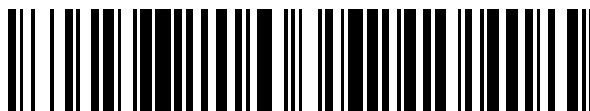


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 673**

51 Int. Cl.:

A61K 31/00 (2006.01)
A61K 31/195 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)
A61K 31/549 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)
A61K 31/64 (2006.01)
A61P 27/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2011** **PCT/EP2011/072480**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013** **WO13087090**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2011** **E 11804529 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.03.2021** **EP 2790686**

54 Título: **Tratamiento del tinnitus mediante la modulación del cotransportador de cloruro NKCC1 en el sistema auditivo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

73 Titular/es:
ZILENTIN AG (100.0%)
c/o Otolanum AGBahnhofstrasse 21
6300 Zug, CH

72 Inventor/es:
KNIPPER, MARLIES y
RUETTIGER, LUKAS

74 Agente/Representante:
BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 862 673 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento del tinnitus mediante la modulación del cotransportador de cloruro NKCC1 en el sistema auditivo

En general, la presente invención se refiere al tratamiento del tinnitus. Más concretamente, la presente invención se refiere a un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 (modulador del cotransportador de cloruro) para su uso en el tratamiento del tinnitus. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden tal modulador del cotransportador de cloruro como un agente activo para su uso en el tratamiento o la prevención del tinnitus mediante la administración de dicho modulador del cotransportador de cloruro.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Uno de cada diez adultos percibe tinnitus, es decir, sonidos sin estimulación acústica externa. Para al menos 1 de cada 100 adultos, el tinnitus afecta incluso seriamente a la capacidad de dormir, relajarse o concentrarse, o provoca cansancio, irritación, nerviosismo, desesperación, frustración o depresión. Dado que, hasta ahora, no hay medicamentos de eficacia probada disponibles, el tratamiento del tinnitus sigue siendo una importante necesidad médica no satisfecha. Aunque se han realizado numerosos intentos de dilucidar la fisiopatología del tinnitus e identificar terapias farmacológicas y otras terapias, hasta ahora ninguno ha proporcionado un tratamiento curativo prometedor (Langguth et al., 2009).

Hasta la fecha, se ha propuesto que el tinnitus es el resultado de cambios en la actividad neuronal en diferentes partes de la vía auditiva (Langguth et al., 2009). Según esta hipótesis, una disminución de la inhibición y/o un aumento de la excitación pueden conducir a un desequilibrio excitador-inhibidor del sistema auditivo. Se sugiere que este desequilibrio causa hiperexcitación neural en la vía auditiva, llevando a la percepción de sonidos fantasma. A este respecto, se ha demostrado experimentalmente que la disfunción coclear, por ejemplo resultante de la sobreexposición al ruido o de fármacos ototóxicos, conduce a una menor salida aferente a las estructuras auditivas centrales, a una menor inhibición en estas estructuras y, como resultado, a un aumento de la tasa de activación espontánea (Eggermont y Roberts, 2004).

En este contexto, se ha sugerido la sub-regulación de la inhibición mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA), un importante neurotransmisor inhibidor de la vía auditiva, como un mecanismo potencial de tal pérdida de inhibición en las estructuras auditivas centrales (Bauer y Brozoski, 2007). En consecuencia, se esperaba que la administración de agentes farmacológicos GABA-érgicos aumentara la inhibición en el sistema auditivo y, por tanto, atenuara la percepción del tinnitus.

Por esta razón, se han ensayado diversos agentes farmacológicos GABA-érgicos como posibles agentes curativos del tinnitus en modelos animales o ensayos clínicos. Más concretamente, se han ensayado ligandos del receptor GABA_A, tales como benzodiazepinas, ligandos del receptor GABA_B, como el baclofeno, inhibidores de la transaminasa GABA, como valproato, o análogos de GABA, como gabapentina, para determinar su eficacia en el tratamiento del tinnitus.

Sin embargo, los estudios con baclofeno (Westerberg et al., 1996) o gabapentina (Piccirillo et al., 2007) no demostraron ningún efecto. La evidencia empírica con valproato es contradictoria, es decir, existen informes de alivio del tinnitus y de inducción del tinnitus (Menkes y Larson, 1998). Otro inhibidor de la transaminasa GABA, la vigabatrina, fue probado por Brozoski et al., 2007, en un modelo animal de tinnitus crónico inducido por trauma por ruido. La correlación conductual del tinnitus se suprimió reversiblemente con el tratamiento con vigabatrina, lo que los autores explicaron por su efecto sobre la vía auditiva central. Los ensayos clínicos con varias benzodiazepinas no fueron concluyentes (Dobie 2004, Langguth et al., 2009). Existe un estudio que afirma el control exitoso del tinnitus mediante la administración combinada de clonazepam y gabapentina; sin embargo, no se ha realizado un diseño aleatorizado ni controlado (Shulman et al., 2002).

Siguiendo una lógica similar a la hipótesis basada en GABA, la inhibición mediada por otro neurotransmisor inhibidor principal, la glicina, también se ha sugerido como objetivo para el tratamiento del tinnitus. A este respecto, la WO 2009/080268 describe la presencia de receptores de glicina en la cóclea y alude a la administración local de agonistas de glicina para el tratamiento del tinnitus. Sin embargo, no se han proporcionado datos que documenten el éxito de tal enfoque. Dado que, sin embargo, la glicina es un coagonista junto con el glutamato para los receptores NMDA, también podría tener un efecto excitador opuesto.

De lo anterior, es obvio que la evidencia clínica para el tratamiento eficaz del tinnitus con agentes farmacológicos GABA-érgicos y/o glicinérgicos, así como su mecanismo de acción sugerido, es bastante confuso y puede depender de diversos factores aún no conocidos.

Así, con el fin de proporcionar compuestos nuevos y eficaces para el tratamiento del tinnitus, existe la necesidad en la técnica de comprender mejor el mecanismo subyacente al desequilibrio excitador-inhibidor mencionado anteriormente del sistema auditivo.

Para el sistema nervioso central, que se comprende mucho mejor que el sistema auditivo, se sabe que la fuerza y polaridad de las corrientes sinápticas mediadas por el receptor GABA_A y el receptor de glicina pueden controlarse modificando el gradiente de concentración transmembrana de aquellos iones a los que estos receptores son permeables (en particular cloruro y bicarbonato). Por ejemplo, la concentración de cloruro en las neuronas del sistema nervioso central suele ser muy baja. Así, se sugiere que pequeños cambios en la concentración de cloruro tienen un gran impacto en el gradiente transmembrana, lo que puede afectar significativamente a la forma en que las corrientes iónicas a través de los canales del receptor GABA_A o de glicina modifican el potencial de membrana en el sistema nervioso central (De Koninck, 2007).

Además, es conocido que la homeostasis del cloruro en las células del sistema nervioso central es mantenida, entre otros elementos moleculares, por cotransportadores catión-cloruro (CCC) e intercambiadores Cl⁻-HCO₃⁻ (De Koninck, 2007). La familia CCC en los mamíferos consta de nueve miembros codificados por los genes Slc12a1-9 (Blaesse et al., 2009). En términos de su función, los CCC se dividen en tres categorías: cotransportadores Na-K-2Cl (NKCC; isoformas NKCC1 y NKCC2), cotransportador Na-Cl (NCC) y cotransportadores K-Cl (KCC; isoformas KCC1-4). Los dos CCC dominantes relevantes para las neuronas del sistema nervioso central son: NKCC1, que normalmente media la absorción de cloruro, mientras que KCC2 normalmente extruye cloruro (De Koninck, 2007). En última instancia, ambos cotransportadores dependen de gradientes establecidos por la Na-K-ATPasa, utilizando gradientes de K⁺ y Na⁺ respectivamente, para extruir o importar iones Cl⁻ (Payne et al., 2003).

NKCC1 está ampliamente distribuido por todo el cuerpo. NKCC1 transporta sodio, potasio y cloruro a la célula. NKCC1 también se encuentra en todo el sistema nervioso, donde es expresado en astrocitos, oligodendrocitos y células de Schwann (Lenart et al., 2004). La otra isoforma, NKCC2, se encuentra principalmente en el riñón, donde sirve para extraer sodio, potasio y cloruro de la orina (Haas, 1994). La regulación del transporte de Cl⁻ dentro y fuera de las células juega un papel crítico en el mantenimiento del volumen intracelular y la excitabilidad de las neuronas sensibles a GABA reguladas por al menos dos cotransportadores de iones: el flujo de Cl⁻ está mediado por NKCC1 que media el flujo de entrada de Cl⁻ y KCC1 o KCC2 que media la salida de Cl⁻ (Kahle et al., 2005). El mantenimiento de la homeostasis de los electrolitos intra y extracelulares es necesario para una amplia gama de procesos fisiológicos esenciales, incluyendo funciones generales (por ejemplo el mantenimiento del volumen celular adecuado), funciones celulares especializadas (por ejemplo el control de la excitabilidad neuronal) y funciones globales (por ejemplo la regulación de la presión arterial). Esta homeostasis se consigue mediante el movimiento regulado de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ a través de las membranas celulares mediante canales iónicos, cotransportadores, intercambiadores y bombas que ejecutan el flujo de electrolitos transmembrana (Kahle et al., 2005). El mecanismo predominante por el cual se mantiene el volumen intracelular en las células en respuesta a cambios de la tonicidad extracelular es el aumento o la disminución de la concentración de Cl⁻ intracelular, minimizando así el flujo de agua transmembrana. La concentración intracelular de Cl⁻ se modula alterando el equilibrio entre la entrada y la salida de Cl⁻. El principal mediador de la entrada de Cl⁻ es NKCC1 y la salida de Cl⁻ está mediada en gran medida por KCC1. Ambos cotransportadores están regulados por la tonicidad extracelular: la hipertonicidad activa NKCC1 e inhibe KCC1, mientras que la hipotonicidad tiene el efecto contrario (Kahle et al., 2005).

Como se indicó anteriormente, la concentración intracelular de Cl⁻ en las neuronas del sistema nervioso central se mantiene baja en condiciones normales y el potencial inverso Cl⁻ (E_{Cl}) en las neuronas alrededor de o por debajo del potencial de reposo. Siempre que GABA o glicina se la puerta a GABA_A o los canales de glicina, respectivamente, generalmente se provoca una inhibición tanto mediante una hiperpolarización del influjo de cloruro como mediante la inhibición de derivación, dependiendo de si el E_{Cl} es más negativo o similar al potencial de reposo (Payne et al., 2003). Sin embargo, si la alteración de la homeostasis del Cl⁻ provoca un aumento de los niveles de Cl⁻ intracelular, E_{Cl} puede volverse menos negativo que el potencial de reposo. En este caso, la apertura de los canales de GABA_A o de glicina da como resultado poca o ninguna inhibición y, en casos extremos, un flujo de salida de Cl⁻ de la célula, con un efecto despolarizante y excitador neto.

En este contexto, se ha demostrado que la activación de trkB inducida por BDNF sub-regula la expresión de KCC2 en cortes del hipocampo cerebral, lo que resulta en una supresión de la inhibición GABA-érgica rápida dependiente del cloruro (Rivera et al., 2002). Se han hecho observaciones similares en el asta dorsal de la médula espinal (Coull et al., 2005). Más concretamente, se ha demostrado que, en condiciones patológicas, la secreción de BDNF conduce a una sub-regulación de la expresión de KCC2, lo que disminuye la capacidad de salida del cloruro de las células del sistema nervioso central. Así, se acumula Cl⁻ dentro de la célula y cambia el E_{Cl}, lo que resulta en una disminución de la inhibición en las células del sistema nervioso central (Rivera et al 2002, De Koninck, 2007). Parece que el flujo de aniones se invierte en tal situación y tanto el GABA como la glicina se despolarizan, aumentando sustancialmente la excitabilidad de las células. Además, también se sabe que la sobre-regulación de NKCC1 actúa sinérgicamente con la sub-regulación de KCC2 (De Koninck, 2007). Recientemente en una publicación de Lee et al. (2011) se ha especulado que la función de KCC2 puede depender de la fosforilación de Ser940, ya que se observó una pérdida de su función (por ejemplo debido a niveles elevados de glutamato) cuando la desfosforilación de Ser940 estaba mediada por la proteína fosfatasa 1. En consecuencia, el mecanismo subyacente a la sub-regulación de KCC2 puede basarse en el estado de fosforilación de Ser940.

Recientemente se ha demostrado que, en condiciones fisiológicas, los canales del receptor GABA_A y también los receptores de glicina median las corrientes sustanciales transportadas no solo por Cl⁻, sino también por HCO₃⁻ (Asiedu et al., 2010). Así, una menor capacidad de salida de Cl⁻ favorecerá la despolarización del canal de HCO₃⁻ mediado por el flujo, especialmente en las neuronas del sistema nervioso central con anhidrasa carbónica citoplásmica. Dado que esta enzima es capaz de reponer rápidamente el HCO₃⁻ intracelular durante el eflujo neto mediado por el canal, la despolarización dependiente de HCO₃⁻ puede volver a ser lo suficientemente grande como para producir una excitación GABA-érgica o glicinérgica durante la actividad de la red neuronal en curso. Por tanto, se sugiere que la inhibición de la hidrasa carbónica reduce las corrientes GABA-érgicas y/o glicinérgicas excitadoras mediadas por HCO₃⁻.

Todos los hallazgos mencionados anteriormente son válidos para las células neuronales del sistema nervioso central. Sin embargo, es bien sabido que las células neuronales del sistema nervioso central, que se desarrollan a partir de células de la creta neural, son diferentes en su evolución, estructura y comportamiento a las células neuronales que se desarrollan a partir de placodas, como en el sistema auditivo. Por ejemplo, las neuronas del hipocampo son células multipolares con un solo axón y múltiples dendritas, mientras que las neuronas de la cóclea son bipolares, es decir, poseen un solo axón y una sola dendrita. Además, las neuronas del SNC reciben una entrada inhibitoria directamente de las interneuronas GABA-glicinérgicas, mientras que las neuronas auditivas en la periferia la reciben indirectamente a través de una red sináptica (complejo olivar superior) en el tallo cerebral que retroalimenta a las neuronas periféricas aferentes mediante terminales axodendríticas. Así, los hallazgos mencionados para el sistema nervioso central no se pueden extrapolar en absoluto al sistema auditivo. En el sistema auditivo, los mecanismos están mucho menos estudiados.

Por tanto, no se puede suponer que los hallazgos antes mencionados para el sistema nervioso central sean la base de ningún desequilibrio excitador-inhibidor del sistema auditivo. De hecho, cualquier desequilibrio excitador-inhibidor en la cóclea puede deberse a una alteración en el lado excitador y/o inhibidor del equilibrio. Además, podrían deberse a una miríada de mecanismos, incluyendo alteraciones de la expresión del canal excitador y/o inhibidor, conductancia del canal, fuerza sináptica y conectividad, o a la interrupción de cualquiera de los gradientes iónicos que dictan el potencial de membrana en reposo, la resistencia de la membrana o el potencial inverso de iones clave.

Para el sistema auditivo, simplemente se sabe que el factor neurotrófico BDNF pro-supervivencia y pro-regenerativo es un agente otoprotector necesario para el desarrollo auditivo normal y para la supervivencia de las neuronas adultas (Meltser et al., 2010). Más allá de esto, Tan et al., 2007, han informado de una elevación significativa de la expresión de BDNF en las neuronas del ganglio espiral de ratas expuestas a un trauma acústico que induce tinnitus. Esto se acompaña de una expresión aumentada de BDNF y GABA en el colículo inferior. Sin embargo, implica una reducción significativa de la expresión de BDNF en la corteza auditiva.

Por el contrario, la EP 1843757 B1 describe que la expresión del factor de crecimiento nervioso derivado del cerebro "BDNF" aumenta durante el tinnitus agudo, es decir, el tinnitus que se produce durante menos de tres meses. Además, la EP 1843757 B1 describe que la administración de agonistas del receptor GABA resulta en una expresión de BDNF significativamente reducida en las neuronas cocleares y menores síntomas de tinnitus agudo. Sin embargo, dado que el efecto del BDNF (es decir, en la cascada de transducción de señales de BDNF) está mediado por receptores específicos, como el receptor de BDNF trkB, se ha sugerido que los agonistas del receptor GABA interactúan con la cascada de transducción de señales de BDNF aguas arriba de trkB.

Además, se ha identificado la expresión de KCC2, KCC3 y KCC4 en la cóclea (Yang et al., 2008), en el núcleo coclear (Vale et al., 2005) y en el olivo superior lateral (Balakrishnan et al., 2003). En estudios animales, la alteración de KCC3 y KCC4 coclear causó sordera. En este contexto, se ha planteado la hipótesis de que dicha degeneración, entre otros factores, es resultado de una alteración del reciclaje de potasio coclear, esencial para mantener el potencial endococlear. También se ha sugerido que KCC2 puede ser un interruptor que controla la despolarización o hiperpolarización de las neuronas del ganglio espiral y puede desempeñar un papel importante en el funcionamiento de GABA (Yang et al., 2008). NKCC1 también se ha localizado en cócleas de animales y se ha demostrado que este cotransportador desempeña un papel fundamental en el transporte transepitelial de K⁺ y en el mantenimiento del potencial endococlear: ratones que carecían de NKCC1 eran profundamente sordos (Flagella et al., 1999).

