

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2003.01.03	(73) Titular(es): SOUND PHARMACEUTICALS INCORPORATED 4010 STONE WAY N., SUITE 120 SEATTLE, WA 98103 US
(30) Prioridade(s): 2002.01.04 US 345813 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.11.03	
(45) Data e BPI da concessão: 2014.07.02 172/2014	(72) Inventor(es): JONATHAN KIL US ERIC D. LYNCH US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA PERDA DE AUDIÇÃO**

(57) Resumo:

NUM ASPETO, A PRESENTE INVENÇÃO CONFERE COMPOSIÇÕES OTOPROTETORAS ÚTEIS PARA MELHORAMENTO DA PERDA DE AUDIÇÃO. EM ALGUMAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, AS COMPOSIÇÕES OTOPROTETORAS INCLUEM PELO MENOS UM MÍMICO DA GLUTATIONA PEROXIDASE. EM ALGUMAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, AS COMPOSIÇÕES OTOPROTETORAS INCLUEM PELO MENOS UM MÍMICO DA GLUTATIONA PEROXIDASE E PELO MENOS UM OTOPROTETOR SELECIONADO A PARTIR DO GRUPO CONSISTIDO POR UM INIBIDOR DA XANTINA OXIDASE E UMA GLUTATIONA OU PRECURSOR DE GLUTATIONA. EM ALGUMAS FORMAS DE REALIZAÇÃO, AS COMPOSIÇÕES OTOPROTETORAS INCLUEM PELO MENOS UM MÍMICO DA GLUTATIONA PEROXIDASE, PELO MENOS, UM INIBIDOR DA XANTINA OXIDASE, PELO MENOS UMA GLUTATIONA OU UM PRECURSOR DE GLUTATIONA. EM OUTRO ASPETO, A PRESENTE INVENÇÃO CONFERE MÉTODOS PARA MELHORAR A PERDA DE AUDIÇÃO, ATRAVÉS DA ADMINISTRAÇÃO A UM SUJEITO DE UMA QUANTIDADE DE UMA COMPOSIÇÃO OTOPROTETORA QUE É EFICAZ NO MELHORAMENTO DA PERDA DE AUDIÇÃO.

RESUMO**"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA PERDA DE AUDIÇÃO"**

Num aspeto, a presente invenção confere composições otoprotetoras úteis para melhoramento da perda de audição. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mímico da glutathione peroxidase. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mímico da glutathione peroxidase e pelo menos um otoprotetor selecionado a partir do grupo consistido por um inibidor da xantina oxidase e uma glutathione ou precursor de glutathione. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mímico da glutathione peroxidase, pelo menos, um inibidor da xantina oxidase, pelo menos uma glutathione ou um precursor de glutathione. Em outro aspeto, a presente invenção confere métodos para melhorar a perda de audição, através da administração a um sujeito de uma quantidade de uma composição otoprotetora que é eficaz no melhoramento da perda de audição.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DA PERDA DE AUDIÇÃO"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é destinada a composições para o tratamento e prevenção da perda de audição induzida através do ruído.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Uma das principais causas da perda de audição adquirida é o ruído elevado. A exposição a níveis de ruído prejudiciais é comum no local de trabalho. O National Institute for Occupational Safety and Health (Instituto Nacional de Segurança e Saúde no Trabalho dos E.U.A.) estima que cerca de 30 milhões de trabalhadores nos Estados Unidos encontrem níveis de ruído perigosos. (Franks et al. (1996) Preventing Occupational Hearing Loss - A Practical Guide, DHHA (NIOSH) Publicação N°. 96 - 110, pg.1). Estes níveis são encontrados, por exemplo, na construção, exploração mineira, agricultura, indústria e serviços, transportes, e nas forças armadas. A incidência de ruído associada à perda de audição continua a aumentar, apesar dos esforços para regular a exposição ao ruído relacionada com o trabalho, e para melhorar a utilização de protetores auricular, tais como abafadores de ruído e tampões para os ouvidos.

Outra causa da perda de audição é a exposição a medicamentos ototóxicos, tais como cisplatina e antibióticos aminoglicosídicos. Desse modo, existe uma necessidade para métodos e composições para prevenir ou tratar a perda de audição.

Rybak e outros (American Journal of Otology, vol. 21 n° 4, 2000, páginas 513 - 520, "Effect of protective agents

against cisplatin ototoxicity") descrevem a utilização de ebselen para proteção contra a ototoxicidade da cisplatina.

O documento US6177434 divulga a utilização de agentes que aumentam as defesas antioxidantes do ouvido interno, tais como agonistas de adenosina ou agentes de regulação e/ou agentes que aumentam os níveis de glutathione do ouvido interno de forma a prevenir ou reverter a perda de audição induzida pelo ruído ou toxinas.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num aspeto, a presente invenção confere composições para utilização em métodos para melhorar a perda de audição induzida pelo ruído, em que cada um dos métodos inclui o passo de administração a um sujeito de uma quantidade de uma composição otoprotetora que é eficaz na melhoria da perda de audição. A composição otoprotetora inclui pelo menos ebselen. Em algumas formas de realização, a composição otoprotetora inclui uma quantidade farmacologicamente eficaz de, pelo menos, um mimico da glutathione peroxidase que é ebselen. Em algumas formas de realização, a composição otoprotetora inclui uma quantidade farmacologicamente eficaz de (a) pelo menos, um mimico da glutathione peroxidase que é ebselen e (b) pelo menos um inibidor da xantina oxidase (por exemplo, uma composição que inclui ebselen e alopurinol). Em algumas formas de realização, a composição otoprotetora inclui uma quantidade farmacologicamente eficaz de (a) pelo menos, um mimico da glutathione peroxidase que é ebselen e (b) pelo menos uma glutathione ou precursor de glutathione (por exemplo, uma composição que inclui ebselen e N-acetil-cisteína).

Em algumas formas de realização, a composição otoprotetora inclui uma quantidade farmacologicamente eficaz de (a) pelo menos, um mimico da glutathione peroxidase que é ebselen e

(b) pelo menos um inibidor da xantina oxidase, e (c) pelo menos uma glutathione ou precursor de glutathione (por exemplo, uma composição que inclui ebselen e N-acetil-cisteína).

Outro aspecto da presente invenção confere composições otoprotetoras úteis para melhoria da perda de audição induzida pelo ruído. As composições otoprotetoras incluem pelo menos ebselen. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mimico da glutathione peroxidase, que é ebselen. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mimico da glutathione peroxidase, que é ebselen e pelo menos um inibidor da xantina oxidase. Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mimico da glutathione peroxidase, que é ebselen e pelo menos uma glutathione ou precursor de glutathione.

Em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras incluem pelo menos um mimico da glutathione peroxidase que é ebselen, pelo menos um inibidor da xantina oxidase, e pelo menos uma glutathione ou precursor de glutathione.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Os aspectos anteriores e muitas das vantagens associadas a esta invenção serão mais facilmente apreciadas assim que a mesma seja melhor compreendida tendo como referência a seguinte descrição detalhada, quando feita em conjunto com os desenhos em anexo, em que:

A FIGURA 1 mostra um gráfico que compara as alterações dos limiares da audiometria evocada do tronco encefálico (ABR) testada com um clique estímulo de 4 - 16 kHz 1 dia, 1 semana, 2 semanas, e 3 semanas depois da exposição de ratos de controlo (A), ratos tratados com

N-acetil-cisteína (B), e ratos tratados com ebselen (C) com ruído de 115 dB, a 4 - 16 kHz durante 4 horas. A diferença das alterações nos limiares da audição entre o controlo e os ratos tratados com ebselen foi altamente significativa em 1 dia, 1 semana e 2 semanas depois da exposição ao ruído ($p < 0,01$) e significativa 3 semanas depois da exposição ao ruído ($p < 0,05$). A diferença nas alterações dos limiares da audição entre o controlo e os ratos tratados com N-acetil-cisteína foi significativa em todos os momentos depois da exposição ao ruído ($p < 0,05$). As alterações dos limiares da audição da linha de base foram medidas em intervalos de 5 dB.

