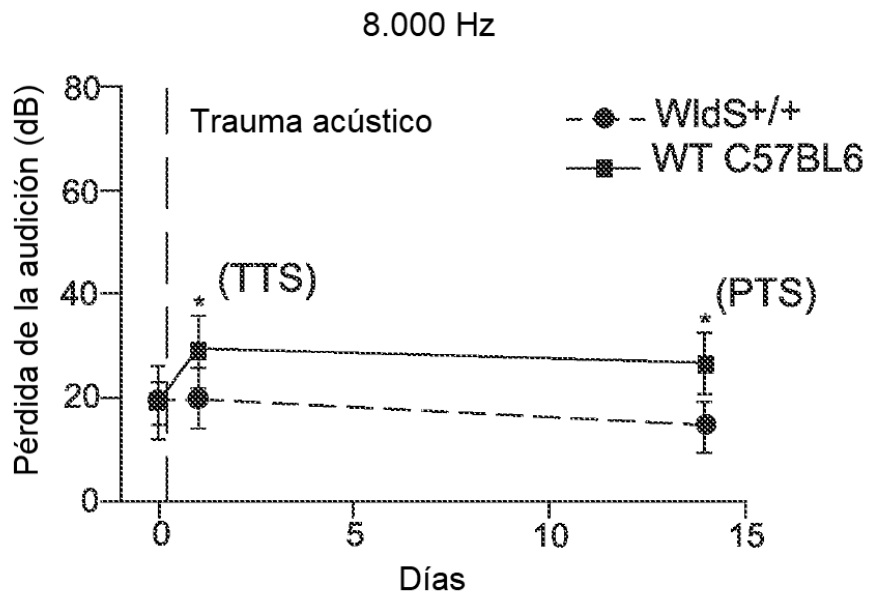


FIG. 3A

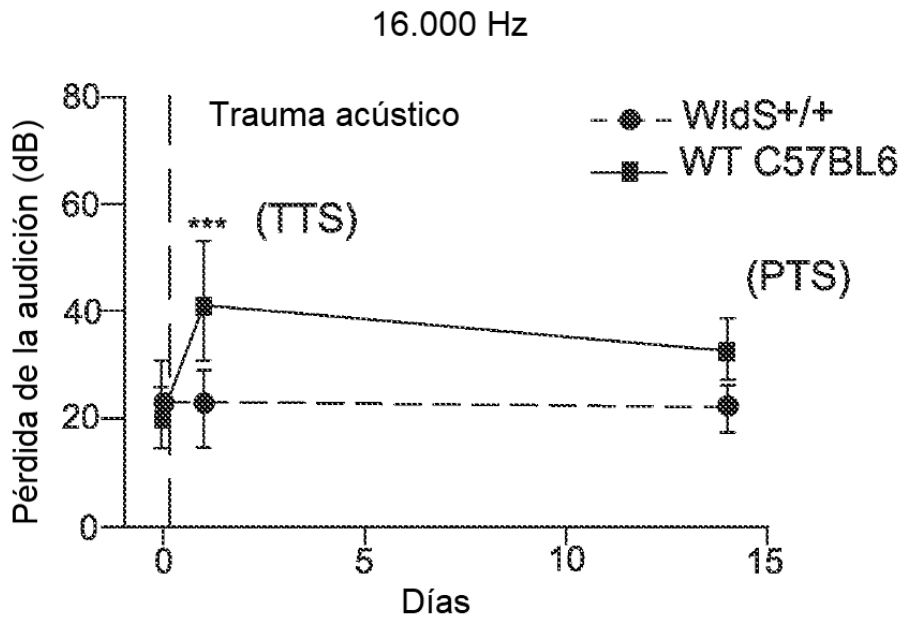


FIG. 3B

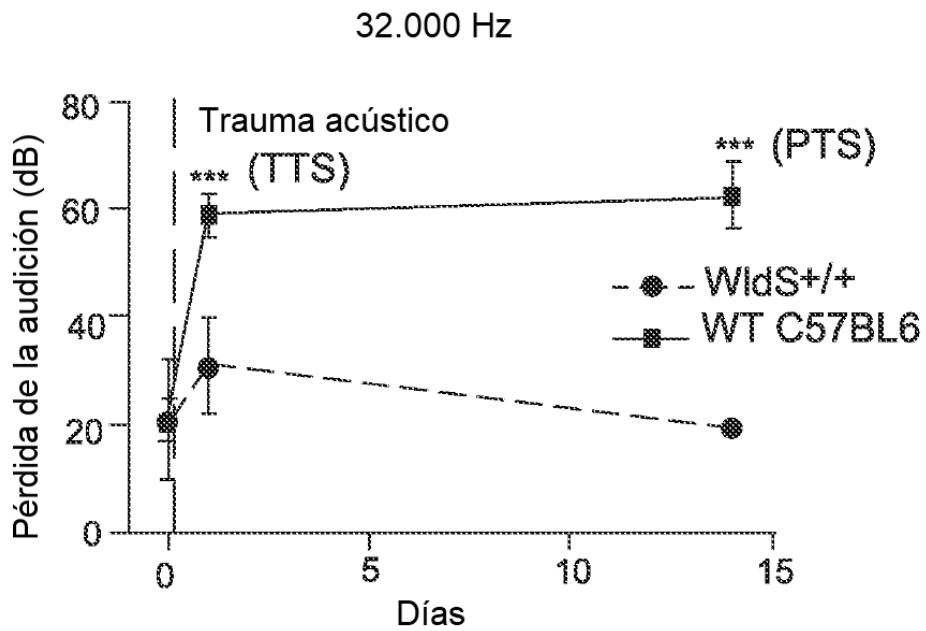


