

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 980**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/437** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2014** **PCT/EP2014/070840**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2015** **WO15044434**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2014** **E 14781129 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.01.2017** **EP 2941429**

54 Título: **Fluoro-9-metil-beta-carbonilo**

30 Prioridad:

**29.09.2013 EP 13186560**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.07.2017**

73 Titular/es:

**AUDIOCURE PHARMA GMBH (100.0%)**  
**Schlegelstr. 9**  
**10115 Berlin , DE**

72 Inventor/es:

**ROMMELSPACHER, HANS y**  
**ENZENSPERGER, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 622 980 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).

**Fluoro-9-metil-beta-carbonilo****Descripción**

5 **[0001]** La presente invención se refiere a fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbonilo, cuya producción así como utilización farmacéutica y composiciones farmacéuticas contienen fluoro-9-metilo-beta-carbolina.

10 **[0002]** Los compuestos de la invención se utilizan para tratar enfermedades agudas y crónicas del oído y de pérdida de la audición, trastornos de vértigo y de equilibrio, en particular de pérdida aguda de la audición, traumatismo por ruido, trauma por explosión, tinnitus, pérdida de la audición debido a la exposición crónica al ruido, presbiacusia, trauma durante la implantación de las prótesis del oído interno (trauma de inserción), mareo debido a trastornos en la zona del oído interno, mareos relacionada y/o como síntoma de la enfermedad de Meniere, pérdida de equilibrio relacionada y/o como síntoma de la enfermedad de Meniere y deterioro de la audición causado por antibióticos y citostáticos.

15 **[0003]** De acuerdo con estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 250 millones de personas en todo el mundo sufren de trastornos ligeros o graves del oído. En los EE.UU., entre 30 y 40 millones de personas experimentan trastornos de audición y pérdidas auditivas. Solo en EE.UU. el costo de los tratamientos es de aproximadamente 50 mil millones de dólares al año. La asociación alemana para personas con discapacidad auditiva informó en 2007 que alrededor del 19% de la población alemana sufre más de 14 años de trastornos de la audición.

20 **[0004]** Con la edad, aumenta el porcentaje en personas con discapacidad auditiva. En este momento, los trastornos de la audición son la cuarta discapacidad física crónica más común en personas de más de 65 años, después de las enfermedades de los huesos y las articulaciones, presión arterial alta y enfermedades del corazón. En las personas de entre 60 y 69 años son el 37%, y en las de los 70 y más años son el 54 % de la población que sufre de pérdidas de audición. En la República Federal de Alemania cerca de 12-15 millones de pacientes sufren de pérdidas de audición y alrededor de 2,9 millones de pacientes sufren de tinnitus.

25 **[0005]** El término "tinnitus aurium", o simplemente tinnitus se refiere a un síntoma o síndrome en el que la persona percibe ruido persistente o recurrente, pudiéndose distinguir dos formas de tinnitus. En el "tinnitus objetivo" relativamente poco común, los sonidos percibidos por los pacientes se perciben o al menos se miden desde el exterior. Se basan generalmente en la fuente de sonido de un cuerpo, tal como en un vaso sanguíneo que pasa cerca del oído interno. En el "tinnitus subjetivo" significativamente más frecuente, los fenómenos acústicos no se basan, sin embargo, en una fuente externa para otros. Así, el "tinnitus subjetivo" es una percepción acústica, que se percibe de forma independiente de un sonido que actúa sobre el oído del paciente. Las razones de esta percepción pueden ser diversas y se deben en parte a un fallo de la función acústica del oído interno. Sin embargo, hay que distinguir el tinnitus significativamente de las alucinaciones auditivas. La naturaleza del ruido aparente, que percibe el paciente de tinnitus es muy diversa. Se puede resumir, entre otras, las siguientes impresiones acústicas del término tinnitus:

- Ruido de zumbido o pitido
- Silbido
- Susurro
- 45 - Crujido o golpe

**[0006]** El sonido puede ser constante en su intensidad, pero también puede tener un carácter rítmico y pulsante.

50 **[0007]** El oído está estructurado del siguiente modo. Del pabellón auricular, el conducto auditivo externo conduce al interior del oído. El conducto auditivo externo termina en el tímpano. Esta parte del oído se llama el oído externo. Detrás del oído externo se encuentra un espacio, el oído medio, también llamado el tímpano, que está conectado a la trompa de eustaquio y por tanto también con la nasofaringe. El oído medio se completa en un lado de la membrana del tímpano y en el lado opuesto a través de la ventana oval y la ventana redonda. Detrás de las dos ventanas se cierra el espacio conocido como oído interno. El oído interno alberga varios órganos, como el órgano de equilibrio (vestibular), y el denominado caracol (cóclea) para la percepción acústica. Esto a su vez contiene el órgano de Corti como un portador de las células de sensor (células ciliadas) en el oído interno.

55 **[0008]** La membrana de la ventana redonda forma una barrera biológica para el espacio del oído interno y representa el mayor obstáculo para el tratamiento local de lesiones y enfermedades del oído interno. El principio activo administrado debe superar esta membrana para alcanzar el espacio del oído interno. Pero el medicamento no puede aplicarse a través de la membrana de modo mecánico-automatizado, ya que de otro modo la membrana se daña por esta manipulación. Sin embargo, puede aplicarse quirúrgicamente y localmente (por ejemplo, por inyección a través de la membrana timpánica) a la membrana de ventana redonda y luego penetrar en la membrana de la ventana redonda. Por lo tanto, la sustancia activa pasa al espacio de oído interno lleno de perilinfa que está formado por los compartimentos interconectados de la cóclea, a saber, la rampa timpánica y la rampa vestibular. En un compartimento separado por membranas entre la rampa timpánica y la rampa vestibular, también denominado Scala

media (también conducto coclear), se encuentran las células sensoriales del oído (células ciliadas exterior e interior) rodeadas por endolinfas. Estas, junto con las células circundantes de apoyo, se denominan el órgano de Corti. Las células ciliadas se dañan con pérdida auditiva por todas las causas (edad, medicamentos como ciertos antibióticos y citostáticos) y sobre todo por el tinnitus. En de las membranas, que separan la escala media del espacio perilinfático, los agentes también pueden entrar en la endolinfa o bien directamente en las células de pelo. Dado que tanto los compartimentos perilinfáticos como los endolinfáticos de la cóclea se conectan con el sistema vestibular, los agentes pueden acceder desde la cóclea a las células sensoriales del aparato vestibular.

**[0009]** La solicitud de patente alemana (DE 10 2007 009 264 A1) describe 9-alquilo- $\beta$ -carbolina, la cual se puede aplicar debido a su acción neuroprotectora a la terapia y/o profilaxis de trastornos del movimiento y/o enfermedades neurológicas tales como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson.

**[0010]** Von Hamann et al. (J. Hamann et al.; Neurochem Internat. 2008, 52, 688-700) manifestó un efecto neuroprotector de la  $\beta$ -carbolina 9-metilo- $\beta$ -carbolina en cultivos celulares primarios de neuronas mesencefálicas. El aumento de la supervivencia de las neuronas mostrado allí por 9-metilo- $\beta$ -carbolina no se debía a una proliferación elevada. Por el contrario, la administración de 9-metilo- $\beta$ -carbolina llevó a la inhibición de la proliferación y el aumento de la diferenciación de las neuronas. Este efecto de la 9-metilo-beta-carbolina se confirmó en células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y). Junto con la diferenciación promovida, se detectó un aumento de la expresión de factores neurotróficos tales como hedgehog sónica, Wnt1 y Wnt5a. Además, en las células primarias de neuronas mesencefálicas se manifestó un aumento inducido por 9-metilo- $\beta$ -carbolina en el número de neuronas dopaminérgicas. Por lo tanto, se promete un beneficio terapéutico de 9-metilo- $\beta$ -carbolina en el tratamiento de Parkinson.