Las anhidrasas carbónicas también se han localizado en células ciliadas cocleares, así como en células ganglionares espirales (Okamura et al., 1996) y se ha informado que se encuentran al menos en neuronas del tronco cerebral auditivo de ratas en desarrollo (Backus et al., 1998). En este contexto, la WO 2007/012064 de Anderson et al. describe el uso del inhibidor de anhidrasa carbónica y diurético zonisamida, solo o en combinación con otros compuestos, para el tratamiento de trastornos auditivos, incluido el tinnitus. La administración de zonisamida se considera como un tratamiento, ya que complementa la farmacología de un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-epinefrina al: 1) potenciar la transmisión de serotonina y dopamina y 2) bloquear los canales de sodio y calcio.

La WO 03/100075 describe el uso de sustancias que alteran la función de los canales CIC-K/barttina para tratar enfermedades del oído interno, incluyendo tinnitus. Los canales de CIC-K-barttina son activados por el voltaje y se ha

informado que desempeñan un papel importante en la secreción de potasio desde las células marginales estriales hacia la endolinfa, contribuyendo así al mantenimiento del potencial endolinfático (Lang et al., 2008). Sin embargo, el mecanismo por el cual se espera que las sustancias descritas tengan un efecto sobre el tinnitus no se describe en el documento.

- 5 Además, es conocido el uso de diuréticos de bucle o inhibidores de la anhidrasa carbónica para el tratamiento de la hidropesía endolinfática o enfermedad de Meniere, respectivamente. Ambos reducen el volumen celular y se supone que alivian la presión del líquido del oído. Por ejemplo, la US 2003/229333 describe un dispositivo de administración de fármacos de liberación sostenida para administrar medicamentos al oído interno, tales como agentes diuréticos, que incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de tiazida, triamtereno e inhibidores de la anhidrasa carbónica.
- 10 El objetivo es disminuir el volumen de líquido del oído interno mediante diuresis. Dado que los diuréticos reducen el potencial endococlear, se ha planteado la hipótesis de que también atenúan la activación del nervio auditivo y, por tanto, también podrían tratar el tinnitus (Risey et al., 1995). Se ha demostrado que el diurético de bucle furosemida suprime el tinnitus, aunque sólo de forma reversible y no en todos los pacientes, y sus efectos se informaron sólo para tinnitus de origen coclear, en lugar de central (Risey et al., 1995). Sin embargo, al mismo tiempo, se sabe que la furosemida administrada en dosis altas induce tinnitus temporal y pérdida de audición, ocasionalmente también de forma irreversible. Dado que la furosemida influye o inhibe numerosos sistemas enzimáticos o transportadores de intercambio de $K^+ - Cl^-$, el cotransporte de $Na^+ - K^+ - Cl^-$, el intercambio de anhidrasa carbónica, el intercambio Cl^-/HCO_3^- e incluso algunos receptores $GABA_A$, es difícil identificar sus locus de acción (Saley, 2002) y su efecto específico sobre el tinnitus. El efecto principal de la furosemida será la inhibición de la exportación de Cl^- si las células están cargadas con cloruro, pero si las neuronas no presentan Cl^- , el efecto principal será la inhibición de la captación de Cl^- (idem). También se han informado acúfenos y disfunción auditiva como efectos secundarios del inhibidor de la anhidrasa carbónica acetazolamida.

- La WO 2010/085352 describe el uso de análogos de bumetanida, furosemida, piretanida, azosemida y torsemida para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones que involucran al receptor $GABA_A$, incluido el tinnitus. En referencia a Brozoski et al., 2007, y al hecho conocido de que la interrupción de NKCC1 resulta en sordera, los inventores concluyen que las terapias dirigidas al sistema $GABA$ -érgico y/o NKCC1 pueden ser útiles en el tratamiento del tinnitus. Se han descrito compuestos que antagonizan NKCC1 y/o $GABA_A$. En particular, la WO 2010/085352 describe antagonistas específicos para variantes $\alpha 4$ de $GABA_A$ que conducen a una mayor liberación de GABA y un aumento posterior de la señalización inhibitoria para restablecer el equilibrio entre la excitación y la inhibición en el sistema nervioso central. En realizaciones preferentes, compuestos tales como la bumetanida, que como tal tienen efectos diuréticos, se vuelven no diuréticos mediante métodos de química médica para evitar que actúen sobre NKCC1. Con respecto a NKCC1, los inventores de la WO 2010/085352 están así divulgando enfoques contradictorios. En referencia a Brozoski et al., 2007, los inventores de la WO 2010/085352 buscan tratar el tinnitus crónico en la vía auditiva central, pero no el tinnitus agudo o subagudo, y no en la cóclea. No se proporcionan datos experimentales que demuestren la eficacia de sus compuestos en el tratamiento del tinnitus.

- La US 4.954.486 se refiere al tratamiento del tinnitus con furosemida. La GB 1.074.927 describe una formulación de diuréticos en general, tal como ácido etacrínico, acetazolamida y diclorofenamida para su uso en la mejora de la diuresis. La EP 1 438 942 A1 se refiere a la administración local de agentes farmacéuticamente activos suministrados mediante un dispositivo de suministro de un medicamento otorrinológico para la administración local de, por ejemplo, furosemida, ácido etacrínico y bumetanida para el tratamiento del tinnitus.

En resumen, resulta obvio del resumen de la técnica anterior que los mecanismos del sistema auditivo en general y de los mecanismos que conducen al tinnitus, en particular, son extremadamente complejos e involucran una multitud de preguntas y observaciones sin respuesta, no bien comprendidos.

- Así, sería un gran avance proporcionar una mejor comprensión del mecanismo preciso que subyace al desequilibrio excitador-inhibidor del sistema auditivo mencionado anteriormente. Esto conduciría a compuestos novedosos y eficaces que se necesitan urgentemente para el tratamiento del tinnitus.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

- Un objeto de la presente invención era proporcionar nuevos compuestos adecuados para interferir en el desequilibrio excitador-inhibidor y, por tanto, adecuados para su uso en el tratamiento específico y dirigido del tinnitus. Además, era un objeto de la presente invención proporcionar nuevas composiciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento del tinnitus.

El objeto de la presente invención se resuelve mediante un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 para su uso en el tratamiento del tinnitus, donde el compuesto se administra sistémicamente mediante una

forma de dosificación oral. El objeto se resuelve mediante la modulación de NKCC1 a través de antagonistas de NKCC1 tal como se definen en la reivindicación 1. Más particularmente, el objetivo se resuelve mediante antagonistas de NKCC1 donde dicho antagonismo de NKCC1 resulta en una sobre-regulación de la actividad y/o expresión de KCC2.

- 5 El objeto de la presente invención también se resuelve mediante una composición farmacéutica que comprende, como un agente activo, un compuesto modulador del cotransportador de cloruro NKCC1 según la reivindicación 1 para el tratamiento o la prevención del tinnitus. La composición se administra sistémicamente mediante una forma de dosificación oral.

- 10 La presente descripción también se refiere a un método de cribado para la identificación y caracterización de compuestos capaces de modular el transportador de cloruro NKCC1.

Como resultado de los experimentos llevados a cabo para la presente invención, se encontró que un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 según la reivindicación 1 es adecuado para el tratamiento o la prevención del tinnitus.

- 15 En particular, se encontró que existe una correlación entre las alteraciones de la homeostasis del cloruro en el sistema auditivo y la percepción del tinnitus. Más concretamente, se ha demostrado experimentalmente que una expresión/actividad alterada patológicamente de KCC2 está correlacionada con una neurotransmisión auditiva aberrante percibida como tinnitus. A este respecto, los inventores de la presente invención encontraron que el daño al sistema auditivo, por ejemplo por trauma acústico, conduce a una sub-regulación significativa del cotransportador de cloruro KCC2 en el sistema auditivo, tal como en las células ciliadas internas y en las neuronas de los ganglios
20 espirales (Ejemplo 1), que es específico de la presencia de tinnitus (Ejemplo 2).

Más allá de esto, se ha demostrado que el uso de compuestos que modulan los niveles de cloruro intracelular mediante la modulación del cotransportador de cloruro NKCC1 es eficaz en la supresión del tinnitus (Ejemplo 3) y aumenta la actividad y/o la expresión de KCC2.

- 25 Así, se ha demostrado experimentalmente que el tinnitus resulta de la alteración de la homeostasis del cloruro por alteración de la expresión del cotransportador de cloruro KCC2 en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo. A partir de aquí, se concluye que la sub-regulación de KCC2 no conduce a la pérdida de audición, sino más bien al tinnitus. Además, se ha demostrado que el antagonismo de NKCC1 interfiere con ese mecanismo fisiopatológico. Por consiguiente, los compuestos que actúan como antagonistas de NKCC1 pueden así emplearse para el tratamiento o la prevención del tinnitus agudo o crónico. El antagonismo de NKCC1 puede disminuir la expresión y/o la actividad del
30 cotransportador de cloruro NKCC1, preferiblemente en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas ganglionares espirales u otras células neurales de la vía auditiva. El antagonismo puede deberse, por ejemplo, a la sub-regulación de la expresión de NKCC1 (a nivel de transcripción y/o de traducción) o, por ejemplo, bloqueando la actividad de absorción de cloruro de NKCC1 de manera competitiva o no competitiva. Los compuestos antagonistas de NKCC1 de la invención son capaces de modular,
35 preferiblemente disminuir, los niveles de cloruro intracelular en una célula neurosensorial del sistema auditivo. Como se muestra a continuación, los compuestos que modulan la actividad/expresión de NKCC1 pueden usarse para disminuir los niveles de cloruro intracelular y finalmente para prevenir o tratar el tinnitus.

- Mediante los compuestos de la invención, se reconstituye el equilibrio excitador-inhibidor del sistema auditivo, lo que disminuye los fenómenos de sonidos fantasma del tinnitus. La sub-regulación del cotransportador KCC2 se acompaña
40 de la acumulación de aniones cloruro intracelular. Sin aludir a ninguna teoría, esto puede causar un colapso en el gradiente de cloruro transmembrana y una disminución de la inhibición hiperpolarizante de las células; de hecho, en la mayoría de los casos, el flujo de aniones se invierte y el GABA (al igual que la glicina) se despolariza, lo que mejora sustancialmente la excitabilidad de las células (de Koninck, 2007). Esto resulta entonces en un desequilibrio excitador-inhibidor. Dado que la sub-regulación de KCC2 actúa de forma sinérgica con la sobre-regulación de NKCC1, NKCC1
45 también participa en el desequilibrio excitador-inhibidor que produce tinnitus. Por tanto, un compuesto que modula el transporte de cloruro NKCC1 mediante un modo antagonista resulta en una sobre-regulación de la expresión y/o actividad de KCC2 y puede usarse para el tratamiento o la prevención del tinnitus agudo o crónico según la presente invención. Preferiblemente, el compuesto modula los cotransportadores NKCC1 en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas ganglionares espirales u otras células
50 neurales de la vía auditiva.

- "Sobre-regulación" o "aumento" de la actividad y/o expresión de KCC2 tal como se usa aquí se refiere en general a un cambio cuantificado en una calidad medible que es mayor que el margen de error inherente a la técnica de medida, preferiblemente un aumento de al menos un 60% del nivel no patológico, más preferiblemente un aumento de al menos un 80% y más preferiblemente un aumento de un 90% o incluso un 100% de dicho nivel, es decir, restauración
55 completa de la actividad y/o expresión de KCC2. En particular, el término "sobre-regulación" o aumento de la actividad y/o expresión de KCC2 tal como se usa aquí se refiere en general a mejorar la expresión de KCC2 ya sea mejorando

su transcripción y/o su traducción, aumentando así la actividad de KCC2 medida para una célula. Alternativamente, se refiere a la actividad de la proteína KCC2, esto es, a su actividad para mantener la homeostasis del Cl^- de la célula mejorando su actividad cotransportadora, por ejemplo evitando su desfosforilación en Ser940.

5 El término "estructuras neurosensoriales del sistema auditivo" en el contexto de la presente invención se refiere a la vía auditiva, comprendiendo la cóclea, neuronas del ganglio espiral, nervio auditivo, cuerpo trapezoide, núcleos cocleares, núcleo olivar superior, lemnisco lateral, colículo inferior, tálamo y la corteza auditiva. También comprende neuronas somatosensoriales y vías que se proyectan a la vía auditiva, ya que patologías tales como desequilibrios craneocervicales o trastornos de la articulación temporomandibular, mandíbula o músculos extraoculares también pueden evocar tinnitus como síntoma. El término "sobre-regulación" pretende incluir una sobre-regulación en la actividad que puede ser por ejemplo por una sobre-regulación del nivel de expresión u otros fenómenos que conducen a una sobre-regulación o al aumento de la actividad.

10 Por tanto, la presente invención se refiere a un compuesto que modula los cotransportadores de cloruro NKCC1 para su uso en el tratamiento o la prevención del tinnitus agudo o crónico de acuerdo con la reivindicación 1. Preferiblemente, tal compuesto modula el cotransportador de cloruro NKCC1 en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo y, más preferiblemente, en células ciliadas cocleares, neuronas ganglionares espirales u otras células neurales de la vía auditiva. Más específicamente, los compuestos antagonistas de NKCC1 de la invención contrarrestan adicionalmente la sub-regulación del cotransportador de cloruro KCC2 en las células ciliadas internas y las neuronas del ganglio espiral, invirtiendo así parcial o completamente la sub-regulación fisiopatológica de KCC2 (que conduce a tinnitus) que resulta de una lesión del sistema auditivo.

15 Más específicamente, el compuesto modulador del cotransportador NKCC1 disminuye el nivel de cloruro intracelular, preferiblemente en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas ganglionares espirales u otras células neurales a lo largo de la vía auditiva. El compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 puede disminuir preferiblemente el nivel de cloruro intracelular, aumentando así la actividad y/o la expresión de KCC2, preferiblemente en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas de ganglio espiral u otras células neurales a lo largo de la vía auditiva. Así, el compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 puede aumentar específicamente la expresión o la actividad del cotransportador de cloruro KCC2, preferiblemente en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas del ganglio espiral u otras células neurales a lo largo de la vía auditiva.

20 Preferentemente, el compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 no se une a KCC2 en ningún caso. Aunque el compuesto antagonista de NKCC1 puede tener, en algunos casos, un efecto antagonista (menor) sobre KCC2, es más preferible utilizar compuestos que no tengan interacción directa con KCC2 (es decir, que no se unan a KCC2 en absoluto) o, incluso más preferiblemente, que también puedan interactuar directamente con KCC2 de manera agonística aumentando la expresión y/o actividad de KCC2. Por consiguiente, el compuesto antagonista de NKCC1 de la invención preferentemente debería tener un efecto agonista (es decir, recíproco) sobre KCC2.

25 Se describe que el compuesto antagonista de NKCC1 disminuye la expresión y/o actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 que se usa para el tratamiento y/o la prevención del tinnitus puede seleccionarse del grupo que comprende sulfonamidas, por ejemplo acetazolamida, azosemida, bumetanida, clortalidona, clonamida, furosemida, hidroclorotiazida (HCT, HCTZ, HZT), indapamida, mefrusida, metolazona, piretanida, tripamida, xipamida, diclorofenamida (DCP), dorzolamida, etoxzolamida, sultiam o zonisamida o análogos de los mismos. Alternativamente, el compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 se selecciona del grupo que comprende la clase de tiazidas y diuréticos tipo tiazida, por ejemplo bendroflumetiazida, benzotiazida, clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetiazida, metilclotiazida, politiazida, triclorometiazida, clortalidona, indapamida, metolazona o quinotazona o análogos de las mismas. Alternativamente, el compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 se selecciona del grupo que comprende sulfonilurea, tal como torsemida, o derivados de ácido fenoxiacético, tal como ácido etacrínico, o muzolimina.

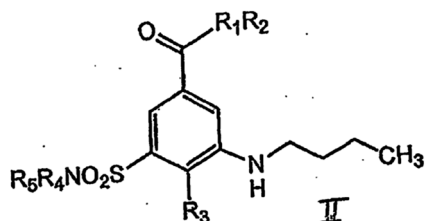
Tal como se usa aquí, "análogos" se refiere en general a la modificación o sustitución de uno o más restos químicos en un compuesto original y pueden incluir derivados, isómeros de posición y profármacos del compuesto original.

30 Se describen diuréticos de bucle, como bumetanida, furosemida, piretanida, azosemida y torsemida o análogos de los mismos. Su nomenclatura se deriva de su potente efecto diurético. Los diuréticos de bucle son antagonistas del cotransportador $\text{Na}^+\text{K}^+\text{Cl}^-$ (por ejemplo NKCC1) en la rama ascendente gruesa del bucle de Henle y actúan inhibiendo la reabsorción de sodio y cloruro por competición con el sitio de unión de Cl^- (véase también Russell, 2000). Los diuréticos, en particular los diuréticos de bucle, pueden actuar simultáneamente como inhibidores de la anhidrasa carbónica, reduciendo los niveles de cloruro intracelular. A este respecto, los diuréticos seleccionados del grupo consistente en acetazolamida, diclorofenamida, dorzolamida, brinzolamida y metazolamida se describen como inhibidores de la anhidrasa carbónica.