A FIGURA 2 mostra um gráfico que compara as alterações dos limiares da ABR testada com um clique estímulo a 4 - 16 kHz, e estímulos nas frequências de 4 kHz, 8 kHz, 12 kHz e 16 kHz, 3 semanas depois da exposição de ratos de controlo (A), ratos tratados com 16 mg/kg de ebselen (B), ratos tratados com 16 mg/kg de alopurinol (C), e ratos tratados com 8 mg/kg de ebselen/alopurinol (D) ruído de 115 dB, a 4 - 16 kHz durante 4 horas. A diferença nas alterações dos limiares da audição entre o controlo (A) e os ratos tratados com ebselen (B) foi altamente significativa para o clique e estímulo a 4 kHz ($p < 0,01$). A diferença nas alterações dos limiares da audição entre o controlo (A) e os ratos tratados com alopurinol (B) foi altamente significativa para o clique e estímulo a 4 kHz e 16 kHz ($p < 0,01$). A diferença nas alterações dos limiares da audição entre o controlo (A) e os ratos tratados com ebselen/alopurinol (C) foi altamente significativa para o clique e estímulo a 4 kHz e 16 kHz ($p < 0,01$) e significativa para o estímulo a 12 kHz ($p < 0,05$). As alterações dos limiares da audição da linha de base foram medidas em intervalos de 5 dB.

A FIGURA 3 mostra um gráfico que compara as alterações dos limiares da ABR testada com estímulos nas

frequências de 4 kHz, 8 kHz, 12 kHz e 16 kHz, 3 semanas depois da exposição de ratos de controle (A) e ratos tratados com ebselen (B) duas vezes com ruído de 110 dB, a 4 - 16 kHz, durante 4 horas, separados por três semanas. A diferença nas alterações dos limiares da audição entre o controle e os ratos tratados com ebselen foi altamente significativa para o estímulo a 8 kHz ($p < 0,01$) e significativa para o estímulo a 16 kHz ($p < 0,05$). As alterações dos limiares da audição da linha de base foram medidas em intervalos de 5 dB.

A FIGURA 4A - D mostra os gráficos que comparam a percentagem da perda de células de pelo externo em função da distância a partir do vértice da cóclea, depois da exposição de ratos de controle (A e C) e ratos tratados com 16 mg/kg de ebselen (B e D) em dois momentos, separados por três semanas, com ruído de 110 dB, a 4 - 16 kHz, durante 4 horas. O número de células de pelo externo perdidas nos ratos A e C foi de 401 e 246, respetivamente; o número de células de pelo externo perdidas nos ratos B e D foi de 90 e 56, respetivamente.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA FORMA DE REALIZAÇÃO PREFERIDA

Conforme utilizado neste documento, o termo "otoprotetor" refere-se a uma substância química que é capaz de melhorar a perda de audição.

Conforme utilizado neste documento, o termo "melhorar a perda de audição" inclui: (a) redução da magnitude e/ou da duração da perda de audição; e/ou (b) abrandamento da progressão da perda de audição; e/ou (c) prevenção da ocorrência da perda de audição que iria ocorrer sem a administração de uma composição otoprotetora da invenção.

Conforme utilizado neste documento, o termo "agente ototóxico" significa um agente que é suscetível de

prejudicar o funcionamento de qualquer componente do ouvido envolvido na audição e, por isso, é suscetível de provocar perda de audição temporária ou permanente. Exemplos de agentes ototóxicos são os medicamentos ototóxicos e os ruídos ototóxicos.

Conforme utilizado neste documento, o termo "exposição a um agente ototóxico" inclui exposições únicas ou múltiplas a um agente ototóxico que são reconhecidas na técnica como sendo suscetíveis de provocar perda de audição temporária ou permanente. Por exemplo, a Occupational Safety and Health Administration (Administração de Segurança e Saúde Ocupacional dos E.U.A.) (OSHA) considera a exposição a ruído superior ou igual a 85 decibéis (dB) como sendo perigosa para a audição. Por esse motivo, a OSHA impõe que os trabalhadores não estejam expostos a ruído superior ou igual a 85 dB ao longo de um período contínuo de oito horas com base numa média ponderada de tempo, a menos que sejam utilizadas medidas de redução de ruído (ou seja, abafadores de ruído).

Conforme utilizado neste documento, o termo "composição otoprotetora" refere-se a uma composição que inclui, pelo menos, um otoprotetor, e pode incluir mais do que um otoprotetor. As composições otoprotetoras também podem incluir, para além de um ou mais otoprotetores, transportadores farmacêuticamente aceitáveis que facilitam a administração de uma composição otoprotetora a um sujeito mamífero.

Num aspeto, a presente invenção confere composições para utilização em métodos para melhorar a perda de audição induzida pelo ruído, em que cada um dos métodos inclui o passo de administração a um sujeito de uma quantidade de uma composição otoprotetora que é eficaz a melhoraia da

perda de audição. As composições da invenção são aplicáveis a qualquer mamífero, tal como um ser humano. A composição otoprotetora pode ser administrada antes, durante ou depois da exposição a um agente ototóxico, tal como o ruído.

As composições otoprotetoras podem incluir um ou mais do que um otoprotetor. A menos que indicado de outro modo, na invenção pode ser utilizada qualquer forma isomérica ou tautomérica de qualquer um dos otoprotetores divulgados neste documento. Alguns otoprotetores que podem ser incluídos nas composições otoprotetoras da invenção incluem glutathione e precursores de glutathione. Exemplos representativos de otoprotetores nesta categoria são: metionina; N-acetil-DL-metionina; S-adenosilmetionina; cisteína; homocisteína; N-acetilcisteína; glutathione; éster etílico de glutathione; éster dietílico de glutathione; éster trietilico de glutathione; cisteamina; cistathione; N,N'-diacetil-L-cistina (DiNAC); ácido 2 (R,S)-D-ribo- (1',2',3',4'-tetraidroxibutil) tiazolidina-4(R)-carboxílico (RibCis); 2-alquiltiazolidina 2 (R,S)-D-ribo- (1',2',3',4'-tetraidroxibutil) tiazolidina (RibCist); e ácido 2-oxo-L-tiazolidina-4-carboxílico (OTCA).

Os inibidores da xantina oxidase, por exemplo, alopurinol ($C_5H_4N_4O$) e os seus tautómeros, são úteis como otoprotetores na prática da invenção. Os seguintes derivados de alopurinol representativos são úteis como otoprotetores na prática da invenção: 1-metil alopurinol; 2-metil alopurinol; 5-metil alopurinol; 7-metil alopurinol; 1,5-dimetil alopurinol; 2,5-dimetil alopurinol; 1,7-dimetil alopurinol; 2,7-dimetil alopurinol; 5,7-dimetil alopurinol; 2,5,7-trimetil alopurinol; 1-etoxicarbonil alopurinol; e 1-etoxicarbonil-5-metil alopurinol.

Os mímicos da glutathione peroxidase que é ebselen são úteis como otoprotetores na prática da invenção. Outros exemplos de mímicos da glutathione peroxidase: ácido 6A,6B-diseleninico 6A',6B'-selênio com ponte β -ciclodextrina (6-diSeCD); e 2,2'-diseleno-bis-Beta-ciclodextrina (2-diSeCD).