FIG. 3C

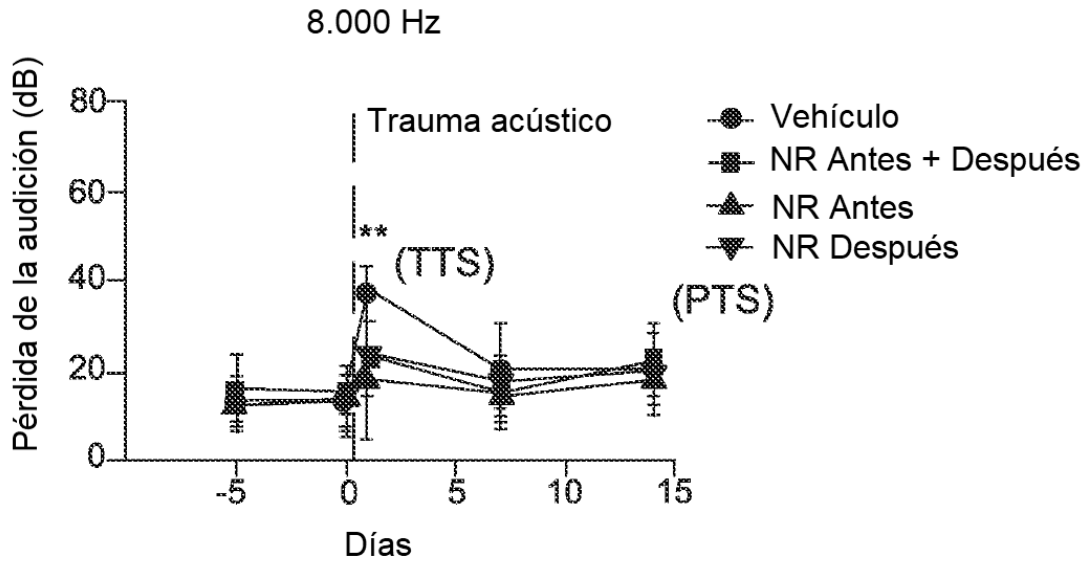


FIG. 4A

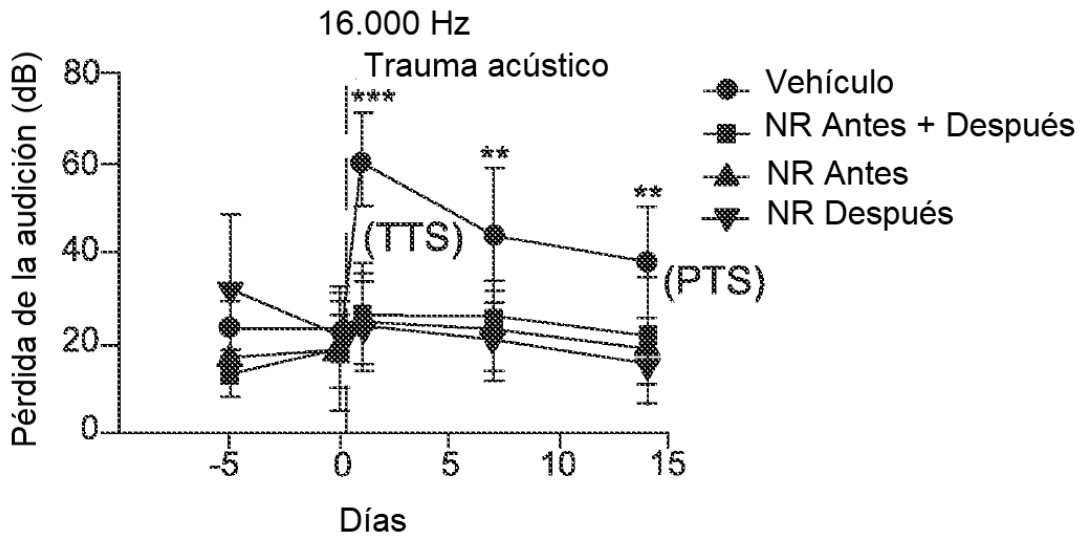


FIG. 4B