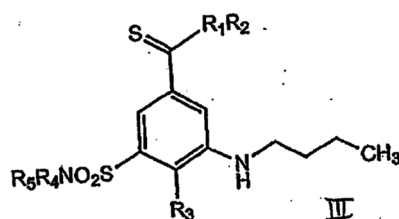
De acuerdo con la presente invención, se considera el uso de bumetanida o de análogos de la misma con efectos antagonistas de NKCC1 para el tratamiento y/o la prevención del tinitus.

Análogos de diuréticos conocidos que actúan como antagonistas de NKCC1 y que son útiles para el tratamiento y/o la prevención del tinnitus de acuerdo con la invención son aquellos definidos por las fórmulas II o III:

5 Fórmula II



Fórmula III



o

10 un isómero o entantiómero de los mismos

o una sal, solvato, tautómero o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, donde

R1 no está presente, H, O o S;

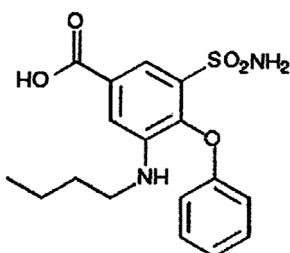
15 R2 no está presente, H, o, cuando R1 es O o S, R2 se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, aralquilo, arilo, alquilaminodialquilo, alquilcarbonilaminodialquilo, alquiloalcarbonilalquilo, alquilcarboniloxialquilo, alquilalaldehído, alquilocetoalquilo, alquilamida, alcarilamida, arilamida, un grupo alquilamonio, ácido alquilcarboxílico, alquilheteroarilo, alquilhidroxilo, un polímero biocompatible tal como alquiloaloxi(polialquiloaloxi)alquilhidroxilo, un glicol (PEG), un polietileno glicol éster (éster PEG) y un polietileno glicol éter (éter PEG), metiloxialquilo, metiloxialcarilo, metiltioalquilo y metiltioalcarilo, no sustituido o sustituido, y cuando R1 no está presente, R2 se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, N,N-dialquilamino, N,N-dialcarilamino, N,N-diarilamino, N-alquil-N-alcarilamino, N-alquil-N-arilamino, N-alcaril-N-arilamino, no sustituido o sustituido;

20 R3 se selecciona del grupo consistente en arilo, halo, hidroxilo, alcoxi y ariloxi, no sustituido o sustituido; y

R4 y R5 se seleccionan, independientemente entre sí, del grupo consistente en hidrógeno, alquilaminodialquilo, carbonilalquilo, carbonilalcarilo, carbonilarilo, y sales de los mismos, tales como sales de sodio, potasio, calcio, amonio, triarilammonio y tetraarilammonio.

25 Preferentemente, se mantienen las siguientes condiciones; R3 en la fórmula II no es feniloaloxi cuando R1 es O y R2, R4 y R5 son H, más específicamente, en algunas realizaciones, el compuesto de fórmula II no es bumetanida.

Es particularmente preferente un compuesto de acuerdo con la siguiente fórmula I (bumetanida):



I

5 "Alquenilo", tal como se usa aquí, se refiere en general a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene uno o más dobles enlaces y que contiene de 2 a 20 átomos de carbono. Ejemplos de grupos alquenilo incluyen propenilo, butenilo, pentenilo y similares. "Cicloalquenilo" o "alquenilo cíclico", tal como se usa aquí, se refiere a carbociclos que no contienen heteroátomos e incluye carbociclos saturados mono, bi y tricíclicos, así como sistemas de anillo condensados. Ejemplos de grupos cicloalquenilo incluyen ciclopropenilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclopentadienilo, ciclohexadienilo y similares. Dichos grupos alquenilo y cicloalquenilo pueden estar opcionalmente sustituidos, tal como se describe aquí.

10 "Alquilo", tal como se usa aquí, se refiere en general a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada. "Alquilo" también se refiere en general a grupos alquilo cíclicos (es decir, cicloalquilos). Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo de cadena lineal, incluyendo metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y grupos alquilo ramificados, incluyendo isopropilo, terc-butilo, isoamilo, neopentilo, isoamilo y similares. "Cicloalquilo" o "alquilo cíclico", tal como se usa aquí, se refiere a carbociclos que no contienen heteroátomos e incluyen carbociclos saturados mono, bi y tricíclicos, así como sistemas de anillo condensados. 15 Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. El cicloalquilo puede estar o no sustituido, y los grupos alquilo cíclicos incluyen ciclopropilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y similares. Dichos grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos, tal como se describe aquí.

"Alquilhalo" se refiere en general a un grupo hidrocarburo saturado o parcialmente insaturado de cadena lineal o ramificada unido a un halógeno (por ejemplo flúor, cloro, bromo y yodo).

20 "Alcarilo", tal como se usa aquí, se refiere en general a un grupo hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada unido a un grupo arilo. Ejemplos de grupos alcarilo incluyen bencilo, 4-clorobencilo, metilbencilo, dimetilbencilo, etilfenilo, propil-(4-nitrofenilo) y similares. Dichos grupos alcarilo pueden estar opcionalmente sustituidos, tal como se describe aquí.

25 "Arilo" o "Ar", tal como se usa en este documento, se refiere en general a un grupo aromático o a un grupo aromático opcionalmente sustituido fusionado con uno o más grupos aromáticos opcionalmente sustituidos, opcionalmente sustituidos con sustituyentes adecuados que incluyen alcoxi inferior, alquilsulfanilo inferior, alquilsulfenilo inferior, alquilsulfonilo inferior, oxo, hidroxilo, mercapto, amino opcionalmente sustituido con alquilo, carboxi, carbamoilo opcionalmente sustituido con alquilo, aminosulfonilo opcionalmente sustituido con alquilo, acilo, aroilo, heteroarilo, aciloxi, aroiloxi, heteroariloxi, alcocarbonilo, nitro, ciano, halógeno o perfluoroalquilo inferior, permitiéndose múltiples 30 grados de sustitución. Ejemplos de arilo incluyen fenilo, 2-naftilo, 1-naftilo y similares.

"Alcoxi", tal como se usa aquí, solo o como parte de otro grupo, se refiere en general a un grupo alquilo tal como se define aquí unido al resto molecular parental a través de un grupo oxo. En algunas realizaciones, el grupo alquilo puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos (por ejemplo O, S o N). Ejemplos de alcoxi incluyen metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi, hexiloxi, etiloxietilo y similares.

35 "Alcariloxi" u "oxialcarilo", tal como se usa aquí, se refiere en general al grupo -O-alquil-arilo donde Ar es arilo. Ejemplos incluyen benciloxi, oxibencilo, 2-naftiloxi y oxi-2-naftilo.

"Alcariloxialquilo" o "alquiloxialcarilo", tal como se usa aquí, se refiere en general al grupo -alquil-O-alquil-arilo donde Ar es arilo. Ejemplos incluyen benciloxietilo.

40 "Arioxi", tal como se usa aquí, se refiere en general al grupo -ArO, donde Ar es arilo o heteroarilo. Ejemplos incluyen fenoxi, benciloxi y 2-naftiloxi.

"Polímero biocompatible", tal como se usa aquí, se refiere en general a un grupo polimérico esencialmente no tóxico y que no tiende a producir respuestas inmunes sustanciales, a la coagulación o a otros efectos no deseados. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, el polialquilenglicol es un polímero biocompatible donde, tal como se usa aquí, polialquilenglicol se refiere a un polialquilenglicol lineal o ramificado, tal como polietilen-

polipropilen- y polibutilenglicol, e incluye además monoalquilen éteres del polialquilenglicol. En algunas realizaciones de la presente invención, el polímero polialquilenglicol es un grupo polialquilenglicol de alquilo inferior, tal como un grupo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polibutilenglicol. PEG tiene la fórmula $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$, donde está en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.000 o más. En algunas realizaciones, n es de 1 a 100 y, en otras realizaciones, n es de 5 a 30. El resto PEG puede ser lineal o ramificado. En otras realizaciones, el PEG puede estar unido a grupos como hidroxilo, alquilo, arilo, acilo o éster. En algunas realizaciones, PEG puede ser un alcoxi-PEG, tal como metoxi-PEG (o mPEG), donde un extremo es un grupo alcoxi relativamente inerte, mientras que el otro extremo es un grupo hidroxilo.

"Carboxi", tal como se usa aquí, se refiere en general al grupo $-\text{COOH}$.

10 "Cicloalquilo", tal como se usa aquí, se refiere a carbociclos que no contienen heteroátomos e incluye carbociclos saturados mono, bi y tricíclicos, así como sistemas de anillo condensados. Ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares. El cicloalquilo puede estar o no sustituido.

"Halo", tal como se usa aquí, se refiere en general a bromo, cloro, flúor o yodo. Alternativamente, el término "haluro" tal como se usa aquí se refiere en general a bromuro, cloruro, fluoruro o yoduro.

15 "Hidroxi", tal como se usa aquí, se refiere en general al grupo $-\text{OH}$.

"Heteroarilo", tal como se usa aquí, se refiere a un anillo aromático de cinco o seis miembros donde al menos un átomo consiste en un heteroátomo (por ejemplo O, S o N), y los átomos restantes son carbono. Los anillos de cinco miembros tienen dos enlaces dobles y los anillos de seis miembros tienen tres enlaces dobles. El grupo heteroarilo puede ser monocíclico o bicíclico (condensado o no condensado). Ejemplos de grupos heteroarilo monocíclicos incluyen furanilo, 20 tiofenoilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, tiadiazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo y similares. Ejemplos de grupos heteroarilo bicíclicos incluyen indolizínilo, indolilo, isoindolilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, purinilo, quinolinilo, isoquinolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, naftiridinilo, pteridinilo y similares. El grupo heteroarilo puede estar o no sustituido.

25 "Heterocicloalquilo", tal como se usa aquí, se refiere a un grupo cicloalquilo donde al menos uno de los átomos de carbono del anillo se ha reemplazado por un heteroátomo (por ejemplo O, S o N). El grupo heterocicloalquilo puede ser monocíclico o bicíclico (condensado o no condensado). Ejemplos de grupos heterocicloalquilo monocíclicos incluyen azetidínilo, pirrolidinilo, piperidinilo, homopiperidinilo, piperazinilo, morfolínilo, tiomorfolínilo, 1-oxotiomorfolínilo, 1,1-dioxotiomorfolínilo, tetrahidrooxazolilo, tetrahidroisoxazolilo, tetrahidroimidazolilo, 30 tetrahidropirazolilo, tetrahidrotiazolidínilo, tetrahidroisotiazolidínilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidropiridazinilo, 4-piperadonilo y similares. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo bicíclicos no condensados incluyen quinuclidínilo, adamantilo, 2-azobicyclo[3.2.1]octilo y similares. Ejemplos de grupos heterocicloalquilo condensados incluyen cualquiera de los grupos heterocicloalquilo monocíclicos antes mencionados fusionados con otro grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo. El grupo heterocicloalquilo puede estar o no sustituido.

35 "Sustituido" tal como se usa anteriormente se refiere en general al reemplazo de uno o más de los átomos de hidrógeno del grupo por sustituyentes conocidos por los expertos en la técnica y que resulta en un compuesto estable como se describe a continuación. Ejemplos de grupos sustituyentes adecuados incluyen alquilo, acilo, alquenilo, alquilcicloalquilo, arilalcarilo, hidroxilo, tioalcoxi, ariloxi, acilo, amino, amido, carboxilo, carboxialquilo, tiocarboxialquilo, carboxiarilo, tiocarboxiarilo, halo, oxo, mercapto, sulfínilo, sulfonilo, sulfonamido, amidino, 40 carbamoilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, dialquilaminoalquilo, ácido carboxílico, carboxamido, haloalquilo, dihaloalquilo, trihaloalquilo, trihaloalcoxi, alquiltio, alquiltio, aralquilo, alquilsulfonilo, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, guanidino, ureido, nitro y similares. Se permiten las sustituciones cuando tales combinaciones dan como resultado compuestos estables para el propósito pretendido. Por ejemplo, se permiten sustituciones cuando el compuesto resultante es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento hasta un grado útil de pureza a partir de una mezcla de reacción y su formulación en un agente o reactivo terapéutico o diagnóstico.

Los compuestos antagonistas de NKCC1 tal como se describen aquí, por ejemplo según la fórmula I, se proporcionan, por ejemplo, como isómeros, tautómeros, zwitteriones, enantiómeros, diastereoisómeros, racematos o mezclas estereoquímicas de los mismos. Normalmente se proporcionarán, por ejemplo, como una sal, solvato, hidrato o una combinación de los mismos farmacéuticamente aceptable y se formulan típicamente como una composición 50 farmacéutica en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

"Sal farmacéuticamente aceptable", tal como se usa aquí, se refiere en general a una forma de sal de un compuesto que permite su uso o formulación como un producto farmacéutico y que mantiene la eficacia biológica del ácido o de la base libre del compuesto especificado y que no es biológicamente o de otra forma indeseable. Sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos aquí descritos incluyen la forma de sal del compuesto que permite 55 su uso o formulación como producto farmacéutico y que mantiene la eficacia biológica del ácido y la base libres del

compuesto especificado y que no es biológica o de otro modo indeseable. Ejemplos de tales sales se describen en Wermuth y Stahl, (Eds.) (2002) Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, Wiley-Verlag Helvetica Acta, Zurich. Ejemplos de tales sales incluyen sales de metales alcalinos y sales de adición de ácidos y bases libres. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, 5 bisulfitos, fosfatos, monohidrogenofosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formiatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butin-1,4-dioatos, hexin-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, gamma-hidroxibutiratos, glicolatos, 10 tartratos, metanosulfonatos, etanosulfonatos, propanosulfonatos, toluensulfonatos, naftalen-1-sulfonatos, naftalen-2-sulfonatos y mandelatos. En algunas realizaciones, la sal farmacéuticamente aceptable incluye sales de sodio, potasio, calcio, amonio, trialkilammonio y tetraalkilammonio.

"Hidrato", tal como se usa aquí, se refiere en general al compuesto cuando el disolvente es agua. "Solvato", tal como se usa aquí, se refiere en general a una forma solvatada farmacéuticamente aceptable de un compuesto especificado 15 que mantiene la eficacia biológica de dicho compuesto, por ejemplo, resultante de una asociación física del compuesto con una o más moléculas de disolvente. Ejemplos de solvatos incluyen los compuestos de la invención en combinación con agua, 1-propanol, 2-propanol, etanol, metanol, DMSO, acetato de etilo, ácido acético o etanolamina.

Preferentemente, el compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 tiene una baja afinidad por KCC2 (inferior a 10^{-7} o, preferiblemente, inferior a 10^{-6} M, más preferiblemente inferior a 20 10^{-5} M) o al menos una afinidad mucho mayor por NKCC1 que por KCC2 (una constante de unión de al menos 2 órdenes de magnitud, preferiblemente de al menos 4 órdenes de magnitud, más preferiblemente de al menos 5 órdenes de magnitud y con mayor preferencia de al menos 6 órdenes de magnitud más alta (al menos 10^{-9} , preferiblemente más de 10^{-10}) o no se une a KCC2 en absoluto. En particular, el compuesto antagonista de NKCC1 no debería tener ningún efecto antagonista sobre KCC2. Más preferiblemente, el compuesto antagonista de NKCC1 25 debería tener un efecto agonista (es decir, recíproco) sobre KCC2. El compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 es bumetanida o un derivado o análogo de la misma de acuerdo con la reivindicación 1, ya que antagoniza específicamente a NKCC1. Por el contrario, por ejemplo la furosemida bloquea tanto NKCC1 como los KCC con una potencia aproximadamente igual y, por tanto, ejerce simultáneamente efectos opuestos sobre los niveles de cloruro intracelular, mientras que la bumetanida tiene una afinidad mucho mayor por 30 NKCC1 que por KCC2 (Blaesse et al., 2009). En consecuencia, los compuestos que ejercen menos efectos antagonistas sobre KCC2 o, incluso más preferiblemente, ejercen efectos agonistas sobre KCC2, aumentando así su actividad y/o expresión (a la vez que simultáneamente disminuyen la expresión y/o actividad de NKCC1) son preferidos de acuerdo con la presente invención. Pueden obtenerse derivados o análogos de cualquiera de los compuestos anteriores mediante enfoques de química médica, por ejemplo con una mayor lipofiliidad o menores efectos 35 diuréticos, por ejemplo los análogos de diuréticos utilizados como antagonistas de NKCC1 para tratar el tinnitus (análogos de bumetanida) exhibirán habitualmente menos efectos diuréticos que la bumetanida en sí.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto de fórmula II puede ser bumetanida, bumetanida aldehído, metil éster de bumetanida, cianometil éster de bumetanida, etil éster de bumetanida, isoamil éster de bumetanida, octil éster 40 de bumetanida, bencil éster de bumetanida, bumetanida-dibencilamida, bumetanida-dietilamida, bumetanida morfolinoetil éster, bumetanida 3-(dimetilaminopropil) éster, bumetanida N,N-dietilglicolamido éster, bumetanida N,N-dimetilglicolamido éster, bumetanida pivaxetil éster, bumetanida propaxetil éster, bumetanida metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil éster, sal de bumetanida-benciltrimetilamonio y sal de bumetanida cetiltrimetilamonio. En realizaciones particulares, el compuesto no es bumetanida.