A Tabela 1 apresenta as escalas de dosagem representativas eficazes para alguns dos otoprotetores descritos neste documento. Os otoprotetores apresentados na Tabela 1 são preferencialmente administrados por via oral ou por via intravenosa. Os otoprotetores apresentados na Tabela 1 podem ser administrados a um sujeito mamífero, antes, durante ou depois da exposição a um agente ototóxico, tal como ruído ototóxico. Tipicamente, um sujeito mamífero recebe, pelo menos, uma dose de pelo menos ebselen antes e depois de cada exposição ao ruído ototóxico. Em algumas formas de realização, um sujeito mamífero recebe uma dose de pelo menos ebselen antes da exposição ao ruído ototóxicos e, pelo menos uma dose de pelo menos ebselen depois da exposição ao ruído ototóxico. Em algumas formas de realização, um sujeito mamífero recebe pelo menos duas doses diárias de pelo menos ebselen através de uma única exposição a um agente ototóxico, tal como uma exposição a ruído ototóxico com duração de cerca de 1 a cerca de 6 horas. Em algumas formas de realização, um indivíduo mamífero recebe pelo menos três doses diárias de, pelo menos, ebselen através de exposições repetidas a ruído ototóxico ou exposições prolongadas a um agente ototóxico, tais como exposições a ruído ototóxico que durem mais do que cerca de 6 horas.

Em algumas formas de realização da invenção, uma composição otoprotetora incluindo um ou mais otoprotetores é administrada a um sujeito mamífero num ou mais momentos durante um período que se prolonga desde 18 horas antes da

exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas, a 18 horas depois da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição otoprotetora incluindo um ou mais otoprotetores é administrada a um sujeito mamífero num ou mais momentos durante um período que se prolonga desde uma hora antes da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas, a uma hora depois da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição otoprotetora incluindo um ou mais otoprotetores é administrada a um sujeito mamífero num ou mais momentos durante um período que se prolonga desde 30 minutos antes da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas, a 30 minutos depois da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição otoprotetora incluindo um ou mais otoprotetores é administrada a um sujeito mamífero num ou mais momentos durante um período que se prolonga desde 10 minutos antes da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas a dez minutos depois da exposição do sujeito mamífero a interferências ototóxicas. Em algumas formas de realização da invenção, uma composição otoprotetora incluindo um ou mais otoprotetores é administrada a um sujeito mamífero concorrentemente com a exposição do sujeito mamífero a um agente ototóxico, tal como ruído ototóxico.

A abreviatura "mg" significa miligramas.

Tabela 1. Escalas de Dosagem para Otoprotetores

Composto(s)	Nome Químico	Escala presentemente preferida	Escala presentemente mais preferida	Escala presentemente preferencial
NAM	N-acetil-metionina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Metionina	Metionina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
SAM	S-adenosil-metionina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Cisteína	Cisteína	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
NAC	N-acetil-L-Cisteína	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
DiNAC	N,N'-diacetil-cisteína	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
homocisteína	homocisteína	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
RibCist	2-alquiltiazolidina, 2(R,S)-D-ribo- (1',2',3',4'-- tetraidroxibutil) tiazolidina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
RibCis	Ácido 2(R,S)-D-ribo- (1',2'3',4'- tetraidroxibutil)- tiazolidina-4(R)- carboxílico	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Cistationa	Cistationa	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Glutationa	Glutationa	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Éster etílico de glutaciona	Éster etílico de glutaciona	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Éster dietílico de glutaciona	Éster dietílico de glutaciona	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia

Composto(s)	Nome Químico	Escala presentemente preferida	Escala presentemente mais preferida	Escala presentemente preferencial
Éster trietílico de glutaciona	triéster de S-(1,2- dicarboxiethyl)glutaciona	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Cisteamina	Cisteamina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
OTCA	Ácido 2-oxo-L- tiazolidina-4-carboxílico	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Ebselen	2-fenil-1,2- benzoisoselenazol-3(2H)- ona	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
2-diSeCD	2,2'-diseleno-bis-Beta- ciclodextrina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
6-diSeCD	Ácido 6A,6B-diseleninico 6A',6B'-selênio com ponte beta-ciclodextrina	5 - 5.000 mg/dia	50 - 2.000 mg/dia	500 - 1.000 mg/dia
Alopurinol	4-hidroxipirazolo[3,4- d]pirimidina	10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
1-metil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
2-metil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
5-metil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
7-metil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
1,5-dimetil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
2,5-dimetil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
1,7-dimetil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
2,7-dimetil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
5,7-dimetil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia

Composto(s)	Nome Químico	Escala presentemente preferida	Escala presentemente mais preferida	Escala presentemente preferencial
1- etoxycarbonil alopurionol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia
1- etoxycarbonil- 5-metil alopurinol		10 - 2.400 mg/dia	50 - 1.200 mg/dia	100 - 800 mg/dia

As composições otoprotetoras podem incluir um ou mais do que um otoprotetor(es). As composições otoprotetoras da invenção são definidas nas reivindicações anexas. Em algumas formas de realização das composições otoprotetoras que incluem mais do que um otoprotetor, as composições otoprotetoras são formuladas de modo a conferirem uma dosagem eficaz dos otoprotetores constituintes individuais conforme estabelecido na Tabela 1. Em algumas formas de realização, a combinação de otoprotetores pode atuar sinergicamente, conforme descrito no EXEMPLO 2.

Também são divulgadas composições otoprotetoras em que cada uma inclui pelo menos dois (por exemplo, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, ou dez) dos otoprotetores individuais. Por exemplo, algumas composições otoprotetoras incluem pelo menos um otoprotetor selecionado a partir do Grupo A, pelo menos um otoprotetor selecionado a partir do Grupo B, e pelo menos um otoprotetor selecionado a partir do Grupo C, em que os grupos A, B e C incluem os seguintes otoprotetores:

Grupo A (glutathiona ou um precursor de glutathiona): metionina; N-acetil-DL-metionina; S-adenosilmetionina; cisteína; N-acetilcisteína; glutathiona; éster etílico de

glutathiona; éster dietílico de glutathiona; éster trietílico de glutathiona; DiNAC; RibCis; homocisteína; cistathiona; cisteamina; OTCA e RibCist.

Grupo B (inibidores da xantina oxidase): alopurinol, 1-metil alopurinol; 2-metil alopurinol; 5-metil alopurinol; 7-metil alopurinol; 1,5-dimetil alopurinol; 2,5-dimetil alopurinol; 1,7-dimetil alopurinol; 2,7-dimetil alopurinol; 5,7-dimetil alopurinol; 2,5,7-trimetil alopurinol; 1-etoxycarbonil alopurinol; e 1-etoxycarbonil-5-metil alopurinol.

Grupo C (mímicos da glutathiona peroxidase): ebselen; 2-diSeCD; e 6-diSeCD.

As composições otoprotetoras da invenção são úteis para melhorar a perda de audição induzida pela exposição ao ruído ototóxico.

As composições otoprotetoras da invenção podem ser formuladas de modo a fornecerem uma dose que seja eficaz para melhorar a perda de audição num sujeito exposto a um agente ototóxico. Por exemplo, em algumas formas de realização, as composições otoprotetoras são formuladas de modo a conferirem uma dosagem eficaz dos otoprotetores individuais conforme apresentado na Tabela 1.

A administração das composições otoprotetoras da invenção é efetuada por qualquer via eficaz, por exemplo, por via oral ou parentérica, conforme descrito nos Exemplos 1 - 3. Os métodos de administração parentérica incluem administração tópica, intra-arterial, subcutânea, intramedular, intravenosa, ou intranasal. Além de um ou mais otoprotetores, as composições otoprotetoras podem conter transportadores farmacologicamente aceitáveis adequados que

incluem excipientes e outros compostos que facilitam a administração das composições otoprotetoras a um sujeito mamífero. Mais detalhes sobre as técnicas de formulação e administração podem ser encontrados na última edição da "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Maack Publishing Co, Easton PA).

As composições otoprotetoras para administração oral podem ser formuladas utilizando transportadores farmacêuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica, em dosagens adequadas para administração oral, conforme descrito nos Exemplos 1 - 3. Esses transportadores permitem que as composições otoprotetoras sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drageias, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas, suspensões, etc., adequados para ingestão por um sujeito.