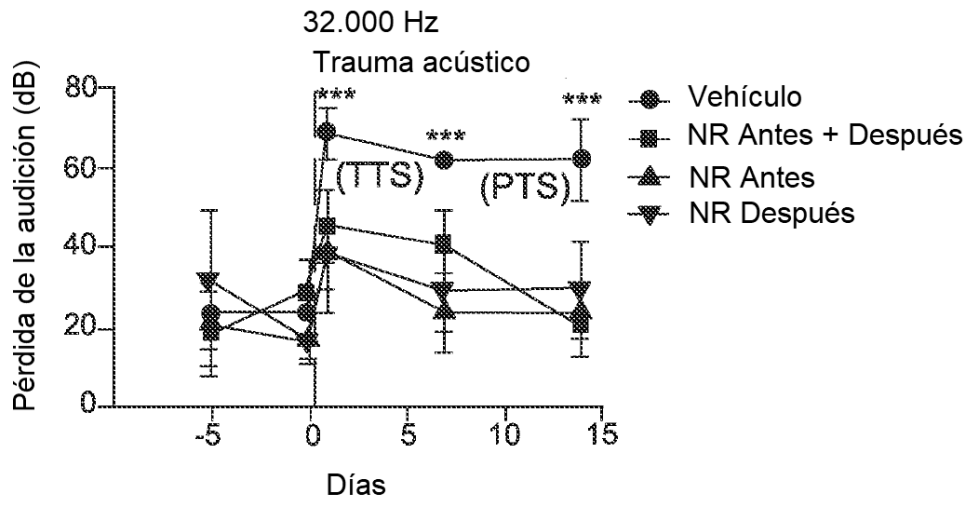


FIG. 4C

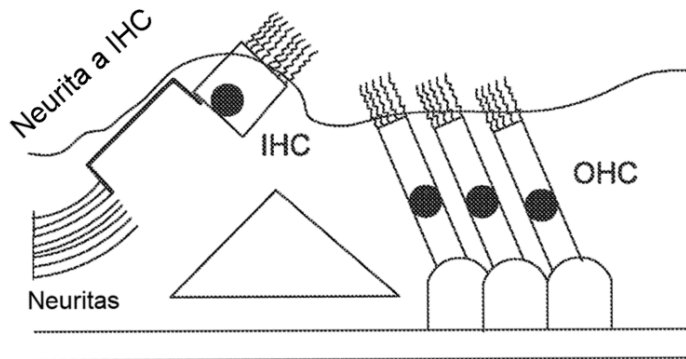


FIG. 5

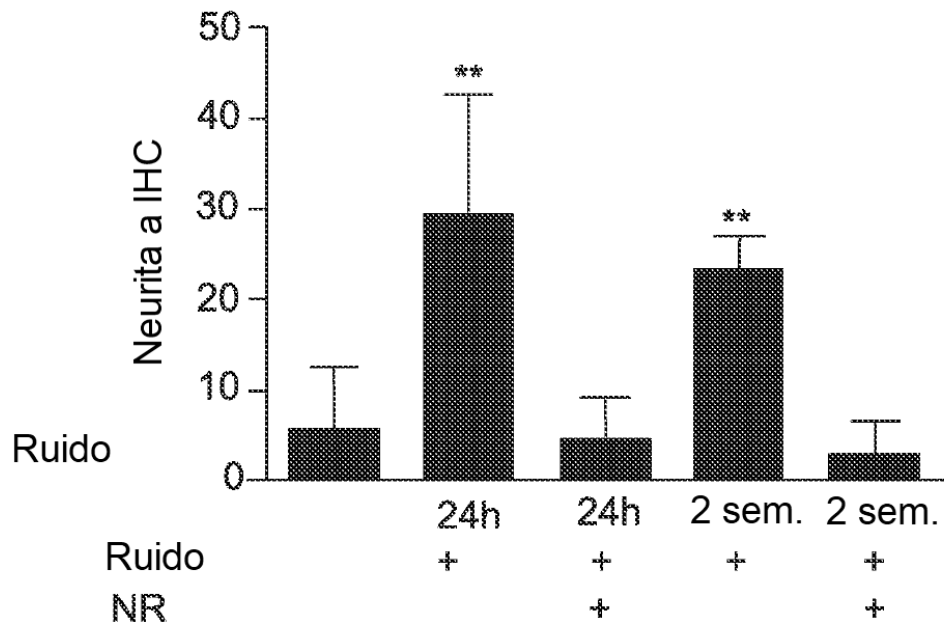


FIG. 6