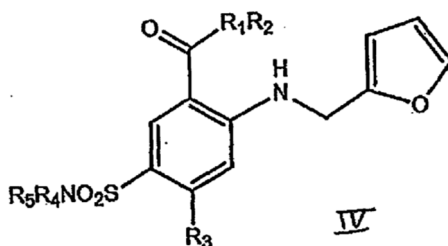
Alternativamente, el compuesto de fórmula II de acuerdo con la presente invención puede ser bumetanida [-(C=O)-SH] tioácido, bumetanida S-metil tioéster, bumetanida S-cianoetil tioéster, bumetanida S-etil tioéster, bumetanida S-isoamil tioéster, bumetanida S-octil tioéster, bumetanida S-bencil tioéster, bumetanida S-(morfolinoetil) tioéster, bumetanida S-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, bumetanida S-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, bumetanida S-(N,N-dimetilglicolamidol) tioéster, bumetanida S-pivaxetil tioéster, bumetanida S-propaxetil tioéster, bumetanida S-[metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil] tioéster, sal de tioácido de bumetanida [-(C=O)-S]-benciltrimetilamonio y sal de tioácido 50 de bumetanida [-(C=O)-S]-cetiltrimetilamonio.

De acuerdo con la presente invención, el compuesto de fórmula III puede ser tioácido de bumetanida metastable [-(C=S)-OH], bumetanida O-metil tioéster, bumetanida O-cianometil tioéster, bumetanida O-etil tioéster, bumetanida O-isoamil tioéster, bumetanida O-octil tioéster, bumetanida O-bencil tioéster, bumetanida O-(morfolinoetil) tioéster, bumetanida O-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, bumetanida O-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, bumetanida O-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, bumetanida O-pivaxetil tioéster, bumetanida O-propaxetil tioéster, bumetanida O-[metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil] tioéster, sal de tioácido de bumetanida [-(C=S)-O]-benciltrimetilamonio y sal de tioácido 55 de bumetanida [-(C=S)-O]-cetiltrimetilamonio.

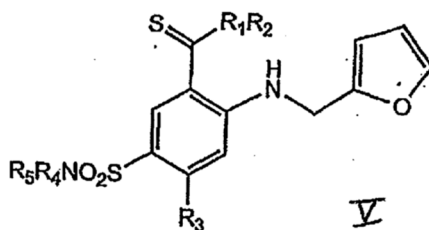
En algunas realizaciones de la presente invención, el compuesto de fórmula III puede ser bumetanida tioaldehído, bumetanida $[-(C=S)-SH]$ ditióácido, bumetanida metil ditióéster, bumetanida cianometil ditióéster, bumetanida etil ditióéster, bumetanida isoamil ditióéster, bumetanida octil ditióéster, bumetanida bencil ditióéster, bumetanida dibeltioamida, bumetanida dietiltioamida, bumetanida morfolinoetil ditióéster, bumetanida 3-(dimetilaminopropil) ditióéster, bumetanida N,N-dietilglicolamido ditióéster, bumetanida N,N-dimetilglicolamido ditióéster, bumetanida pivaxetil ditióéster, bumetanida propaxetil ditióéster, bumetanida metoxi(polioxitilenoxi) $_{n-1}$ -etil ditióéster, bumetanida benciltrimetilamonio sal de ditióácido y bumetanida cetiltrimetilamonio sal de ditióácido.

Otros análogos de diuréticos conocidos que actúan como antagonistas de NKCC1 y que son útiles para el tratamiento y/o la prevención del tinnitus son aquellos descritos por las fórmulas IV a VII:

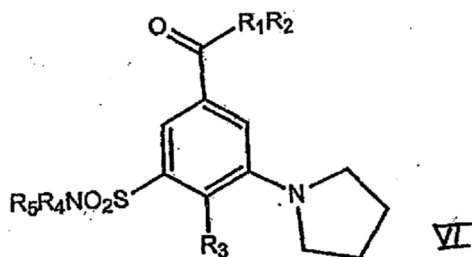
10 Fórmula IV



Fórmula V

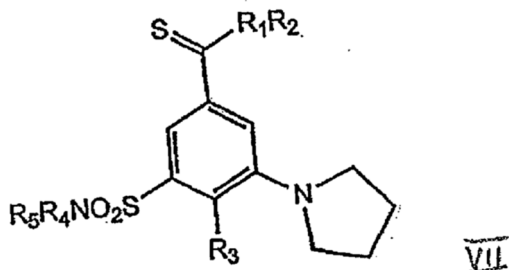


Fórmula VI



15

Fórmula VII



o una sal, solvato, tautómero o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, donde R1, R2, R3, R4 y R5 son como se han definido anteriormente para las fórmulas II y III.

Pueden cumplirse las siguientes condiciones: R3 en la fórmula IV no es Cl, cuando R1 es O y R2, R4 y R5 son H, más específicamente, el compuesto de fórmula IV no es furosemida; R2 en la fórmula IV no es metilo cuando R1 es O, R3 es Cl y R4 y R5 son H, más específicamente el compuesto de fórmula IV no es metil éster de furosemida; R3 en la fórmula VI no es fenilo cuando R1 es O y R2, R4 y R5 son H, más específicamente el compuesto de fórmula VI no es piretanida.

El compuesto de fórmula IV puede ser furosemida, furosemida aldehído, metil éster de furosemida, cianometil éster de furosemida, etil éster de furosemida, isoamil éster de furosemida, octil éster de furosemida, bencil éster de furosemida, morfolinoetil éster de furosemida, 3-(dimetilaminopropil) éster de furosemida, N,N-dietilglicolamido éster de furosemida, N,N-dimetilglicolamido éster de furosemida, furosemida pivaxetil éster, furosemida propaxetil éster, furosemida metoxi(polietileno) $n-1$ -etil éster, sal benciltrimetilamonio de ácido de furosemida y sal cetiltrimetilamonio de ácido de furosemida. En realizaciones particulares, el compuesto no es furosemida. En otras realizaciones de la presente invención, el compuesto de fórmula IV puede ser furosemida $[-(C=O)-SH]$ tioácido, furosemida S-metil tioéster, furosemida S-cianometil tioéster, furosemida S-etil tioéster, furosemida S-isoamil tioéster, furosemida S-octil tioéster, furosemida S-bencil tioéster, furosemida S-(morfolinoetil) tioéster, furosemida S-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, furosemida S-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, furosemida S-pivaxetil tioéster, furosemida S-propaxetil tioéster, furosemida S-[metoxi(polietileno) $n-1$ -etil] tioéster, sal de tioácido de furosemida $[-(C=O)-S^-]$ de benciltrimetilamonio y sal de tioácido de furosemida $[-(C=O)-S^-]$ cetiltrimetilamonio.

El compuesto de fórmula V puede ser tioácido de furosemida $[-(C=S)-OH]$ metaestable, furosemida O-metil tioéster, furosemida O-cianometil tioéster, furosemida O-etil tioéster, furosemida O-isoamil tioéster, furosemida O-octil tioéster, furosemida O-bencil tioéster, furosemida O-(morfolinoetil) tioéster, furosemida O-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, furosemida O-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, furosemida O-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, furosemida O-pivaxetil tioéster, furosemida O-propaxetil tioéster, furosemida O-[metoxi(polietileno) $n-1$ -etil] tioéster, sal de tioácido de furosemida $[-(C=S)-O^-]$ benciltrimetilamonio y sal de tioácido de furosemida $[-(C=S)-O^-]$ cetiltrimetilamonio.

El compuesto de fórmula V puede ser furosemida tioaldehído, furosemida $[-(C=S)-SH]$ ditioácido, furosemida metil ditioéster, furosemida cianometil ditioéster, furosemida etil ditioéster, furosemida isoamil ditioéster, furosemida octil ditioéster, furosemida bencil ditioéster, furosemida dibenciltioamida, furosemida dietiltioamida, furosemida morfolinoetil ditioéster, furosemida 3-(dimetilaminopropil) ditioéster, furosemida N,N-dietilglicolamido ditioéster, furosemida pivaxetil ditioéster, furosemida propaxetil ditioéster, furosemida metoxi(polietileno) $n-1$ -etil ditioéster, sal de ditioácido de furosemida de benciltrimetilamonio y sal de ditioácido de furosemida de cetiltrimetilamonio.

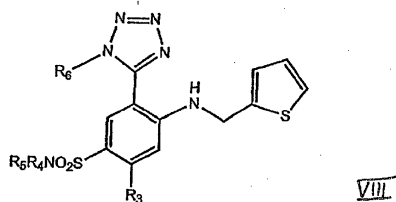
En la presente invención, el compuesto de fórmula VI puede ser piretanida, piretanida aldehído piretanida metil éster, piretanida cianometil éster, piretanida etil éster, piretanida isoamil éster, piretanida octil éster, piretanida bencil éster, piretanida dibencilamida, piretanida dietilamina, piretanida morfolinoetil éster, piretanida 3-(dimetilaminopropil) éster, piretanida N,N-dietilglicolamida éster, piretanida dimetilglicolamida éster, piretanida pivaxetil éster, piretanida propaxetil éster, piretanida metoxi(polietileno) $n-1$ -etil éster, sal benciltrimetil amónica de piretanida y sal cetiltrimetilamónica de piretanida. El compuesto puede no ser piretanida.

El compuesto de fórmula VI puede ser piretanida $[-(C=O)-SH]$ tioácido, piretanida S-metil tioéster, piretanida S-cianometil tioéster, piretanida S-etil tioéster, piretanida S-isoamil tioéster, piretanida S-octil tioéster, piretanida S-bencil tioéster, piretanida S-(morfolinoetil) tioéster, piretanida S-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, piretanida S-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, piretanida S-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, piretanida S-pivaxetil tioéster, piretanida S-propaxetil tioéster, piretanida S-[metoxi(polietileno) $n-1$ -etil] tioéster, sal benciltrimetilamónica de tioácido de piretanida $[-(C=O)-S^-]$ y sal cetiltrimetilamónica de tioácido de piretanida $[-(C=O)-S^-]$.

El compuesto de fórmula VII puede ser piretanida $[-(C=S)-OH]$ tioácido metestable, piretanida O-metil tioéster, piretanida O-cianometil tioéster, piretanida O-etil tioéster, piretanida O-isoamil tioéster, piretanida O-octil tioéster, piretanida O-bencil tioéster, piretanida O-(morfolinoetil) tioéster, piretanida O-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, piretanida O-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, piretanida O-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, piretanida O-pivaxetil tioéster, piretanida O-propaxetil tioéster, piretanida O-[metoxi(polietileno) $n-1$ -etil] tioéster, sal benciltrimetilamónica de tioácido de piretanida $[-(C=S)-O^-]$ y sal cetiltrimetilamónica de tioácido de piretanida $[-(C=S)-O^-]$.

El compuesto de fórmula VII puede ser piretanida tioaldehído, piretanida $[-(C=S)-SH]$ ditioácido, piretanida metil ditioéster, piretanida cianometil ditioéster, piretanida etil ditioéster, piretanida isoamil ditioéster, piretanida octil ditioéster, piretanida bencil ditioéster, piretanida dibenciltioamida, piretanida dietiltioamida, piretanida morfolinoetil ditioéster, piretanida 3-(dimetilaminopropil) ditioéster, piretanida N,N-dietilglicolamido ditioéster, piretanida N,N-dimetilglicolamido ditioéster, piretanida pivaxetil ditioéster, piretanida propaxetil ditioéster, piretanida metoxi(polietileno) $n-1$ -etil ditioéster, sal benciltrimetilamónica de ditioácido de piretanida y sal cetiltrimetilamónica de ditioácido de piretanida.

Se describen los compuestos de fórmula VIII para su uso en el tratamiento y/o la prevención del tinnitus:



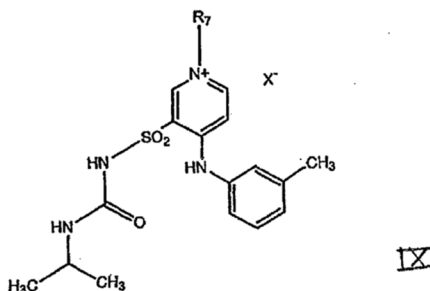
o una sal, solvato, tautómero o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo, donde R3, R4 y R5 se definen anteriormente; y

- 5 R6 se selecciona del grupo consistente en alquiloxicarbonilalquilo, alquilaminocarbonilalquilo, alquilaminodialquilo, alquilhidroxilo, un polímero biocompatible tal como alquiloxi(polialquiloxi)alquilhidroxilo, un polietilenglicol (PEG), un éster de polietilenglicol (éster de PEG) y un éter de polietilenglicol (éter de PEG), metiloxialquilo, metiloxialcarilo, metiltioalquilo y metiltioaicarilo, sustituido o no sustituido,

- 10 con la condición de que R3 en la fórmula VIII no es Cl, cuando R4, R5 y R6 son H, más específicamente, el compuesto de fórmula VIII puede no ser azosemida.

Los compuestos de fórmula VIII pueden ser azosemidas tetrazolil-sustituidas (tales como azosemidas sustituidas con metoximetiltetrazolilo, azosemidas sustituidas con metiltiomeltetrazolilo y azosemidas sustituidas con N-mPEG350-tetrazoilo), sal benciltrimetilamónica de azosemida y/o sal cetiltrimetilamónica de azosemida.

- 15 Otros compuestos descritos para su uso en el tratamiento y/o la prevención del tinnitus son aquellos según la fórmula IX:



o una sal, solvato, tautómero o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos como se describen, donde

- 20 R7 no está presente o se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquiloxicarbonilalquilo, alquilaminocarbonilalquilo, alquilaminodialquilo, alquilhidroxilo, un polímero biocompatible tal como alquiloxi(polialquiloxi)alquilhidroxilo, un polietilenglicol (PEG), un éster de polietilenglicol (éster de PEG) y un éter de polietilenglicol (éter de PEG), metiloxialquilo, metiloxialcarilo, metiltioalquilo y metiltioaicarilo, sustituido o no sustituido; y

- 25 X- es un haluro, tal como bromuro, cloruro, fluoruro, yoduro o un resto aniónico tal como mesilato o tosilato; alternativamente, X- no está presente y el compuesto forma una sal "interna" o zwitterónica (donde R7 es H),

con la condición de que R7 esté siempre presente y X- puede no estar presente. Más específicamente, el compuesto de fórmula IX no es torsemida.

- 30 Los compuestos de fórmula IX pueden ser sales amónicas cuaternarias de torsemida sustituidas con piridina o sus correspondientes sales internas (zwitteriones). Ejemplos incluyen sales metoximetil-piridinio de torsemida, sales de metiltiomel-piridinio de torsemida y sales N-mPEG350-piridinio de torsemida.

El término "amino", tal como se usa aquí, se refiere a -NH2, donde uno o ambos átomos de hidrógeno pueden haberse opcionalmente reemplazado por alquilo o arilo o uno de cada, opcionalmente sustituido.

Los términos "alquiltio" o "tioalquilo", tal como se usan aquí, solos o como parte de otro grupo, se refieren a un grupo alquilo como se define aquí unido al grupo molecular parental a través de un resto azufre. Ejemplos representativos de alquiltio incluyen metiltio, tiometilo, etiltio, tioetilo, n-propiltio, tio-n-propilo, isopropiltio, tio-isopropilo, n-butiltio, tio-n-butilo y similares.

- 5 Los términos "ariltio" o "tioarilo" tal como se usan aquí se refieren al grupo -ArS, donde Ar es arilo. Ejemplos incluyen feniltio, tiofenilo, 2-naftiltio y tio-2-naftilo.

Los términos "alcariltio" o "tioalcarilo" tal como se usan aquí se refieren al grupo -S-alqui-arilo, donde Ar es arilo. Ejemplos incluyen benciltio, tiobencilo, 2-naftiltio y tio-2-naftilo.

- 10 El término "amonio cuaternario" tal como se usa aquí se refiere a una estructura química con cuatro enlaces a nitrógeno con una carga positiva en el nitrógeno en el estado "onio", es decir, "R₄N⁺" o "nitrógeno cuaternario", donde R es un sustituyente orgánico tal como alquilo o arilo. El término "sal de amonio cuaternario" tal como se usa aquí se refiere a la asociación del catión amonio cuaternario con un anión.

- 15 También se describe que el compuesto que disminuye la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 también puede seleccionarse de compuestos no diuréticos, tales como los inhibidores de proteína-quinasa estaurosporina y K252a, mediante autofosforilación de SPAK y fosforilación del sustrato del cotransportador, o los agentes sulfhidrilo N-etilmaleimida (NEM) y diamida (Gagnon et al. 2006).