As composições otoprotetoras para uso oral podem ser obtidas, por exemplo, através da combinação de um ou mais otoprotetores com excipiente sólido, moendo, opcionalmente, a mistura resultante, e processando a mistura de grânulos, depois da adição de compostos adicionais adequados, se desejado, de modo a obter comprimidos ou recheio para drageias. Os excipientes adequados incluem enchimentos de hidratos de carbono ou proteína. Estes incluem, mas não estão limitados a, açúcares, incluindo lactose, sacarose, manitol, ou sorbitol, amido de milho, trigo, arroz, batata, ou outros vegetais; celulose tal como metilcelulose, hidroxipropilmetil-celulose, ou carboximetilcelulose de sódio; e gomas, incluindo arábica e adragante; bem como proteínas, tais como gelatina e colagénio. Se desejado, podem ser adicionados agentes desintegrantes ou solubilizantes, tais como polivinilpirrolidona de ligação cruzada, agar, ácido algínico, ou um sal do mesmo, tal como alginato de sódio.

Os núcleos das drageias são conferidos com revestimentos adequados tais como soluções concentradas de açúcar, que também podem conter goma-arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenoglicol e/ou dióxido de titânio, soluções de verniz, e solventes orgânicos adequados ou misturas de solventes adequadas. Podem ser adicionados corantes ou pigmentos aos revestimentos dos comprimidos ou das drageias para identificação do produto ou para caracterizar a quantidade de composto ativo (isto é, a dosagem).

As composições otoprotetoras, que podem ser utilizadas por via oral, podem ser formuladas, por exemplo, como cápsulas de encaixe feitas a partir de gelatina, bem como cápsulas moles, seladas feitas a partir de gelatina e um revestimento tal como glicerol ou sorbitol. As cápsulas de encaixe podem conter otoprotetores misturados com material de enchimento ou ligantes tais como lactose ou amidos, lubrificantes, tais como talco ou estearato de magnésio, e, opcionalmente, estabilizadores. Nas cápsulas moles, o(s) otoprotetor(es) pode(m) ser dissolvido(s) ou suspenso(s) em líquidos adequados, tais como óleos gordos, parafina líquida ou polietilenoglicol líquido com ou sem estabilizadores.

As composições otoprotetoras para administração parentérica incluem soluções aquosas de um ou mais otoprotetores, conforme descrito nos Exemplos 1 - 3. Para injeção, as composições otoprotetoras da invenção podem ser formuladas em soluções aquosas, preferencialmente em tampões fisiologicamente compatíveis tais como solução de Hank, solução de Ringer, ou solução salina fisiologicamente tamponada. As suspensões para injeção aquosas podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tais como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextrano.

Adicionalmente, as suspensões de otoprotetores podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosas apropriadas. Os solventes ou veículos lipófilos adequados incluem óleos gordos tais como óleo de sésamo, ou ésteres de ácidos gordos sintéticos, tais como oleato de etilo ou triglicéridos, ou lipossomas. Opcionalmente, a suspensão também pode conter estabilizantes ou agentes adequados, que aumentam a solubilidade dos compostos de modo a permitirem a preparação de soluções altamente concentradas.

Para a administração tópica ou nasal, na formulação são normalmente utilizados penetrantes apropriados para a barreira particular a ser permeada. Esses penetrantes são geralmente conhecidos na técnica.

As composições otoprotetoras da presente invenção podem ser fabricadas de uma forma semelhante à conhecida na técnica (por exemplo, através de processos convencionais de mistura, dissolução, granulação, fabrico de drageias, levigação, emulsificação, encapsulamento, envolvimento ou liofilização). As composições otoprotetoras também podem ser modificadas de forma a conferirem características de libertação adequadas, por exemplo, libertação sustentada ou libertação direcionada, através de meios convencionais (por exemplo, revestimento).

As composições otoprotetoras podem ser conferidas como um sal e podem ser formadas com muitos ácidos, incluindo mas não limitados a ácido clorídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Os sais tendem a ser mais solúveis em solvente aquoso ou outros solventes protónicos do que as correspondentes formas de base livre.

Depois dessas composições otoprotetoras formuladas num transportador aceitável terem sido preparadas, podem ser

colocadas num recipiente apropriado e rotuladas para utilização.

A quantidade realmente administrada será dependente do sujeito ao qual o tratamento deverá ser aplicado, e será, de preferência, uma quantidade otimizada de tal modo que o efeito desejado é alcançado sem efeitos colaterais significativos. A determinação de uma dose eficaz está bem dentro da capacidade dos peritos na técnica. Naturalmente, o perito na técnica irá perceber que doses divididas e parciais também estão dentro do âmbito da invenção.

Para qualquer composição otoprotetora, a dose eficaz pode ser estimada inicialmente quer em ensaios de cultura celular ou, em qualquer modelo animal apropriado (por exemplo, primatas, ratos e porquinhos da Índia e outros pequenos animais de laboratório), conforme descrito nos Exemplos 1 - 3. O modelo animal também é tipicamente utilizado para alcançar um intervalo de concentração e via de administração desejáveis. Tal informação pode ser então utilizada de forma a determinar as doses e vias de administração úteis para os seres humanos ou outros mamíferos.

A eficácia terapêutica e a possível toxicidade das composições otoprotetoras pode ser determinada através de procedimentos farmacêuticos padrão em culturas celulares ou em animais experimentais (por exemplo, ED50, a dose terapeuticamente eficaz em 50% da população; e LD50, a dose letal para 50% da população). A relação da dose entre os efeitos tóxicos e terapêuticos é o índice terapêutico, e pode ser expresso como a relação ED50/LD50. As composições otoprotetoras preferidas são as que apresentam índices terapêuticos elevados. Os dados obtidos a partir de ensaios de cultura celular e estudos em animais são utilizados na

formulação de uma gama de dosagem para utilização em seres humanos ou noutros mamíferos. A dosagem desses compostos situa-se preferencialmente dentro de uma gama de concentrações circulantes que incluem a ED50 com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem varia tipicamente dentro desta gama dependendo da forma de dosagem utilizada, da sensibilidade do paciente, e da via de administração.

EXEMPLO 1

Este exemplo mostra que a administração de ebselen protege contra as alterações dos limiares da audição e a perda de células de pelo da cóclea de ratos expostos ao ruído.

1. Métodos

Paradigma da exposição ao ruído: Fêmeas com 8 semanas de idade de ratos Fisher-344 foram expostas a ruído de 110 - 115 dB a 4 - 16 kHz durante 4 horas.

Análises fisiológicas: A audiometria evocada do tronco encefálico (ABR) foi utilizada para avaliação da audição em cada ouvido em cada animal antes e depois da exposição ao ruído, utilizando equipamentos do Intelligent Hearings System (sistema de audição inteligente). A ABR gerada com um clique estímulo (estímulo de espectro amplo, 4 - 16 kHz) foi medida em intervalos de 5 dB. Os animais foram reavaliados 1 dia, 1 semana, 2 semanas e 3 semanas depois da exposição ao ruído. As alterações na ABR medidas 1 dia depois da exposição ao ruído são consideradas como representando uma alteração temporária do limiar de audição (TTS); as alterações na ABR medidas 3 semanas depois da exposição ao ruído são considerados como representando uma alteração permanente do limiar de audição (PTS).

Análises morfológicas: A contagem de células de pelo na cóclea dos animais do teste depois da exposição ao ruído e a avaliação fisiológica por meio da ABR foram determinadas através da dissecação cuidadosa da cóclea de modo a se obter o epitélio sensorial do ouvido interno. Os tecidos foram corados com faloidina marcada com fluoresceína (específica para os filamentos de actina, que são abundantes nas células de pelo) e 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; específico para o ADN no núcleo de células). As amostras foram, então, montadas em lâminas de microscópio e visualizadas com epifluorescência de forma a determinar a extensão da perda e retenção de célula de pelo. A correlação entre os dados fisiológicos (ABR) e os dados morfológicos (contagem de células de pelo) permite a confirmação dos efeitos protetores dos otoprotetores da invenção.