- 20 También se describe que los compuestos antagonistas de NKCC1, que (i) disminuyen la expresión y/o la actividad del cotransportador de cloruro NKCC1 y (ii) modulan adicionalmente el cotransportador de cloruro KCC2 de manera que la expresión de KCC2 y/o el nivel de actividad aumentan (KCC2 agonista). Dichos compuestos actúan preferiblemente en estructuras neurosensoriales del sistema auditivo, más preferiblemente en células ciliadas cocleares, neuronas ganglionares espirales, células gliales satélite u otras células gliales o neurales a lo largo de la vía auditiva. Se describe que los compuestos que ejercen ambos efectos (antagonista de NKCC1 y agonista de KCC2) se seleccionan específicamente del grupo consistente en proteína que interactúa con CCC (CIP1), proteína fosfatasa PP1, NEM (N-etilmaleimida) y estaurosporina.

- 25 Los niveles de cloruro intracelular pueden disminuirse mediante la administración de la proteína que interactúa con CCC (cotransportador de cloruro catiónico) (CIP1) o de un péptido (con una longitud típica entre 10 y 50 aminoácidos) derivado de la misma que presenta las propiedades antagonistas NKCC1 y agonistas KCC2 de la CIP1 de longitud completa, que se ha demostrado que inhibe NKCC1 y activa recíprocamente KCC2 (Wenz et al., 2009). Además, es conocido que la proteína fosfatasa PP1 desactiva NKCC1 y activa KCC2. Se han informado efectos sinérgicos
30 similares con NEM (N-etilmaleimida) y estaurosporina.

También se describen anticuerpos antagonistas de NKCC1 o epítomos de NKCC1 antagonista que reconocen fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, F(ab)₂, diacuerpos, scFv, Fv y minicuerpos, que se unen a NKCC1 y bloquean o disminuyen su actividad. Los anticuerpos también se pueden proporcionar en forma humanizada.

- 35 En términos de los compuestos antagonistas de NKCC1 que disminuyen el nivel de expresión, NKCC1 puede ser suprimido por un ARNsi o ARN shARN que se une específicamente a segmentos del ARNm de NKCC1. El ARNsi típicamente tiene una longitud de 21 a 23 nucleótidos que son complementarios a una región del ARNm de NKCC1. También se pueden usar ribozimas que reconocen específicamente una región diana del ARNm de NKCC1 para antagonizar el nivel de expresión de NKCC1. Además, tales compuestos pueden ser ARN antisentido que se une al ARNm de NKCC1 y, con ello, bloquean su traducción, por ejemplo oligonucleótidos antisentido. Alternativamente, el
40 nivel de expresión de NKCC1 puede reducirse mediante compuestos que actúan directamente sobre la transcripción del gen NKCC1 en las células relevantes del sistema auditivo. Dichos compuestos pueden, por ejemplo, interferir con las regiones reguladoras del gen NKCC1, por ejemplo bloqueando la actividad del promotor o bloqueando los factores de transcripción necesarios para que se transcriba el gen NKCC1

- 45 Preferiblemente, cualquier compuesto antagonista de NKCC1 que pueda ejercer indirectamente un efecto sobre la regulación positiva de KCC2 debido a su efecto sobre NKCC1 no debería resultar en una sobreexpresión o sobreactividad más allá del nivel fisiológico de KCC2 en células sanas para evitar posibles efectos adversos que pueden conducir a las células a, por ejemplo, muerte celular.

- 50 En una realización preferente de la presente invención, el compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 no interfiere con la función auditiva, es decir, con la audición, o sólo de una manera clínicamente insignificante y/o reversible. Dado que el Cl⁻ es uno de los principales iones biológicos implicados en diversos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, cualquier modulación de los niveles de cloruro con el fin de atenuar el tinnitus puede potencialmente interferir con la homeostasis iónica en el sistema auditivo y en particular en la cóclea. Los cambios en los niveles de cloruro intracoclear pueden inducir cambios también en los niveles de Na⁺ o K⁺. La selección y dosificación de los

compuestos de la invención preferentemente se llevará a cabo de modo que la administración de ese compuesto no afecte al potencial endolinfático ni a la función auditiva.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende, como un agente activo, un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 según la presente invención. Dichas composiciones farmacéuticas se pueden formular en diversas formas de dosificación. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, al menos un compuesto o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como ingrediente activo, se mezclan íntimamente con vehículos y aditivos apropiados siguiendo técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica de las formulaciones farmacéuticas. Remington. The Science And Practice of Pharmacy. 20th Edition. (Gennaro, A. R., Chief Editor), Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000.

- 10 Tal composición farmacéutica de acuerdo con la invención contendrá típicamente "materiales vehículo" que son excipientes compatibles con un agente activo como el aquí descrito, con la estructura o estructuras diana del oído y con las propiedades del perfil de liberación aceptables para las formulaciones farmacéuticas que se administran en el oído.

- 15 Tales materiales vehículo incluyen, por ejemplo, aglutinantes, agentes de suspensión, agentes de disgregación, agentes de carga, tensioactivos, solubilizantes, estabilizadores, lubricantes, agentes humectantes, diluyentes y similares. Materiales vehículo farmacéuticos compatibles con el oído incluyen goma arábica, gelatina, dióxido de silicio coloidal, glicerofosfato de calcio, lactato de calcio, maltodextrina, glicerina, silicato de magnesio, polivinilpirrolidona (PVP), colesterol, ésteres de colesterol, caseinato de sodio, lecitina de soja, ácido taurocólico, fosfatidilcolina, cloruro sódico, fosfato tricálcico, fosfato dipotásico, celulosa y conjugados de celulosa, azúcares estearoil lactilato de sodio, carragenina, monoglicéridos, diglicéridos, almidón pregelatinizado y similares.

El término "diluyente" se refiere a compuestos químicos que se usan para diluir un agente activo aquí descrito antes de la administración y que son compatibles con la estructura o estructuras diana del oído.

- 25 "Agentes dispersantes" y/o "agentes moduladores de la viscosidad" son materiales que controlan la difusión y homogeneidad de un agente activo aquí descrito en medios líquidos. Ejemplos de facilitadores de difusión/agentes dispersantes incluyen polímeros hidrófilos, electrolitos, Tween 60 u 80, PEG, polivinilpirrolidona (PVP; conocido comercialmente como Plasdone) y agentes dispersantes basados en carbohidratos, tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosas (por ejemplo HPC, HPC-SL y HPC-L), hidroxipropilmetilcelulosas (por ejemplo HPMC K100, HPMC K4M, HPMC K15M y HPMC K100M), carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, estearato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), celulosa no cristalina, silicato de magnesio y aluminio, trietanolamina, alcohol polivinílico (PVA), copolímero vinilpirrolidona/acetato de vinilo (S630), polímero de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol con óxido de etileno y formaldehído (también conocido como tiloxapol), poloxámeros (por ejemplo Pluronic F68, F88 y F108, que son copolímeros en bloque de óxido de etileno y óxido de propileno), y poloxaminas (por ejemplo Tetronic 908, también conocido como Poloxamine 908, que es un copolímero en bloque tetrafuncional derivado de la adición secuencial de
- 30 óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina (BASF Corporation, Parsippany, NJ)), polivinilpirrolidona Ki 2, polivinilpirrolidona Ki 7, polivinilpirrolidona K25 o polivinilpirrolidona K30, copolímero de polivinilpirrolidona/acetato de vinilo (S-630), polietilenglicol, por ejemplo polietilenglicol con un peso molecular de aproximadamente 300 a aproximadamente 6.000 o de aproximadamente 3.350 a aproximadamente 4.000 o de aproximadamente 7.000 a aproximadamente 5.400, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, polisorbato-80, alginato de sodio, gomas tales como, por ejemplo, goma tragacanto y goma arábica, goma guar, xantanos, incluyendo goma xantano, azúcares, celulosos, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polisorbato-80, alginato de sodio, monolaurato de sorbitano polietoxilado, monolaurato de sorbitano polietoxilado, povidona, carbómeros, polivinil alcohol (PVA), alginatos, quitosanos y combinaciones de los mismos. También se utilizan plastificantes como celulosa o trietilcelulosa como agentes dispersantes. Agentes dispersantes opcionales útiles en
- 45 dispersiones liposomales y dispersiones autoemulsionantes de un agente activo aquí descrito son dimiristoil fosfatidilcolina, fosfatidilcolina natural de huevo, fosfatidilglicerol natural de huevo, colesterol y miristato de isopropilo. También son preferentes para su uso aquí glicosaminoglicanos aniónicos no sulfatados, en particular hialuronato/ácido hialurónico, que es un polímero de disacáridos compuestos por ácido D-glucurónico y D-N-acetilglucosamina enlazados vía enlaces glucosídicos β -1,4 y β -1,3 alternos. Preferiblemente, el peso molecular del hialuronato/ácido hialurónico está en el intervalo de 50.000 a 5.000.000 Da.

- 50 "Solubilizantes" se refiere a compuestos aceptables para el oído, tales como triacetina, trietocitrato, oleato de etilo, caprilato de etilo, laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, vitamina E TPCS, dimetilacetamida, N-metilpirrolidona, N-hidroxietilpirrolidona, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropil ciclodextrinas, etanol, n-butanol, alcohol isopropílico, colesterol, sales biliares, polietilenglicol 200-600, glicofulol, transcutol, propilenglicol y dimetilisorbida y similares.

"Estabilizadores" se refiere a compuestos tales como agentes antioxidantes, tampones, ácidos, conservantes y similares que son compatibles con el entorno de las estructuras diana del oído. Los estabilizadores incluyen agentes

que harán cualquiera de (1) mejorar la compatibilidad de los excipientes con un recipiente o un sistema de administración, incluida una jeringa o una botella de vidrio, (2) mejorar la estabilidad de un componente de la composición o (3) mejorar la estabilidad de la formulación.

5 "Tensioactivos" se refiere a compuestos que son aceptables para el oído, tales como laurilsulfato de sodio, docusato de sodio, Tween 60 u 80, triacetina, vitamina E TPGS, monooleato de sorbitano, monooleato de polioxietilensorbitano, polisorbato, poloxámeros, sales biliares, monoestearato de glicerilo, copolímeros de óxido de etileno y óxido de propileno, por ejemplo Pluronic (BASF), y similares. Otros tensioactivos incluyen polioxietilenglicéridos de ácidos grasos y aceites vegetales, por ejemplo polioxitilen (60)-aceite de ricino hidrogenado; y alqui léteres y alquilfenil éteres de polioxietileno, por ejemplo octoxinol 10, octoxinol 40. En algunas realizaciones, se incluyen tensioactivos para
10 mejorar la estabilidad física o para otros fines.

La composición puede comprender preferiblemente polímeros de origen sintético o natural, que preferentemente son biocompatibles. Estos polímeros pueden incluir polímeros de liberación controlada. En caso de que la composición se proporcione como un gel, son preferentes polímeros formadores de gel, por ejemplo ácido hialurónico resp. hialuronatos, geles de lecitina, derivados de (poli)alanina, pluronics, poli(etilenglicol), poloxámeros, quitosanos,
15 xiloglucanos, colágenos, fibrinas, poliésteres, poli(lactidas), poli(glicólido) o sus copolímeros PLGA, acetato isobutirato de sacarosa y monooleato de glicerol. Otros ingredientes pueden ser vehículos, por ejemplo agua para formulaciones líquidas, formulaciones aceite-en-agua, agua-en-aceite. Además, el producto farmacéutico puede comprender agentes que mejoran o reducen la viscosidad. La formulación puede estar basada en microesferas, micropartículas, liposomas, nanocápsulas, nanoesferas o nanopartículas.

20 La composición farmacéutica se administra vía sistémica mediante una forma de dosificación oral.

También se describe que la composición farmacéutica se administra por las vías intramuscular o intravenosa o se proporciona una forma de dosificación adecuada para su administración tópica o local en o dentro del oído. Se describe que la composición farmacéutica puede ser específicamente una forma de dosificación adecuada para administrarse localmente en o dentro del oído, en particular sobre la ventana redonda u oval del oído interno, es decir, la interfaz
25 oído medio/oído interno. La administración local es particularmente adecuada, preferiblemente en la ventana redonda del oído interno, ya que la expresión de KCC2 durante el tinnitus se reduce en el sistema auditivo, por lo que las células pilosas internas, el nervio auditivo y las neuronas de los ganglios espirales o sus proyecciones periféricas y centrales se ven principalmente afectados. Se describe que el sistema de administración puede comprender una jeringa y un dispositivo de aguja capaz de perforar la membrana timpánica y acceder directamente a la membrana de la ventana redonda del oído. Se describe aquí que pueden inyectarse de 0,2 a 0,5 cc de una composición aquí descrita en el oído medio para su difusión a través de la membrana de la ventana redonda y/o de la ventana oval. También se describe que la composición puede administrarse en el oído medio vía una paracentesis, un colgajo timpanomeatal o mediante un tubo de ventilación. Una composición aquí descrita puede, por ejemplo, administrarse también directamente en el oído interno, por ejemplo, mediante una incisión en la placa de base del estribo o una composición
30 aquí descrita puede administrarse a la cóclea mediante una cocleostomía. Una composición aquí descrita también puede, por ejemplo, administrarse al aparato vestibular (por ejemplo a los canales semicirculares o vestíbulo).

De acuerdo con la descripción, tal composición farmacéutica puede administrarse locamente mediante microcatéteres, por ejemplo implantados en el paciente, sistemas micrométricos, (micro)mechas o inyecciones intratimpánicas, implantes cocleares, un dispositivo de bomba, una bomba de infusión o administración intracoclear mediante
40 inyección, perfusión, etc.

Para la administración local, se proporcionará en una forma líquida, semilíquida o viscosa. Se puede proporcionar como un gel, en particular con una matriz soporte a base de hidrogel, una crema, tintura, espuma o pomada. Así, se puede proporcionar, por ejemplo, en forma de hidrogel, formando in situ material esponjoso, como un gel endurecible por radiación actínica o como un gel termo-reversible. La composición se puede proporcionar como una formulación
45 de liberación controlada.

Se considera una formulación tipo gel para asegurar la retención de la composición en el oído medio o respectivamente en las membranas de las ventanas redonda u oval, incluso en el caso de aberturas de la trompa de Eustaquio, por ejemplo debidas a tragar. Los geles incluyen un sistema monofásico o bifásico. Un gel de una sola fase consiste en macromoléculas orgánicas distribuidas uniformemente en un líquido de manera que no existen límites aparentes entre
50 las macromoléculas dispersas y el líquido. Algunos geles monofásicos se preparan a partir de macromoléculas sintéticas (por ejemplo carbómeros) o a partir de gomas naturales (por ejemplo tragacanto). Los geles monofásicos generalmente pueden ser acuosos, pero también se prepararán usando alcoholes y aceites. Los geles de dos fases consisten en una red de pequeñas partículas discretas. Los geles también se pueden clasificar como hidrófobos o hidrófilos. La base de un gel hidrófobo puede consistir en una parafina líquida con polietileno o aceites grasos gelificados con sílice coloidal o jabones de aluminio o zinc. Por el contrario, la base de los geles hidrófilos normalmente consiste en agua, glicerol o propilenglicol gelificado con un agente gelificante adecuado (por ejemplo tragacanto, almidón, derivados de celulosa, polímeros carboxivinilo y silicatos de magnesio y aluminio). La reología de las
55

composiciones aquí descritas es pseudoplástica, plástica, tixotrópica o dilatante. La formulación de viscosidad mejorada aceptable para el oído aquí descrita puede no ser líquida a temperatura ambiente. La formulación de viscosidad mejorada puede caracterizarse por una transición de fase entre temperatura ambiente y temperatura corporal. En algunas realizaciones, la transición de fase se produce a 1 °C por debajo de la temperatura corporal, a 2 °C por debajo de la temperatura corporal, a 3 °C por debajo de la temperatura corporal, a 4 °C por debajo de la temperatura corporal, a 6 °C por debajo de la temperatura corporal, a 8 °C por debajo de la temperatura corporal, o a 10 °C por debajo de la temperatura corporal.

La composición farmacéutica según la presente invención comprende, como un agente activo, un compuesto tal como se define en la reivindicación 1, que preferentemente modula la actividad y/o la expresión de NKCC1, en particular antagonizando su actividad y/o expresión. Debido a ese efecto antagonista sobre NKCC1, la composición farmacéutica según la presente invención aumentará preferiblemente la actividad y/o expresión de KCC2. Ese aumento de la actividad y/o expresión de KCC2 es por tanto un efecto indirecto del compuesto antagonista de NKCC1 de la invención.

En una realización preferente, la composición farmacéutica según la presente invención comprende además, como un agente activo adicional, un agonista GABAérgico y/o un agonista de glicina. En este caso, el compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 de acuerdo con la presente invención se usa en el tratamiento o la prevención del tinnitus agudo o crónico junto con uno o más agentes GABAérgicos y/o uno o más agonistas de glicina. Tal combinación puede proporcionarse como una terapia de combinación (administrando el antagonista de NKCC1 y otros agentes activos por separado) o puede formularse mediante una única formulación proporcionada aquí como una composición farmacéutica. En caso de que los agentes se formulen por separado, se pueden proporcionar como un kit junto con un folleto informativo sobre la terapia. La administración de los agentes de la terapia de combinación se puede llevar a cabo simultáneamente, preferiblemente posteriormente, según se define mediante un protocolo de tratamiento escalonado. La coadministración de un agonista de GABA y/o glicina junto con un compuesto antagonista de NKCC1 de acuerdo con la invención puede producir un efecto de tratamiento sinérgico, ya que el antagonista puede bloquear el efecto excitador del agonista.

Preferiblemente, el agonista GABAérgico o de glicina usado en tal composición farmacéutica de la invención o en tal terapia de combinación se selecciona del grupo consistente en midazolam, diazepam, flurazepam, oxazepam, nitrazepam, flunitrazepam, clonazepam, triazolam, clobazam y brotizolam, baclofeno, gamma-vinil-GABA, gamma-acetilén-GABA, progabida, muscimol, iboteno, valproato de sodio o tetrahidroisoxazopiridina (THIP).

La presente invención se refiere al uso en un método de tratamiento o prevención del tinnitus agudo o crónico, preferiblemente crónico, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 según la reivindicación 1 o de una composición farmacéutica según la reivindicación 10. El método de tratamiento o prevención del tinnitus agudo o crónico de acuerdo con la presente invención se refiere a la administración, de modo sistémico, de compuestos que disminuyen el nivel intracelular de cloruro en una estructura neurosensorial del sistema auditivo antagonizando NKCC1 para atenuar el tinnitus. Para lograr tal efecto, los compuestos antagonistas descritos pueden modular la función o expresión del cotransportador de cloruro NKCC1 en células ciliadas cocleares, neuronas de ganglios espirales, células satélites gliales u otras células gliales y neurales a lo largo de la vía auditiva. Como segundo efecto indirecto de estos compuestos, la inhibición de la actividad o expresión de NKCC1 puede resultar preferiblemente en una sobrerregulación de la activación y expresión de KCC2.

Los compuestos de la invención pueden administrarse eventualmente en combinación con otros compuestos que dependen de distintos mecanismos de acción, por ejemplo compuestos GABAérgicos o glicinérgicos como se ha descrito anteriormente.

También se describe un método de cribado para la identificación y caracterización de compuestos capaces de modular un cotransportador de cloruro, por ejemplo NKCC1 o KCC2, preferiblemente de antagonizar la actividad y/o expresión de NKCC1 y así aumentar la expresión y/o actividad de KCC2. Se puede llevar a cabo un método de cribado para la identificación de compuestos útiles en la presente descripción determinando la sub-regulación/pérdida de actividad de NKCC1 o, preferiblemente, determinando el aumento en la expresión y/o actividad de KCC2. Dicho ensayo para determinar el potencial inhibidor del compuesto de ensayo en por ejemplo la expresión/actividad de KCC2 puede incluir la selección de una molécula indicadora, por ejemplo un ion indicador radiactivo (por ejemplo $^{86}\text{Rb}^+$, Cs^+). Los indicadores pueden basarse en una etiqueta radiactiva o, preferiblemente, los cationes transportados a través de los canales pueden detectarse mediante un marcador de fluorescencia que se une a dicho catión. Dicho marcador de fluorescencia puede ser un tinte BTC-AM, donde la asociación del catión y el marcador de fluorescencia puede provocar un cambio de fluorescencia detectable. Tal catión que puede unirse a un tinte BTC-AM, puede ser, por ejemplo, Tl^+ . Así, dicho indicador puede emplearse para medir el flujo (por ejemplo del catión) (dentro y/o fuera de la célula), típicamente dentro de las celdas dentro de las células. El indicador catiónico debe seleccionarse de modo que es co-transportado a través de la membrana celular con Cl^- por la proteína cotransportadora de cloruro. En caso de medir la actividad del transportador de la capacidad del transportador bidireccional (por ejemplo para KCC2), la dirección de transporte depende del gradiente iónico existente. Añadiendo de forma exógena los cationes a la

suspensión celular, típicamente se mide el influjo (dentro de las células) mediante un formato de ensayo de este tipo, por ejemplo para KCC2.

Por consiguiente, la presente descripción proporciona un método de cribado para identificar y caracterizar compuestos capaces de modular uno o más transportadores de cloruro, (a) proporcionando células que expresan de manera estable el uno o más transportadores de cloruro, (b) añadiendo un compuesto de ensayo a las células, (c) añadiendo un catión transportador y (d) midiendo el transporte catiónico a través de la membrana celular.

Las células a emplear para tal ensayo pueden ser líneas celulares humanas (por ejemplo células HEK293), que preferiblemente expresan de forma estable KCC2 y/o NKCC1 humana recombinante de forma heteróloga.

En este sentido, las células se disponen típicamente en placas y el indicador se carga en las células. Las células pueden lavarse posteriormente, por ejemplo con un tampón de ensayo (por ejemplo tampón HEPES) y cargarse en el dispositivo de medida, por ejemplo un FLIPR (lector de placas de imágenes fluorimétricas). Los compuestos de ensayo candidatos a analizar se cargan posteriormente en las células, se incuban durante un período corto de tiempo (por ejemplo de 1 a 10 min) y entonces comienza la adquisición de datos añadiendo el catión, que normalmente está disuelto en, por ejemplo, un tampón de ensayo. Se puede emplear TINO_3 como sal que contiene Ti^+ como catión.

La lectura del transporte catiónico se lleva a cabo, por ejemplo, midiendo la señal de fluorescencia (por ejemplo con un dispositivo FLIPR). Las señales de emisión de fluorescencia se miden en tales condiciones durante típicamente 1 a 10 min. La tasa inicial de transporte, por ejemplo transporte de Ti^+ , se deduce típicamente del análisis del aumento lineal de las señales fluorescentes dentro de, por ejemplo, los primeros 30 s o, preferiblemente, 10 s después de la adición del catión. El análisis de datos puede llevarse a cabo mediante un cálculo basado en la señal medida (por ejemplo Ti^+ relativa) para velocidades de transporte iniciales como un porcentaje del control. En general, la medida da como resultado una curva que comienza con un fuerte aumento, seguida de una fase de aumento continuo más lento y generalmente termina en una fase de meseta. El cálculo de la actividad del transportador de canal puede medirse de forma fiable a partir de la velocidad inicial del transporte catiónico (fase lineal inicial del aumento de señal). La diferencia de la actividad del transportador tras la adición de los compuestos de ensayo candidatos (en comparación con una configuración del método sin la adición de un compuesto de ensayo candidato) puede determinarse (velocidad inicial mayor o menor de transporte del canal catiónico), pudiendo concluir si un compuesto puede clasificarse como modulador positivo o modulador inhibidor. También se puede evaluar la dependencia de la concentración del modulador.

El ensayo de cribado se puede llevar a cabo bloqueando canales específicos que interfieren potencialmente con el método de cribado debido a la actividad del cotransportador. Si, por ejemplo, debe evitarse la actividad de KCC2, el ensayo puede llevarse a cabo bloqueando (específicamente), por ejemplo, la actividad de KCC2. El bloqueo de la actividad de KCC2 se puede lograr añadiendo inhibidores de KCC2 al sistema de ensayo, por ejemplo furosemida o un ácido alcanoico DIOA.

Así, el método de cribado de la descripción puede incluir además una o más de las siguientes etapas: (i) provisión de células con expresión heteróloga de uno o más de los transportadores, (ii) adición adicional de un tinte de fluorescencia unido al catión transportador, (iii) medida de la velocidad de transporte de cationes inicial y (iv) bloqueo de la actividad del transportador que interfiere con otro transportador, por ejemplo añadiendo un inhibidor de ese otro transportador.

El método de cribado de la presente descripción puede comprender la etapa de determinar si un compuesto candidato es capaz de modular los niveles de cloruro intracelular en una célula modulando la actividad y/o expresión de uno o más cotransportadores de cloruro, y a su vez es útil para la prevención y el tratamiento del tinnitus.

El método de cribado de la presente descripción puede comprender analizar la expresión de un gen transportador de cloruro, por ejemplo KCC2, en presencia y ausencia de un compuesto de ensayo. Tal expresión génica puede medirse mediante la detección del correspondiente ARN o proteína o empleando un constructo reporter adecuado que comprende un elemento regulador de la transcripción, normalmente asociado a tal transportador de cloruro o gen KCC2, unido operativamente a un gen reporter. Los moduladores positivos de KCC2 pueden identificarse, por ejemplo, mediante un cribado de alto rendimiento, como lo propusieron Zhang et al., 2010, utilizando un ensayo de transporte de talio basado en fluorescencia con un lector de placas de imágenes fluorométricas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: muestra que el tinnitus que induce un trauma acústico (120 dB a 10 kHz durante 2 horas) conduce a una expresión reducida de KCC2 en las células ciliadas internas y las neuronas de los ganglios espirales de la rata.

A) Hibridación *in situ* de neuronas ganglionares espirales en el giro mediobasal de las cócleas. 14 días después de la exposición se observa una clara regulación negativa del ARNm de KCC2 en el animal expuesto al ruido (AT) (b). La comparación con el animal control expuesto de forma simulada se proporciona mediante (a).

B) Western Blot de KCC2. El primer carril muestra el tejido del hipocampo como control positivo con una banda clara a 140 kDa, que es KCC2. El segundo carril corresponde al tejido coclear de un animal control no expuesto, el tercer carril al tejido coclear de un animal expuesto al ruido 7 días después de la exposición. Se puede ver una clara regulación a la baja de la proteína KCC2 en el animal expuesto al ruido (carril derecho) en comparación con el animal de control.

Fig. 2: muestra que la sub-regulación de KCC2 en las células ciliadas internas de la rata y las neuronas del ganglio espiral del giro coclear medio basal 6 o 30 días después del trauma por ruido (120 dB a 10 kHz durante 1 hora respectivamente 1 .5 horas) es inherente a la fisiopatología del tinnitus y no relacionada con la pérdida auditiva.

A) Hibridación *in situ* de neuronas ganglionares espirales en el giro mediobasal de las cócleas. 6 días después del trauma por ruido, se observa una clara regulación negativa del ARNm de KCC2 en el animal que muestra un comportamiento de tinnitus (a) en comparación con el animal que no muestra un comportamiento de tinnitus (b). Se hace la misma observación 30 días después del trauma por ruido (c) y (d).

B) Recuento de sinapsis de la cinta de células ciliadas internas (como % de control) 2 semanas después de la exposición al ruido o simulada de cócleas de rata. Se observa una disminución significativa de las cintas en los oídos expuestos al ruido en los giros cocleares mediobasal (columnas medias) y basal (columnas derechas) en comparación con los animales expuestos al mismo ruido, pero sin mostrar una correlación con el tinnitus en el comportamiento.

Fig. 3: muestra que la administración local del inhibidor de NKCC1 bumetanida en cócleas de rata expuestas a traumatismos por ruido protege de la sub-regulación de KCC2 y atenúa la correlación morfológica del tinnitus.

A) PCR en tiempo real para la expresión de KCC2 en tejido coclear 2 semanas después del ruido (barra negra) o de la exposición simulada (barra gris clara) y tratamiento de cócleas de rata con AP o bumetanida. Las cócleas expuestas simuladas tratadas con perilinfa artificial (AP) sirvieron como control (barra blanca). Se utilizaron 18 ARNr y β -actina como genes housekeeping. Se observó una disminución estadísticamente significativa de KCC2 en los animales expuestos al ruido tratados con AP. No se observó tal sub-regulación de KCC2 en animales simulados o expuestos al ruido tratados con bumetanida. También hubo una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de KCC2 entre los animales expuestos al ruido tratados con AP o bumetanida.

B) Recuento de sinapsis de la cinta de las células ciliadas internas 2 semanas después de la exposición al ruido o simulada de la cóclea de rata. Se muestra el número de cintas por célula ciliada interna (IHC). Entre los oídos tratados con AP, se observó una disminución significativa de las cintas en los oídos expuestos al ruido en los giros cocleares mediobasales (columnas medias) y basales (columnas derechas) en comparación con los animales expuestos simuladamente. Por el contrario, la disminución de los oídos expuestos al ruido que recibieron bumetanida (barra negra) no fue significativa en comparación con los animales expuestos simuladamente (barra gris claro). Pero hubo una diferencia significativa en el número de cintas entre los oídos expuestos al ruido tratados con AP (barra gris oscuro) o bumetanida (barra negra). Los giros apicales (izquierda) no mostraron muchos cambios, ya que las células ciliadas internas apenas se ven afectadas por traumatismos de alta frecuencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Objetivo

El diurético de bucle furosemida se ha propuesto como tratamiento (reversible) del tinnitus. Se ha planteado la hipótesis de que atenúa la activación del nervio auditivo reduciendo el potencial endococlear (Risey et al., 1995). Sin embargo, el tinnitus al mismo tiempo también se conoce como un efecto secundario de la furosemida. Los inventores buscaron dilucidar si y, en caso afirmativo, cómo cambió la expresión de los cotransportadores de cloruro en la cóclea después de una agresión a la cóclea susceptible de inducir tinnitus con el fin de identificar puntos de partida para el desarrollo de una nueva farmacoterapia para el tinnitus.

Materiales y métodos

Se expusieron 13 ratas Wistar hembra adultas, anestesiadas durante 2 horas vía intraaural, a un tono continuo de 10 kHz a una intensidad de 120 dB SPL en una cabina de atenuación del sonido. Esta exposición es susceptible de inducir tinnitus en ratas (por ejemplo Tan et al., 2007). El estímulo acústico se calibró al nivel de la cabeza del animal. Se colocaron cuatro animales de control anestesiados en la cabina de atenuación del sonido durante el mismo tiempo, pero con el altavoz apagado. 14 días después de la exposición al sonido real o simulada, se sacrificaron los animales.

Se recogieron las cócleas y se fijaron por inmersión en paraformaldehído (PFA) al 2%, sacarosa 125 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 100 mM, pH 7,4, durante 2 horas. Se descalcificaron en un Rapid Bone Decalcifier (Eurobio, Les Ulis Cedex, Francia), seguido de incubación durante la noche en solución salina tamponada de Hanks con sacarosa al 25%. Al día siguiente, las cócleas se embebieron en el compuesto O.C.T. (Miles Laboratories, Elkhart, Indiana, EEUU). Antes de su uso, las muestras de tejido se criosectionaron a 10 µm de espesor para la hibridación *in situ*, así como para la inmunohistoquímica, se montaron en un portaobjetos de microscopio SuperFrost® plus y se almacenaron a -20 °C.

Para la inmunohistoquímica, los portaobjetos se secaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se permeabilizaron durante 3 minutos con PBS + Triton al 0,1%, se lavaron con PBS y se bloquearon con BSA/PBS al 1%. Los portaobjetos se incubaron durante la noche con anticuerpo primario diluido en BSA al 0,5%/PBS (KCC2 1:150, Upstate Biotechnology, Hamburgo, Alemania). Al día siguiente, los portaobjetos se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo secundario (Cy3-anti-conejo, Jackson Immuno Research, Suffolk, Reino Unido) durante 1 hora. Los portaobjetos se lavaron de nuevo y se montaron con Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). Los portaobjetos se observaron con un microscopio Olympus AX70.

Para la hibridación *in situ*, se incubaron los portaobjetos con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (1:750, Roche, Mannheim, Alemania). A continuación, se dejó que las secciones se desarrollaran en la solución de sustrato que contenía sal de tetrazolio azul nitro y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo (Sigma, Munich, Alemania). Las secciones se observaron en diferentes períodos de tiempo para controlar el desarrollo del sustrato en un producto coloreado. Las secciones de los controles y los animales expuestos se detuvieron al mismo tiempo, se montaron y se observaron usando un microscopio Olympus AX70.

Para el análisis Western Blot, las proteínas de cócleas de rata y tejido cerebral se separaron mediante electroforesis con gel de poliacrilamida SDS utilizando XCell Sure Lock Mini Cell y NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gels (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el inmunoblot, las proteínas (40 µg/carril) se transfirieron a membranas de transferencia de difluoruro de polivinilidina usando el módulo de transferencia Xcell II (Invitrogen). El anticuerpo KCC2 (Blaesse et al., 2006; proporcionado generosamente por HG Nothwang y E Friauf) se preincubó durante la noche a 4 °C en una dilución razonable. El anticuerpo unido se visualizó con el reactivo de detección de inmunotransferencia tipo Western Enhanced Chemiluminescence Plus (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania). Para la cuantificación, se realizó un análisis densitométrico utilizando el software Cell^F (Olympus, Hamburgo, Alemania). La intensidad de la banda de control y de la banda del tejido expuesto se midieron y compararon entre sí.

Resultados

Los animales expuestos a un ruido excesivo susceptible de inducir tinnitus mostraron una clara sub-regulación de KCC2 14 días después de la exposición al ruido (Fig. 1a). La inmunohistoquímica mostró una expresión notablemente reducida de la proteína KCC2 en las células ciliadas internas en comparación con los animales de control no expuestos. La hibridación *in situ* reveló también una clara sub-regulación del ARNm de KCC2 en las neuronas del ganglio espiral de las cócleas expuestas al ruido en comparación con las cócleas no expuestas. Los Western Blot mostraron una clara disminución de la proteína KCC2 en el tejido coclear de los animales expuestos al ruido en comparación con los animales de control (7,8 veces menor), como muestra la Figura 1b. Los resultados de este experimento demostraron por primera vez que KCC2 está sub-regulado después de una agresión coclear, tal como un trauma acústico. Si esta sub-regulación está relacionada con la pérdida de audición, el tinnitus o ambos, quedó por dilucidar como resultado de ese experimento. Por ello, se llevó a cabo el Ejemplo 2 para una aclaración adicional.