Dosagem de Otoprotetores: Ebselen foi dissolvido em 4 mg/mL em DMSO a 10% e administrado a ratos a 16 mg/kg. N-acetil-cisteína foi dissolvida em 100 mg/ml em solução salina e foi administrada a ratos a 325 mg/kg. Cerca de 0,5 ml de solução de ebselen ou solução de N-acetil-cisteína foi injetada intraperitonealmente ou administrada por entubação oral duas vezes por dia no dia anterior, no próprio dia, e no dia depois da exposição ao ruído. Os animais de controle foram doseados num calendário idêntico apenas com o transportador (DMSO a 10%).

Análise estatística: Todas as experiências foram efetuadas com quatro ratos por grupo de estudo, e a medição em cada ouvido de forma independente, antes e depois da exposição ao ruído. Os dados foram recolhidos em estudos cegos. As análises estatísticas foram realizadas através da análise de variância (ANOVA) entre os grupos de estudo.

2. Resultados

Conforme mostrado na Figura 1, os dados da ABR gerados com um clique estímulo de 4 - 16 kHz medido em intervalos de 5 dB mostram uma redução altamente significativa na TTS, em animais administrados com ebselen um dia depois da exposição ao ruído, e uma redução significativa na PTS três semanas depois da exposição ao ruído, em comparação com os controlos. A redução na TTS e PTS em animais administrados com ebselen foi de pelo menos duas vezes, quando comparada com a dos animais de controlo. Da mesma forma, os dados da ABR mostram uma redução significativa na TTS, em animais administrados com N-acetil-cisteína em todos os momentos do tempo depois da exposição ao ruído.

Os dados fisiológicos correlacionam-se com os dados morfológicos dos mesmos animais de teste que mostram uma menor perda de células de pelo na cóclea a partir de animais tratados com otoprotetores quando comparados com o grupo de controlo. Por exemplo, num animal tratado com ebselen a PTS de 0 dB foi observada e uma redução significativa de TTS, a preservação da maioria das células de pelo externo, tendo em conta que houve perda quase completa das células de pelo externo num animal de controlo com um PTS de 15 dB. Foi observada preservação semelhante das células de pelo externo nos ratos tratados com N-acetil-cisteína. Desse modo, a administração de ebselen ou N-acetil-cisteína resulta na proteção fisiológica de perda de audição induzida através do ruído e de perda de células de pelo.

Da mesma forma, foi verificado que a administração de alopurinol confere proteção contra a perda de audição induzida através do ruído e a perda de células de pelo (ver exemplo 2).

EXEMPLO 2

Este exemplo mostra que a administração combinada de ebselen e alopurinol confere uma maior proteção contra a perda de audição do que cada um dos compostos administrados individualmente.

1. Métodos

Paradigma da exposição ao ruído: Fêmeas com 8 - 10 semanas de idade de ratos Fisher-344 foram expostas a ruído de 110 - 115 dB a 4 - 16 kHz durante 4 horas.

Análises fisiológicas: A ABR gerada com um clique estímulo (estímulo de espectro amplo, 4 - 16 kHz), e com estímulos de tom nas frequências de 4 kHz, 8 kHz, 12 kHz e 16 kHz, foi medida em intervalos de 5 dB, conforme descrito no Exemplo 1. Os animais foram testados antes e 3 semanas depois da exposição ao ruído para avaliar a PTS.

Dosagem de compostos: Ebselen foi dissolvido em 4 mg/ml em DMSO a 10% e alopurinol foi dissolvido em 4 mg/ml em água. Ebselen e alopurinol foram administrados aos ratos a uma dose individual de 16 mg/kg ou a uma dose combinada de 8 mg/kg cada. Cerca de 0,5 ml de solução de ebselen, solução de alopurinol, ou solução de ebselen/alopurinol foi injetada intraperitonealmente ou administrada por entubação oral duas vezes por dia no dia anterior, no próprio dia, e no dia depois da exposição ao ruído. Os animais de controle foram doseados num calendário idêntico, apenas com o transportador.

Análise estatística: Todas as experiências foram efetuadas com quatro ratos por grupo de estudo, e a medição em cada ouvido de forma independente, antes e depois da exposição ao ruído. Os dados foram recolhidos em estudos cegos. As

análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA entre os grupos de estudo.

2. Resultados

Os dados fisiológicos conforme medidos pela ABR indicam que ebselen e alopurinol, sozinhos ou em combinação, conferem uma significativa proteção para ambas as alterações dos limiares temporários e permanentes da audição em ratos expostos ao ruído. A Figura 2 mostra que ebselen e alopurinol entregues por injeção intra-peritoneal em 16 mg/kg resultam individualmente em reduções significativas na PTS três semanas depois da exposição ao ruído, comparados com os controlos. Na metade da dose individual (isto é, 8 mg/kg cada), a combinação de ebselen e alopurinol confere um nível de proteção que é maior do que o aditivo (sinergia).

EXEMPLO 3

Este exemplo mostra que a administração de ebselen protege contra as alterações dos limiares da audição e a perda de células de pelo da cóclea de ratos repetidamente expostos ao ruído.

1. Métodos

Paradigma da exposição ao ruído: Fêmeas com 8 semanas de idade de ratos Fisher-344 foram expostas a ruído de 110 dB a 4 - 16 kHz durante 4 horas duas vezes com 3 semanas de intervalo.

Análises fisiológicas: A ABR gerada com estímulos de tom nas frequências de 4 kHz, 8 kHz, 12 kHz e 16 kHz, foi medida em intervalos de 5 dB, conforme descrito no Exemplo 1. Os animais foram ensaiados antes e 3 semanas depois da

exposição repetida ao ruído de modo a avaliar a alteração permanente do limiar da audição (PTS).

Análises morfológicas: A contagem de células de pelo na cóclea dos animais do teste depois da exposição ao ruído e a avaliação fisiológica através da ABR foram determinadas conforme descrito no Exemplo 1.

Dosagem de Ebselen: Ebselen foi dissolvido em 4 mg/mL em DMSO a 10% e administrado a ratos a uma dosagem de 16 mg/kg. Cerca de 0,5 ml de solução de ebselen foi injetada intraperitonealmente ou administrada por entubação oral duas vezes por dia no dia anterior, no próprio dia, e no dia depois de cada exposição ao ruído. Os animais de controlo foram doseados num calendário idêntico apenas com o transportador.

Análise estatística: Todas as experiências foram efetuadas com quatro ratos por grupo de estudo, e a medição em cada ouvido de forma independente, antes e depois da exposição ao ruído. Os dados foram recolhidos em estudos cegos. As análises estatísticas foram realizadas através da ANOVA entre os grupos de estudo.

2. Resultados

Os dados fisiológicos medidos pela ABR indicam que ebselen confere proteção significativa para ambas as alterações temporárias e permanentes dos limiares da audição em ratos a partir de uma exposição repetida ao ruído. A administração de ebselen resulta numa redução significativa na TTS 1 dia depois das exposições repetidas ao ruído, quando comparada com os controlos. Além disso, a PTS três semanas depois das exposições repetidas ao ruído foi significativamente reduzida nestes animais, quando comparados com os controlos, conforme mostrado na Figura 3.

Os dados fisiológicos correlacionam-se com os dados morfológicos dos mesmos animais de teste que mostram uma menor perda de células de pelo na cóclea a partir de animais tratados com ebselen quando comparados com o grupo de controlo, conforme mostrado na Figura 4.