Ejemplo 2

Objetivo

El objetivo del segundo experimento era evaluar si la sub-regulación de KCC2 observada en el primer experimento estaba relacionada con la fisiopatología de la pérdida auditiva o con la del tinnitus o con ambas. Esta sub-regulación podría sugerir que la inducción de tinnitus por furosemida puede estar relacionada con su efecto conocido sobre KCC2, más que a través de su atenuación del potencial endococlear, como comúnmente se sospecha (por ejemplo Risey et al., 1995). Para ello, se utilizó un modelo de comportamiento tal como el descrito por Rüttiger et al., 2003, para discriminar entre animales con y sin tinnitus.

Materiales y métodos

Se entrenaron 36 ratas Wistar hembra adultas en una cámara de acondicionamiento para acceder activamente a un comedero líquido siempre que hubiera un sonido constante. Durante el silencio, no se daba ninguna recompensa. El acondicionamiento se completó cuando los animales realizaron más accesos al comedero de recompensa durante los períodos de sonido que durante los períodos de silencio.

El día 0, las ratas acondicionadas fueron anestesiadas y expuestas intraauralmente durante 1 hora (Grupo A; n = 18) o durante 1,5 horas (Grupo B; n = 18) a un tono continuo de 10 kHz a una intensidad de 120 dB SPL en una caja de atenuación de sonido. El estímulo acústico se calibró al nivel de la cabeza del animal. Todos los animales se dividieron en grupos correspondientes a su comportamiento frente al tinnitus: en el Grupo A, 5 animales exhibieron tinnitus, 10 no tinnitus y 3 murieron, mientras que en el Grupo B 5 animales desarrollaron tinnitus, 12 no tinnitus y 1 murió. Los animales del grupo A se sacrificaron 6 días después y los del grupo B 30 días después de la exposición al sonido real o simulada.

La preparación del tejido, la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Se contaron las sinapsis de la cinta de las células ciliares internas. Las secciones se visualizaron usando un microscopio Olympus AX70 equipado con iluminación de epifluorescencia (objetivo 100x, NA = 1.35) y un eje z motorizado. Las imágenes se adquirieron utilizando una cámara CCD y el software de imágenes Cell[^]F (OSIS GmbH, Münster, Alemania). Para Otoferlin y QBP2/RIB EYE, el recuento de manchas inmunopositivas en las cócleas crioseccionadas se realizó a través de imágenes a una distancia de 8 µm con la cobertura completa del núcleo IHC y más allá en una pila de imágenes a lo largo del eje z (pila z). Típicamente, las pilas z constaban de 30 capas con un incremento z de 0,276 µm, por cada capa se adquirió una imagen por fluorocromo. Las pilas z se desapilaron tridimensionalmente utilizando el módulo RIDE de Cell[^]F con el algoritmo Nearest Neighbour (OSIS GmbH, Münster, Alemania).

Resultados

Tanto en el Grupo A como en el Grupo B, KCC2 se sub-reguló notablemente 6 o 30 días después de la exposición al ruido en aquellos animales que mostraban la correlación conductual del tinnitus en comparación con los animales que no mostraban comportamiento tinnitus (como se muestra en la Figura 2a). La inmunohistoquímica muestra una expresión claramente reducida de la proteína KCC2 en las células ciliadas internas de los animales con tinnitus en comparación con los animales sin tinnitus. La hibridación *in situ* también revelaba una clara sub-regulación del ARNm de KCC2 en las neuronas de los ganglios espirales de los animales con tinnitus en comparación con las cócleas sin tinnitus. Además, las cintas IHC de animales con tinnitus con discapacidad auditiva se redujeron significativamente en los giros basal medio y basal en comparación con los animales sin tinnitus (n = 4 animales, p < 0,001 para ANOVA de dos vías y p < 0,02 para post-test bilateral del ensayo t de Student, ambas con α = 0,05) (ver Figura 2b).

En conclusión, los resultados del Ejemplo 2 demostraron por primera vez que la sub-regulación de KCC2 en las células ciliadas internas y las neuronas del ganglio espiral después de un trauma por ruido no está relacionada con la pérdida de audición, sino que más bien es inherente a la fisiopatología del tinnitus. Este hallazgo sugiere que la inducción del tinnitus por diuréticos tales como furosemida, que actúa sobre NKCC1 y KCC2, es probablemente resultado de la inhibición de KCC2, mientras que su efecto contrario se debe típicamente a su antagonismo de NKCC1 a diferentes concentraciones. Como consecuencia, una estrategia para el tratamiento del tinnitus consiste en sub-regular NKCC1 con el fin de reducir los niveles de Cl⁻ intracelular.

Ejemplo 3

Objetivo

El objetivo del tercer experimento era evaluar si la modulación farmacológica de los niveles de cloruro intracelular en la cóclea después de un trauma por ruido inductor de tinnitus puede suprimir el tinnitus. Dado que la bumetanida tiene una afinidad mucho mayor por NKCC1 que por KCC2 (Payne et al., 2003), su administración debería permitir reducir en vista de los hallazgos previos de la presente invención - los niveles intracelulares de Cl⁻ dado que el efecto inhibitor sobre NKCC1 predominaría sobre cualquier efecto inhibitor no deseado de KCC2.

Materiales y métodos

Se anestesiaron 20 ratas Wistar hembra adultas como se describió anteriormente para los experimentos anteriores. Primero, se realizaron mediciones de la respuesta auditiva del tronco encefálico (ABR). Como en el Experimento 2, luego se expusieron en una cabina de atenuación de sonido durante 1,5 horas a un tono continuo de 10 kHz a una intensidad de 120 dB SPL (Grupo A; n = 10) o se expusieron simuladamente en el mismo entorno (Grupo B ; n = 10).

Los animales se trataron bilateralmente inmediatamente después del trauma por ruido con perilina artificial (AP) o bumetanida (Sigma B3023, lote 027Ko988). Se preparó AP reciente de acuerdo con Guitton et al., 2003 (NaCl 140 mM, KCl 4 mM CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, glucosa 10 mM, HEPES 10 mM). Se preparó bumetanida (300 µM) como sigue: se diluyeron 50 mg de polvo de bumetanida en 6,87 ml de AP. Esta solución madre 20 mM se diluyó 1:66 en AP (15,1 5 µl de solución madre y 984,85 µl de AP). 5 animales del Grupo A y 5 animales del Grupo B recibieron AP

(10 animales en total) y 5 animales del Grupo A y 5 animales del Grupo B recibieron bumetanida (10 animales en total).

Para la administración local del tratamiento, se retiró el pelaje detrás de las orejas y se expuso la bulla en un abordaje retroauricular. Se taladró cuidadosamente un pequeño orificio en la bulla ósea justo encima del nicho de la ventana redonda (0,6-1 mm de diámetro). Se abrió la mucosa y la región alrededor de la ventana redonda se secó cuidadosamente de líquido. A través del orificio, se insertó un pequeño gránulo de espuma de gel (Gelita Tampon; Braun, Melsungen, Alemania) en el nicho de la ventana redonda. Se aplicaron 5-8 µl de solución de bumetanida o AP sobre la espuma de gel mediante una pipeta de precisión con puntas de carga de gel, evitando así burbujas de aire debajo del gel. La inspección visual mostró que el nicho estaba completamente lleno y cubierto con el gel. A continuación, se cubrió el orificio de la bulla desde el exterior con tejido muscular y se suturó la herida con hilo quirúrgico (Vicryl, Johnson & Johnson, Norderstedt, Alemania). Después de la operación, los animales se mantuvieron calientes con control de la temperatura corporal hasta el despertar.

Para las medidas de ABR, solo se administró Dormitor como anestésico. 15 minutos antes de la cirugía, se administró además fentanilo vía subcutánea (s.c). Después de la cirugía, se administró Rimadyl s.c. como analgésico. Después de dejar dormir a los animales durante varias horas, el efecto del Dormitor fue antagonizado por Antisedan s.c.

Se aisló ARN total tal como se describió anteriormente (Tan et al., 2007) utilizando el Mini Kit Qiagen Rneasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Brevemente, se lisó el tejido usando tampón de lisado mezclado con β-mercaptoetanol. Después de tres etapas de congelación, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se guardó para otras etapas de limpieza con tampón de lavado. El ARN se eluyó en 40 µl de agua libre de RNasa. El ARN total se transcribió en ADNc como se había descrito anteriormente (Tan et al., 2007) utilizando el kit Sensiscript RT (Qiagen). Brevemente, se incubaron 50 ng de ARN durante 10 minutos a 65 °C con agua libre de RNasa y cebadores Oligo dT 15. Después de añadir RNasin y la enzima Sensiscript, las muestras se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Para la reacción PCR en tiempo real se utilizaron 12,5 µl de SYBRGreen (QuantiFast Sybr Green, Qiagen), 1 µl de mezcla de cebadores, 7,5 µl de ddH₂O y 4 µl de ADNc por pocillo. Todas las muestras se procesaron por triplicado para cada cebador utilizado, así como para el control negativo (sin ADNc añadido). Se usaron 18S ARNr y β-actina como genes housekeeping.

La inmunohistoquímica se llevó a cabo como se describió anteriormente. Las sinapsis de la cinta de las células ciliadas internas se contaron como en el Experimento 2.

Los ABR se registraron en animales anestesiados como se describió anteriormente (Knipper et al., 2000, Schimmang et al., 2003). Brevemente, las respuestas eléctricas del tronco encefálico al clic en campo libre (100 µs) y al estímulo acústico de tono puro (3 ms, rampa de 1 ms) se registraron con electrodos de alambre de plata subdérmicos en la oreja, el vértice y el lomo del animal. Después de la amplificación (x 100.000), las señales se promediaron para 64-256 repeticiones a cada presión sonora presentada (0-100 dB SPL en pasos de 5 dB). El umbral fue determinado por la presión sonora más baja que produjo potenciales visualmente distintos del nivel de ruido. Los puntos de medición de ABR estaban justo antes del ruido, respectivamente, del trauma simulado, justo después del tratamiento, 1, 2, 7 y 15 días después del tratamiento.

Resultados

La PCR en tiempo real para KCC2 de la muestra de tejido coclear 15 días después del tratamiento no muestra diferencias en los oídos expuestos simuladamente (Grupo B), independientemente de si fueron tratados con AP o bumetanida. Sin embargo, en los oídos expuestos al ruido (Grupo A), se observó una sub-regulación estadísticamente significativa de KCC2 en los oídos tratados con AP en comparación con los que solo estaban expuestos de forma simulada (prueba t de Student bilateral p <0,05), pero no en los oídos tratados con bumetanida. La expresión de KCC2 en los oídos tratados con bumetanida expuestos al ruido fue similar al nivel en los oídos expuestos simuladamente, pero estadísticamente significativamente diferente de los oídos tratados con AP expuestos al ruido (p <0,01) (ver Figura 3a).

Se observó un resultado sorprendentemente similar al contar las sinapsis en la cinta de las células ciliadas internas (ver Figura 3b). Entre los oídos tratados con AP, se observó una disminución significativa de las cintas en los oídos expuestos al ruido en los giros cocleares basal medio y basal en comparación con los animales expuestos simuladamente (p <0,01). Por el contrario, la disminución de los oídos expuestos al ruido que recibieron bumetanida no fue significativa en comparación con los animales expuestos de forma simulada. Pero hubo una diferencia significativa en el número de cintas entre los oídos expuestos al ruido tratados con AP o bumetanida (p < 0,02). Los giros apicales no mostraron muchos cambios, ya que las células ciliadas internas apenas se ven afectadas por traumatismos de alta frecuencia.

En resumen, estos resultados demuestran por primera vez que la modulación farmacológica de la concentración de Cl⁻ intracelular en las células ciliadas internas es factible y que la sobre-regulación de la expresión de KCC2 en las

células ciliadas internas se puede lograr inhibiendo NKCC1. Dicha inhibición es ejercida por antagonistas de NKCC1 que, sin embargo, no ejercen ningún efecto directo sobre el aumento de la actividad o expresión de KCC2. Más bien, el efecto está mediado por la inhibición de NKCC1, que, como tal, ejerce cierta influencia sobre la actividad o expresión de KCC2, es decir, un aumento. La aplicación del inhibidor de NKCC1 bumetanida resulta en una reducción de la pérdida de las cintas de las células ciliadas internas. Como biomarcador de la presencia de tinnitus, esto demuestra que esta estrategia terapéutica permite la atenuación o la supresión del tinnitus.

LITERATURA

- Asiedu M, Ossipov MH, Kaila K, Price TJ (2010), Acetazolamide and midazolam act synergistically to inhibit neuropathic pain, *Pain* 148(2): 302-308.
- 10 Balakrishnan V, Becker M, Löhre HG, Güresir E, Friauf E (2003), Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem, *Journal of Neuroscience* 23:4134-4145.
- Blaesse P, Guillemain I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG (2006), Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission, *Journal of Neuroscience* 26(41):10407-10419.
- 15 Blaesse P, Airaksinen, Rivera C, Kaila K (2009), Cation-chloride co-transporters and neuronal function, *Neuron* 61, 820-838.
- Coull J, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005), BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain, *Nature* 438(7070): 1017-1021
- Dobie R (2004b), Clinical trials and drug therapy for tinnitus, in: *Tinnitus - theory and management*, Snow JB (ed.), BC Decker, Hamilton - London: 266-277.
- 20 Eggermont JJ, Roberts LE (2004), The neuroscience of tinnitus, *Trends in Neurosciences* 27(11), 676-682.
- Estévez R, Boettger T, Stein V, Birkenhäger R, Otto E, Hildebrandt F, Jentsch TJ (2001), Barttin is a Cl-channel beta-subunit crucial for renal Cl-reabsorption and inner ear K⁺ secretion. *Nature* 414(6863): 558-561.
- Gagnon KBE, England R, Delpire E (2006), Characterization of SPAK and OSR1, regulatory kinases of the Na-K-2Cl Co-transporter, *Molecular and Cellular Biology* 26(2): 689-698. Haas M (1994), The Na-K-Cl cotransporters, *American Journal of Physiology* 267: C869-C885.
- 25 Huberfeld G, Wittner L, Clemenceau S, Baulac M, Kaila K, Miles R, Rivera C (2007), Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy, *Journal of Neuroscience* 27(37): 9866-9873.
- Kahle KT, Rinehart J, de Los Heros P, Louvi A, Meade P, Vazquez N, Hebert SC, Gamba G, Gimenez I, Lifton RP (2005), WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102(46): 16783-16788.
- 30 Langguth B, Salvi R, Elgoyhen AB (2009), Emerging pharmacotherapy of tinnitus, *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 15(7-8): 300-305.
- Lauf PK, Adragna NC (2000), K-Cl cotransport: properties and molecular mechanism, *Cell Physiol Biochem*. 10(5-6): 341-354.
- 35 Lee HH, Walker JA, Williams JR, Goodier RJ, Payne JA, Moss SJ (2007), Direct protein kinase C-dependent phosphorylation regulates the cell surface stability and activity of the potassium chloride co-transporter KCC2, *Journal of Biological Chemistry* 282(41): 29777-29784.
- Lenart B, Kintner DB, Shull GE, Sun D (2004), Na-K-Cl cotransporter-mediated intracellular Na⁺ accumulation affects Ca²⁺ signaling in astrocytes in an in vitro ischemic model, *Journal of Neuroscience* 24(43): 9585-9597.
- 40 Menkes DB, Larson PM (1998), Sodium valproate for tinnitus, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 65(5): 803.
- Okamura HO, Sugai N, Suzuki K, Ohtani I (1996), Enzyme-histochemical localization of carbonic anhydrase in the inner ear of the guinea pig and several improvements of the technique, *Histochemistry and Cell Biology* 106(4):425-430.
- 45 Panford-Walsh R, Singer W, Rüttiger L, Hadjab S, Tan J, Geisler HS, Zimmermann U, Köpschall I, Rohbock K, Vieljans A, Oestreicher E, Knipper M (2008), Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic

factor and arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity, *Molecular Pharmacology* 74(3): 595-604.

Payne JA (1997), Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl co-transporter: implications for [K⁺]_o regulation, *American Journal of Physiology* 273(5 Pt 1): C1516-1525.

- 5 Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K (2003), Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma, *Trends in Neurosciences* 26(4): 199-206.

Piccirillo JF, Finnell J, Vlahiotis A, Chole RA, Spitznagel E (2007), Relief of idiopathic subjective tinnitus: is gabapentin effective? *Archives of Otolaryngology - Head & Neck Surgery* 133(4): 390-397.

- 10 Rivera C, Li H, Thomas-Crusells J, Lahtinen H, Viitanen T, Nanobashvili A, Kokaia Z, Airaksinen MS, Voipio J, Kaila K, Saarma M (2002), BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻co-transporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion, *Journal of Cell Biology* 159(5): 747-752.

Risey JA, Guth PS, Amedee RG (1995), Furosemide distinguishes central and peripheral tinnitus, *International Tinnitus Journal* 1: 99-103.