REIVINDICAÇÕES

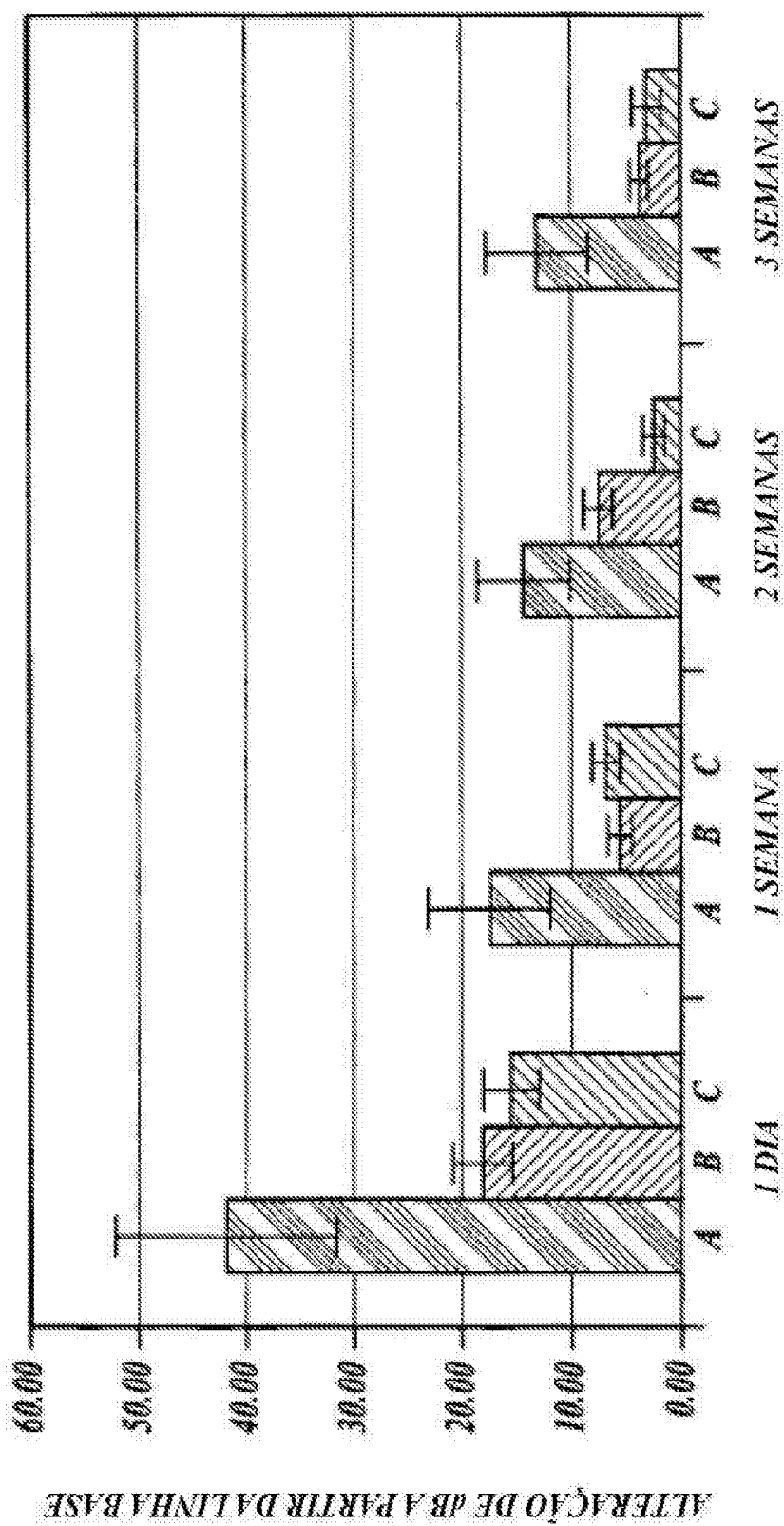
1. Uma composição otoprotetora para utilização no melhoramento da perda de audição induzida por ruído num sujeito mamífero, incluindo uma quantidade farmacologicamente eficaz de 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona (ebselen) ou um sal da mesma farmacologicamente aceitável.
2. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 1 que inclui:
 - (a) uma quantidade farmacologicamente eficaz de 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona (ebselen) ou um sal da mesma farmacologicamente aceitável; e
 - (b) uma quantidade farmacologicamente eficaz de pelo menos um ortoprotetor selecionado a partir do grupo consistido por alopurinol, 1-metil alopurinol; 2-metil alopurinol; 5-metil alopurinol; 7-metil alopurinol; 1,5-dimetil alopurinol; 2,5-dimetil alopurinol; 1,7-dimetil alopurinol; 2,7-dimetil alopurinol; 5,7-dimetil alopurinol; 2,5,7-trimetil alopurinol; 1-etoxycarbonil alopurinol, 1-etoxycarbonil-5-metil alopurinol e sais dos mesmos farmacologicamente aceitáveis.
3. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 1 ou com a reivindicação 2 que inclui:
 - (a) uma quantidade farmacologicamente eficaz de 2-fenil-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-ona (ebselen) ou um sal da mesma farmacologicamente aceitável; e
 - (b) uma quantidade farmacologicamente eficaz de pelo menos um ortoprotetor selecionado a partir do grupo consistido por alopurinol, 1-metil alopurinol; 2-metil alopurinol; 5-metil alopurinol; 7-metil alopurinol;

1,5-dimetil alopurinol; 2,5-dimetil alopurinol; 1,7-dimetil alopurinol; 2,7-dimetil alopurinol; 5,7-dimetil alopurinol; 1-etoxycarbonil alopurinol, 1-etoxycarbonil-5-metil alopurinol, e sais dos mesmos farmaceuticamente aceitáveis; em que ebselen está presente numa quantidade de 5 - 5.000 mg/dia, e cada um dos otoprotetores no grupo (b) está presente numa quantidade de 10 - 2.400 mg/dia.

4. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que a composição otoprotetora inclui ebselen e alopurinol, ou um sal dos mesmos farmaceuticamente aceitável.
5. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 2 ou 3, que também inclui uma quantidade farmaceuticamente eficaz de N-acetilcisteína ou um sal da mesma farmaceuticamente aceitável.
6. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 5, que inclui ebselen, alopurinol, e N-acetilcisteína, ou sais dos mesmos farmaceuticamente aceitáveis.
7. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que ebselen está presente numa quantidade de 5 - 5.000 mg/dia.
8. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que ebselen está presente numa quantidade de 50 - 2.000 mg/dia.
9. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 1, em que ebselen está presente numa quantidade de 500 - 1.000 mg/dia.

10. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 4, em que ebselen está presente numa quantidade de 5 - 5.000 mg/dia e o alopurinol está presente numa quantidade de 10 - 2.400 mg/dia.
11. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 4, em que ebselen está presente numa quantidade de 500 - 1.000 mg/dia e o alopurinol está presente numa quantidade de 100 - 800 mg/dia.
12. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que cada um de ebselen e N-acetilcisteína está presente numa quantidade de 5 - 5.000 mg/dia e o alopurinol está presente numa quantidade de 10 - 2.400 mg/dia.
13. A composição para utilização de acordo com a reivindicação 6, em que cada um de ebselen e N-acetilcisteína está presente numa quantidade de 500 - 1.000 mg/dia e o alopurinol está presente numa quantidade de 100 - 800 mg/dia.
14. A composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, que também inclui pelo menos um transportador farmacêuticamente aceitável adequado para administração oral a um sujeito mamífero.
15. A composição para utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, que também inclui um excipiente sólido que inclui pelo menos um de um agente de enchimento de hidrato de carbono ou proteína.

16. A utilização de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores no fabrico de um medicamento para utilização no melhoramento da perda de audição induzida por ruído num sujeito mamífero.
17. A utilização de acordo com a reivindicação 16, em que o sujeito mamífero é um ser humano.