- 15 Rüttiger L, Ciuffani J, Zenner HP, Knipper M (2003), A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hearing Research* 180(1-2): 39-50.

Shulman A, Strashun A, Goldstein B (2002), GABAA-benzodiazepine-chloride receptor-targeted therapy for tinnitus control: preliminary report, *International Tinnitus Journal* 8: 30-36.

Staley KJ (2002), Diuretics as antiepileptic drugs: should we go with the flow?, *Epilepsy Currents* 2(2): 35-38.

- 20 Tan J, Rüttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, Hadjab S, Zimmermann U, Köpschall I, Rohbock K, Knipper M (2007), Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1 in auditory neurons following acoustic trauma, *Journal of Neuroscience* 145: 715-726.

Vale C, Caminos E, Martinez-Galán JR, Juiz JM (2005), Expression and developmental regulation of the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus, *Hearing Research* 206(1-2): 107-115.

- 25 Verdel BM, van Puijenbroek EP, Souverein PC, Leufkens HG, Egberts AC (2008), Drug-related nephrotoxic and ototoxic reactions: a link through a predictive mechanistic commonality, *Drug Safety* 31 (10): 877-884.

Wangemann P (2008), Cochlear homeostasis and homeostatic disorders, in: *Auditory trauma, protection, and repair*, Schacht J, Popper AN, Ray RR (eds.), Springer Handbook of Auditory Research 31, Springer, New York: 49-100.

Wenz M, Hartmann AM, Friauf E, Nothwang HG (2009), CIP1 is an activator of the K⁺-Cl⁻co-transporter KCC2, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 381 (3): 388-392.

- 30 Westerberg BD, Roberson JB, Stach BA (1996), A double-blind placebo-controlled trial of baclofen in the treatment of tinnitus, *American Journal of Otolaryngology* 17(6): 896-903.

Yang K, Huang ZW, Huang J, Zhang XJ, Xiao BK (2008), Expression of the neuron-specific potassium chloride cotransporter KCC2 in adult rat cochlea, *Neuroscience Letters* 441(2): 205-209.

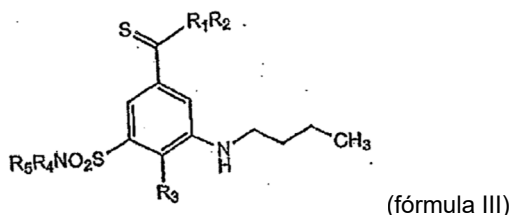
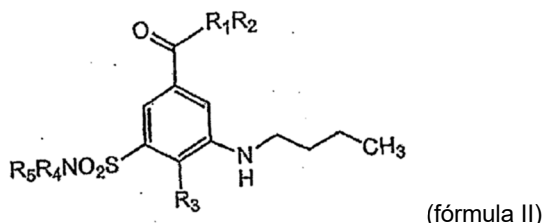
- 35 Zhang D, Gopalakrishnan SM, Freiberg G, Surowy CS (2010), A thallium transport FLIPR-based assay for the identification of KCC2-positive modulators, *Journal of Biomolecular Screening* 15(2): 177-184.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que modula el cotransportador de cloruro de sodio y potasio cotransportador 1 (NKCC1) para su uso en el tratamiento o prevención del tinnitus,

donde el compuesto se administra sistémicamente mediante una forma de dosis oral y donde el compuesto es:

- 5 i) Un compuesto según la fórmula II o la fórmula III siguientes:



un isómero o entantiómero de los mismos

o una sal, solvato, tautómero o hidrato farmacéuticamente aceptable de los mismos, donde

- 10 R1 no está presente, H, O o S;

- R2 no está presente, H, o, cuando R1 es O o S, R2 se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, alquilo, aralquilo, arilo, alquilaminodialquilo, alquilcarbonilaminodialquilo, alquiloxicarbonilalquilo, alquilcarboniloxialquilo, alquil aldehído, alquilocetoalquilo, alquilamida, alcarilamida, arilamida, un grupo alquilamonio, ácido alquilcarboxílico, alquilheteroarilo, alquilhidroxilo, un polímero biocompatible tal como alquiloxi(polialquiloxi)alquilhidroxilo, un glicol (PEG), un polietilen glicol éster (éster PEG) y un polietilen glicol éter (éter PEG), metiloxialquilo, metiloxialcarilo, metiltioalquilo y metiltioalcarilo, no sustituido o sustituido, y cuando R1 no está presente, R2 se selecciona del grupo consistente en hidrógeno, N,N-dialquilamino, N,N-dialcarilamino, N,N-diarilamino, N-alquil-N-alcarilamino, N-alquil-N-arilamino, N-alcaril-N-arilamino, no sustituido o sustituido;

- 20 R3 se selecciona del grupo consistente en arilo, halo, hidroxilo, alcoxi y ariloxi, no sustituido o sustituido; y

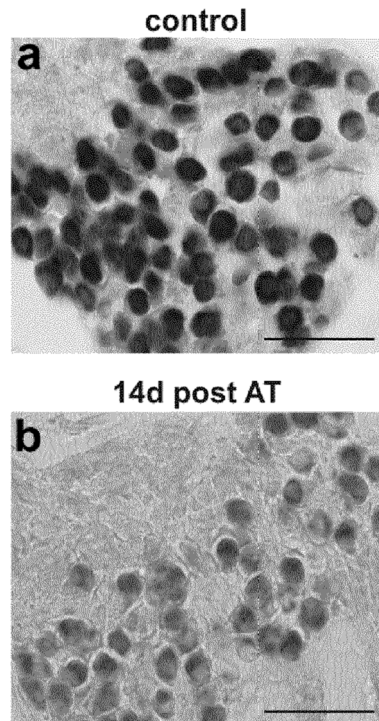
R4 y R5 se seleccionan, independientemente entre sí, del grupo consistente en hidrógeno, alquilaminodialquilo, carbonilalquilo, carbonilalcarilo, carbonilarilo, y sales de los mismos, tales como sales de sodio, potasio, calcio, amonio, trialkilammonio y tetraalkilammonio o

- 25 ii) Se selecciona del grupo consistente en bumetanida, bumetanida aldehído, bumetanida metil éster, bumetanida cianometil éster, bumetanida etil éster, bumetanida isoamil éster, bumetanida octil éster, bumetanida bencil éster, bumetanida dibencilamida, bumetanida dietilamida, bumetanida morfolinoetil éster, bumetanida 3-(dimetilaminopropil) éster, bumetanida N,N-dietilglicolamido éster, bumetanida N,N-dimetilglicolamido éster, bumetanida pivaxetil éster, bumetanida propaxetil éster, bumetanida metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil éster, sal benciltrimetilamónica de bumetanida y sal ceciltrimetilamónica de bumetanida, bumetanida tioácido $[-(C=O)-SH]$, bumetanida S-metil tioéster, bumetanida S-cianometil tioéster, bumetanida S-etil tioéster, bumetanida S-isoamil tioéster, bumetanida S-octil tioéster, bumetanida S-bencil tioéster, bumetanida S-(mordolinoetil) tioéster, bumetanida S-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, bumetanida S-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, bumetanida S-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, bumetanida S-pivaxetil tioéster, bumetanida S-propaxetil tioéster, bumetanida S-[metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil] tioéster, sal benciltrimetilamónica de tioácido de bumetanida $[-(C=O)-S^-]$ y sal ceciltrimetilamónica de tioácido de bumetanida $[-(C=O)-S^-]$, tioácido metastable de bumetanida $[-(C=S)-OH]$, bumetanida O-metil tioéster, bumetanida O-cianometil tioéster, bumetanida O-etil tioéster, bumetanida O-isoamil tioéster, bumetanida O-octil tioéster, bumetanida O-bencil tioéster, bumetanida O-(morfolinoetil) tioéster, bumetanida O-[3-(dimetilaminopropil)] tioéster, bumetanida O-(N,N-dietilglicolamido) tioéster, bumetanida O-(N,N-dimetilglicolamido) tioéster, bumetanida O-pivaxetil tioéster, bumetanida O-propaxetil tioéster, bumetanida O-[metoxi(polietilenoxi)_{n-1}-etil] tioéster, sal benciltrimetilamónica de tioácido de

- 5 bumetanida $[-(C=S)-O^-]$ y sal cetiltrimetilamónica de tioácido de bumetanida $[-(C=S)-O^-]$, bumetanida tioaldehído, bumetanida ditioácido $[-(C=S)-SH]$, bumetanida metil ditioéster, bumetanida cianometil ditioéster, bumetanida etil ditioéster, bumetanida isoamil ditioéster, bumetanida octil ditioéster, bumetanida bencil ditioéster, bumetanida dibenciltioamida, bumetanida dietiltioamida, bumetanida morfolinoetil ditioéster, bumetanida 3-(dimetilaminopropil) ditioéster, bumetanida N,N-dietilglicolamido ditioéster, bumetanida N,N-dimetilglicolamido ditioéster, bumetanida pivaxetil ditioéster, bumetanida propaxetil ditioéster, bumetanida metoxi(polietileno x_i) $_{n-1}$ -etil ditioéster, sal benciltrimetilamónica de ditioácido de bumetanida and sal cetiltrimetilamónica de ditioácido de bumetanida.
- 10 2. Compuesto para uso según la reivindicación 1, donde el compuesto antagoniza NKCC1.
3. Compuesto para uso según la reivindicación 1 o 2, donde el compuesto antagoniza la función de NKCC1 disminuyendo o inhibiendo su actividad y/o expresión.
4. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la actividad y/o expresión de KCC2 aumenta por el antagonismo de NKCC1.
- 15 5. Compuesto para uso según la reivindicación 3, donde el compuesto disminuye la actividad y/o la expresión de NKCC1 y aumenta la actividad y/o la expresión de KCC2.
6. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el compuesto se selecciona del grupo consistente en bumetanida morfolinoetil éster, bumetanida dietilamida y sal cetiltrimetilamónica de bumetanida.
- 20 7. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el compuesto se emplea en combinación con uno o más inhibidores de la anhidrasa carbónica, en particular acetozomalida, diclorofenamida, dorzolamida, brinzolamida y/o metazolamida.
8. Compuesto para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el compuesto se emplea en combinación con uno o más agonistas GABAérgicos y/o uno o más agonistas de glicina, en un protocolo de cotratamiento tanto simultáneo como en un protocolo de régimen escalonado.
- 25 9. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el compuesto es para su uso en el tratamiento o la prevención del tinnitus crónico o agudo.
10. Composición farmacéutica que comprende un compuesto que modula el cotransportador de cloruro NKCC1 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento o la prevención del tinnitus, donde la composición farmacéutica se administra sistémicamente mediante una forma de dosis oral.
- 30 11. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, que comprende además uno o más inhibidores de la anhidrasa carbónica y/o agonistas GABAérgicos y/o agonistas de glicina.
12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10 u 11, donde la composición farmacéutica se proporciona en forma líquida, semilíquida o viscosa, preferiblemente en una forma tipo gel.
- 35 13. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la composición contiene un polímero, preferiblemente biodegradable, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en ácido hialurónico resp. hialuronatos, geles de lecitina, derivados de (poli)alanina, pluronics, poli(etilenglicol), poloxámeros, quitosanos, xiloglucanos, colágenos, fibrinas, poliésteres, poli(lactidas), poli(glicólido) o sus copolímeros PLGA, acetato-isobutirato de sacarosa y monooleato de glicerol.
- 40 14. Composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la composición farmacéutica es para su uso en el tratamiento o la prevención del tinnitus agudo o crónico.
15. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el tratamiento comprende además la administración de un inhibidor de la anhidrasa carbónica y/o de un agonista GABAérgico y/o de un agonista de glicina.

Figura 1

A) Hibridación *in situ* de neuronas ganglionares espirales en el giro mediobasal de las cócleas



B) Western Blot de KCC2

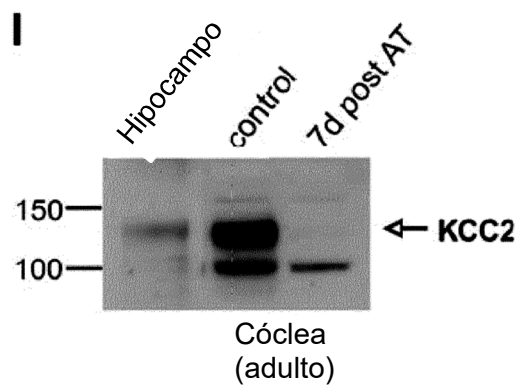
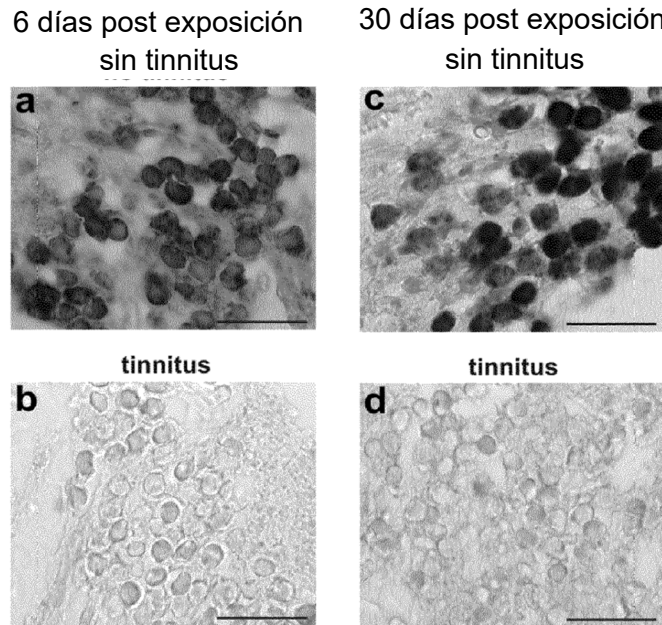


Figura 2

A) Hibridación *in situ* de neuronas ganglionares espirales en el giro mediobasal de las cócleas



Escala barra: 50 μ m

B) Recuento de sinapsis de la cinta de células ciliadas internas

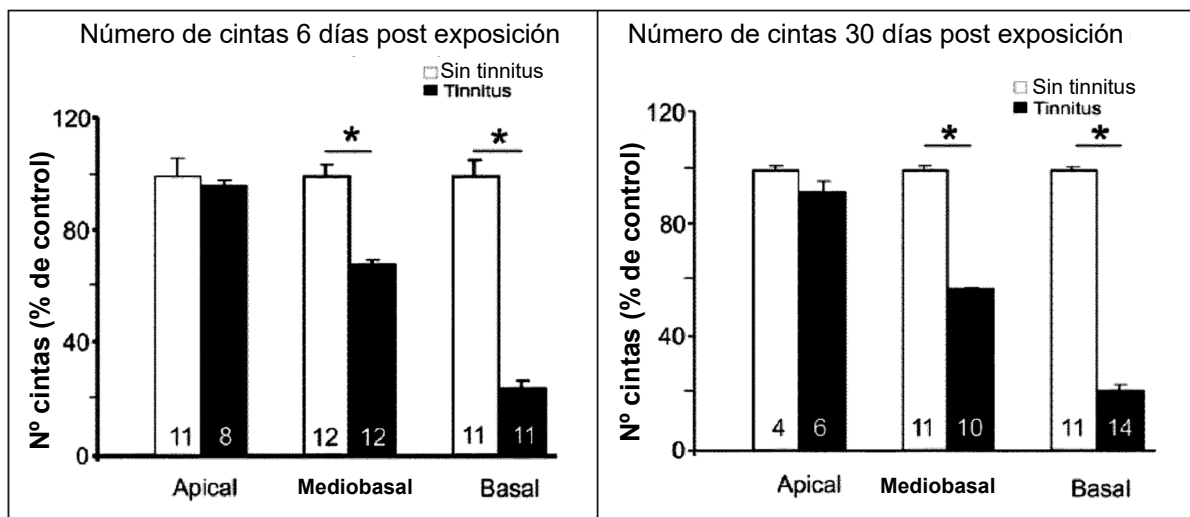
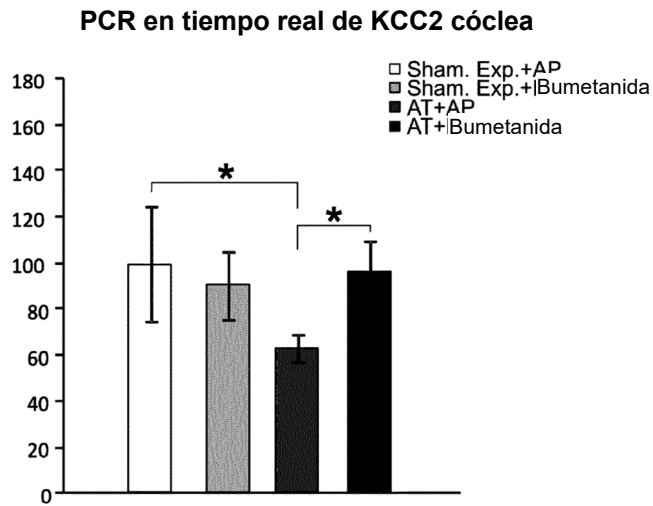


Figura 3

A) PCR en tiempo real de KCC2 de tejido coclear



B) Recuento sinapsis cintas células ciliadas