TEMPO DEPOIS DA EXPOSIÇÃO AO RUÍDO

Fig.1.

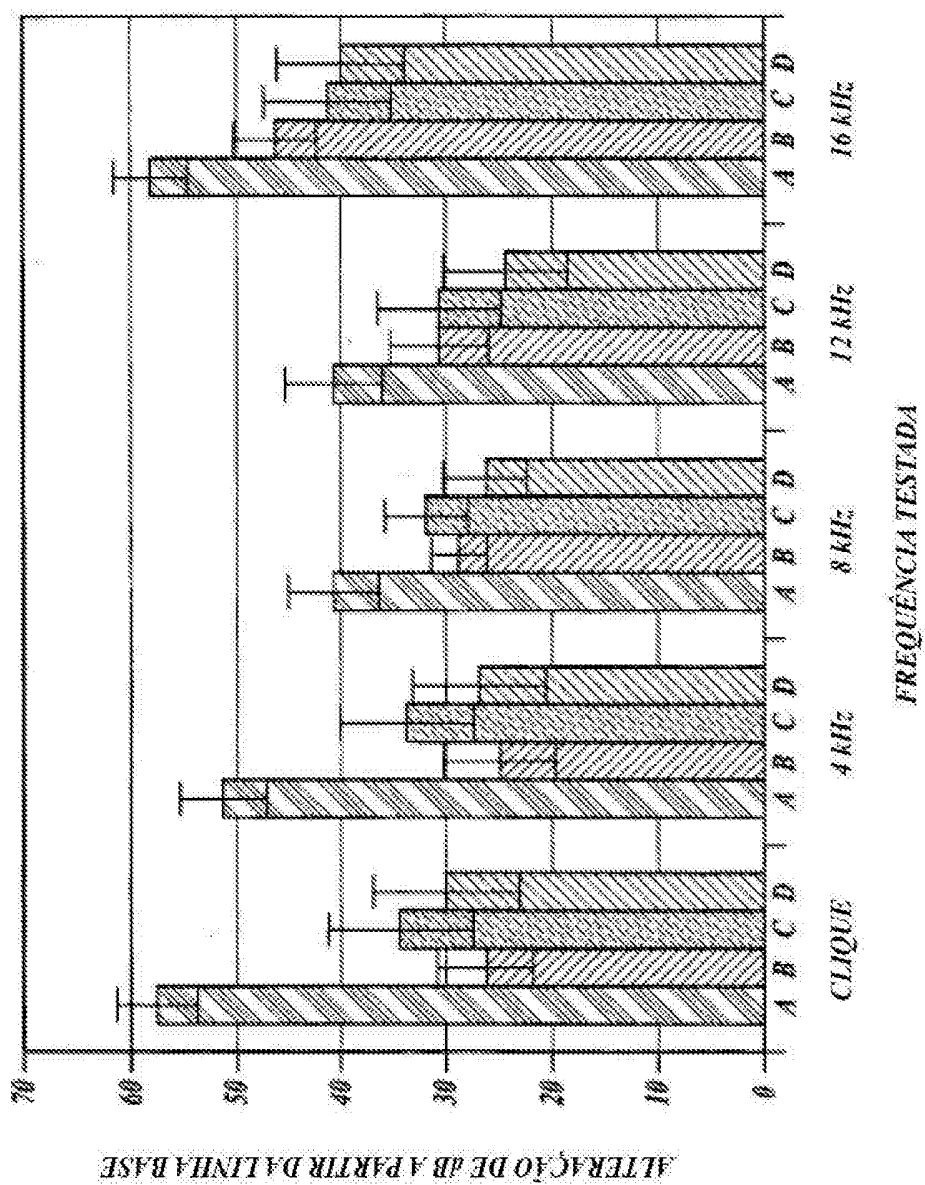


Fig.2.

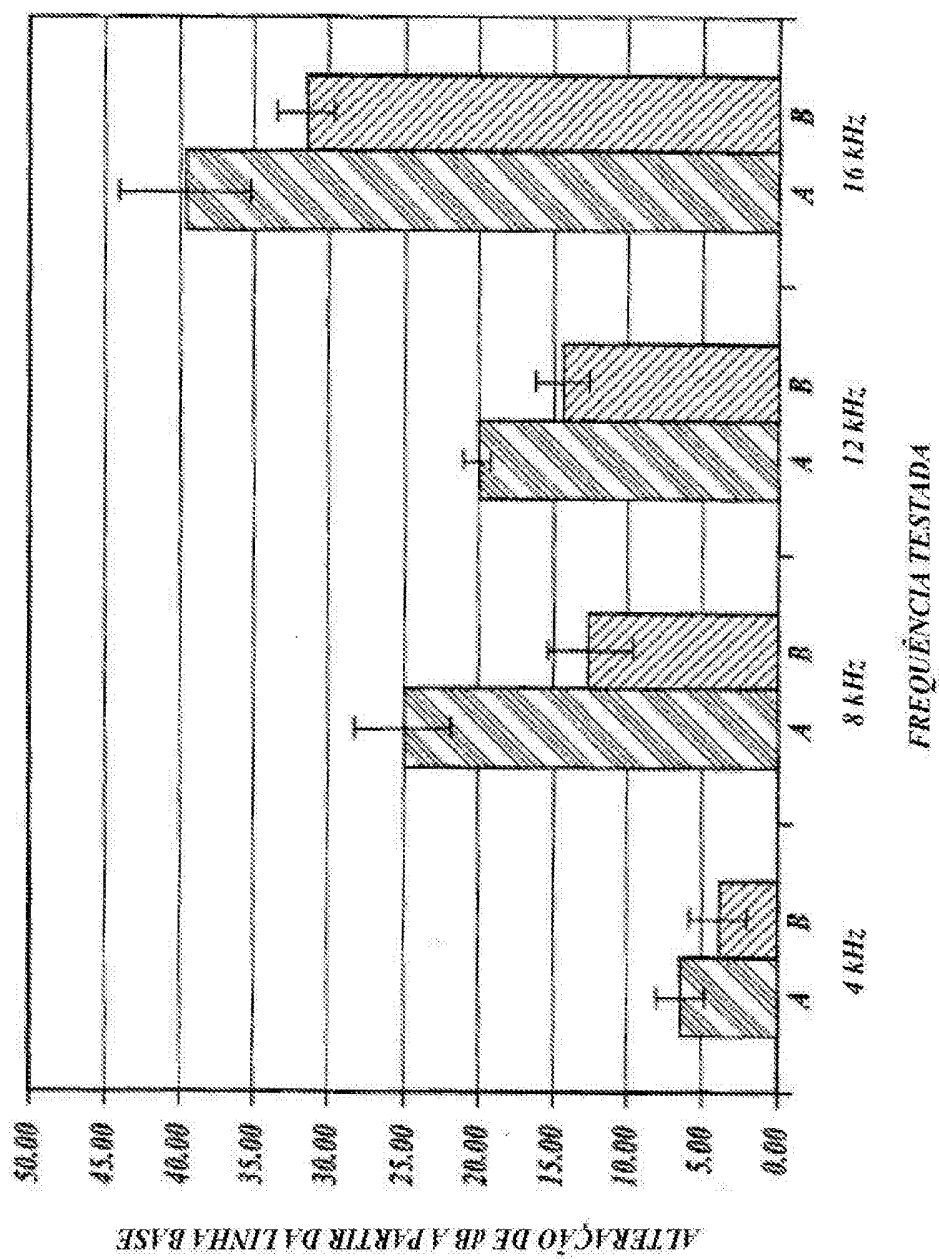
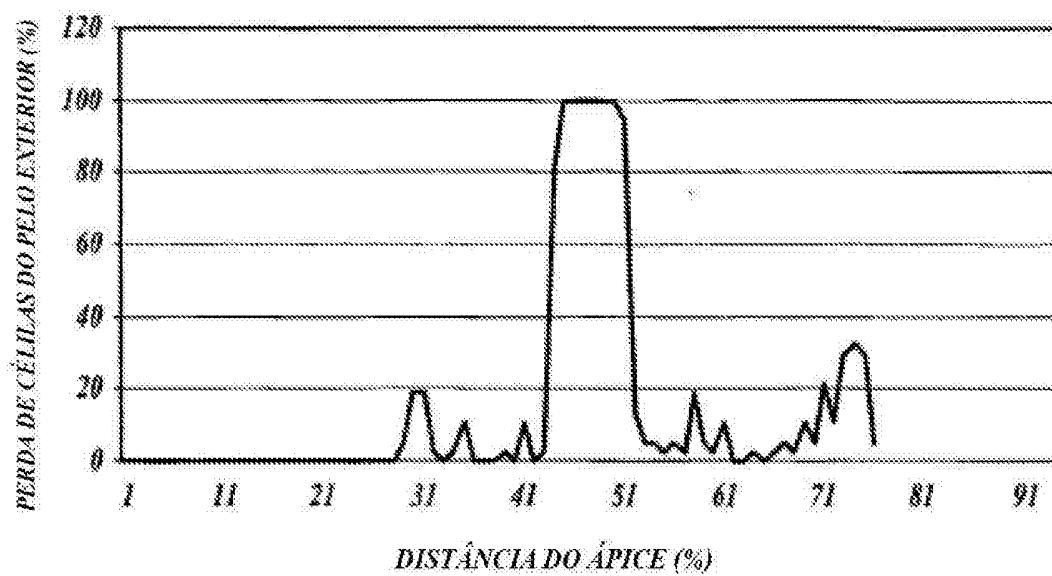
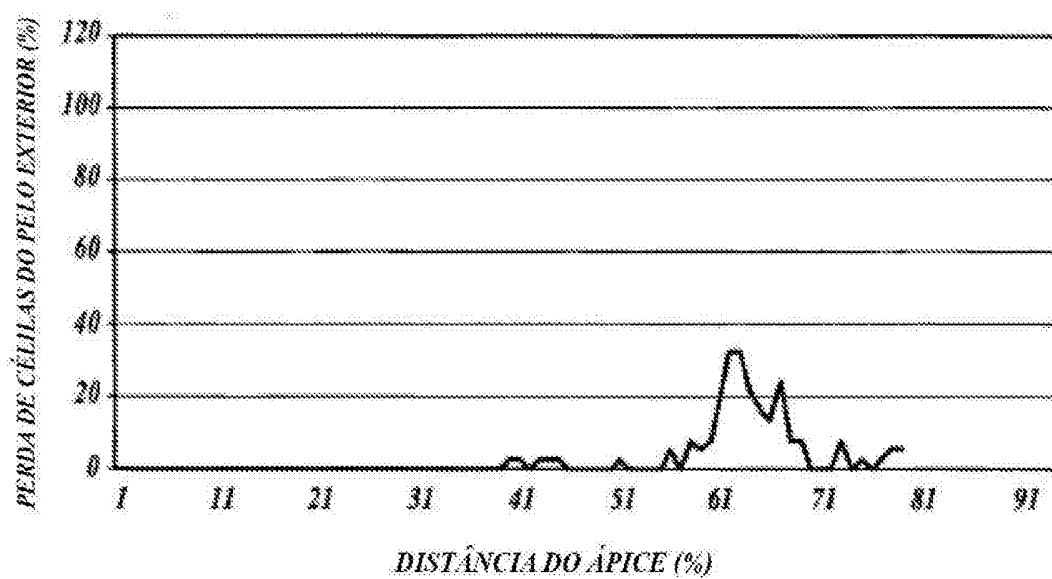
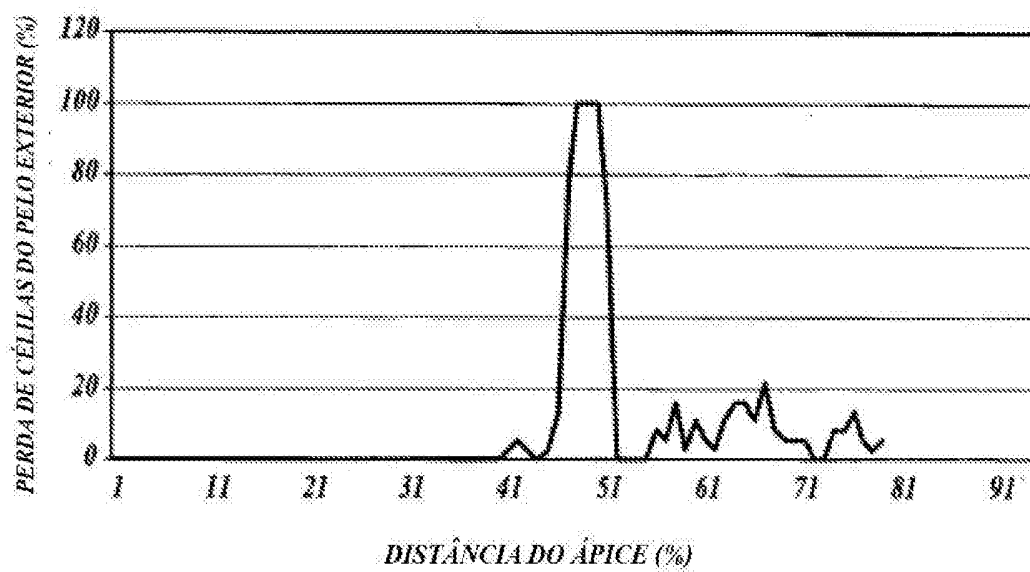
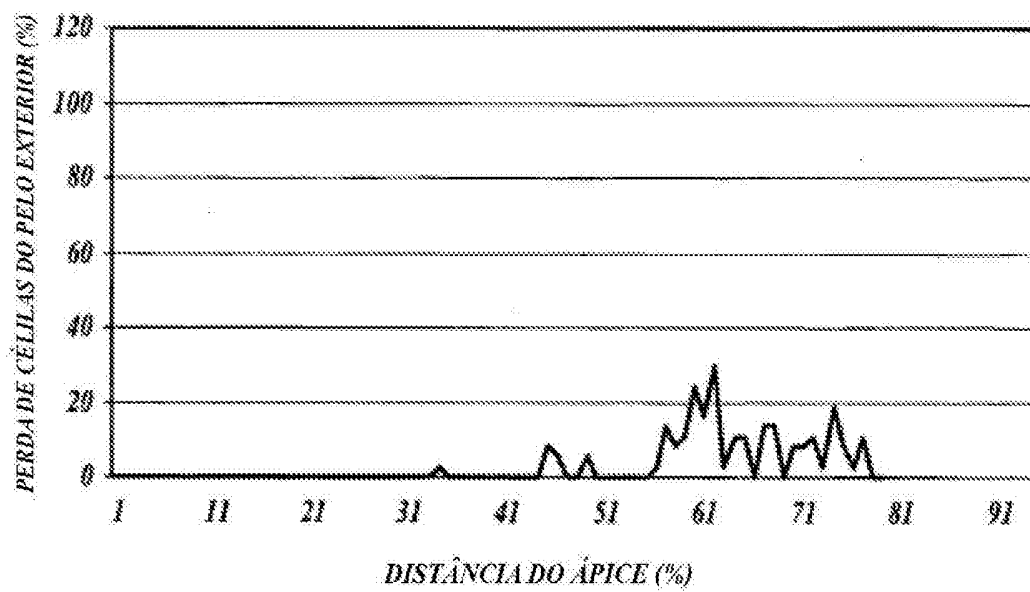


Fig.3.

*Fig. 4A.**Fig. 4B.*

**Fig. 4C.****Fig. 4D.**