**[0011]** La solicitud de patente de EE.UU. (US 2004/038970 A1) describe el uso de  $\beta$ -carbolinas como un ingrediente activo para el tratamiento de una variedad de indicaciones médicas, incluyendo tinnitus, en el que se menciona, no obstante, un grupo de  $\beta$ -carbolinas estructuralmente fuerte de 9-alquilo- $\beta$ -carbolinas y por lo tanto también de 6- y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolinas.

**[0012]** La solicitud de patente internacional (WO 2011/079841) describe  $\beta$ -carbolinas, en particular 9 alquilo- $\beta$ -carbolina y su uso para el tratamiento de enfermedades o lesiones del oído interno. Se pudo demostrar que la aplicación de 9-alquilo- $\beta$ -carbolina promueve la diferenciación neuronal de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) y la expresión de factores neurotróficos con propiedades neuroprotectoras. Esto se confirmó en cultivos de células de preparaciones cocleares de rata. Además, se demostró en cobayas que 9-metilo- $\beta$ -carbolina puede difundirse en el espacio perilinfático del oído interno tras la aplicación local interior a la ventana redonda del oído interno y provoca un aumento en la actividad electrofisiológica de las células ciliadas del órgano de Corti.

**[0013]** La presente invención tiene por objeto proporcionar un ingrediente activo, y formulaciones farmacéuticas que se pueden utilizar para la profilaxis y tratamiento de la pérdida de audición, la presbiacusia, mareos y trastornos del equilibrio, así como la mejora del aprendizaje y la memoria y aportan una ventaja a la técnica anterior.

**[0014]** Este objetivo se consigue mediante la enseñanza técnica de las reivindicaciones independientes. Otras formas ventajosas de realización, aspectos y detalles de la invención resultan de las reivindicaciones dependientes, la descripción y los ejemplos.

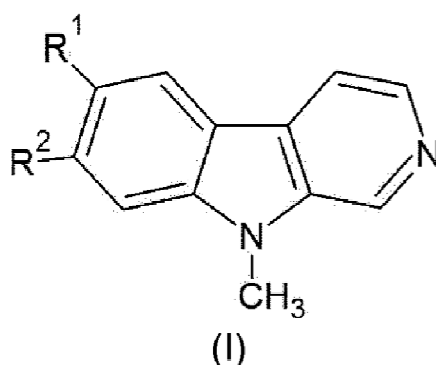
#### **Fluor-9-metilo-beta-carbolina**

**[0015]** Sorprendentemente, se ha encontrado que fluoro-9-metilo-beta-carbolina de acuerdo con la invención de la fórmula general (I) en comparación con los compuestos de la técnica anterior (por ejemplo,  $\beta$ -carbolina 9-metilen) tiene una efectividad aumentada en el tratamiento de enfermedades del oído interno. Ofrecen la opción de aplicarse en dosis más bajas en toxicidad reducida, lo que representa una mejora terapéutica significativa sobre la técnica anterior. Además, se ha encontrado sorprendentemente que 6- y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina según la invención promueve características especiales del estado de la técnica, promoviéndose una aplicación terapéutica. Por lo tanto, para 6 y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina según la invención se podría detectar una mayor eficacia en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina en la promoción de la diferenciación en células de neuroblastoma humanas. También manifiestan 6 y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina un aumento significativo en lipofilia, lo cual se asocia con un aumento de la permeabilidad de la membrana. Esto tiene implicaciones de largo alcance para el uso terapéutico del compuesto novedoso para el tratamiento de enfermedades o daños en el oído interno o para mejorar la memoria y aumentar la capacidad de aprender. Como ya se ha descrito membranas biológicas tales como la membrana timpánica, la membrana de la ventana redonda y las membranas de la escala media (Membrana tectoriana y de membrana de Reissner) forman una barrera natural para una sustancia activa en la forma de las células pilosas del oído interno. Esto es especialmente cierto en la aplicación tópica de un ingrediente activo en el tímpano o ventana redonda. Por lo tanto la disponibilidad del ingrediente activo se incrementa a las células diana a través de aumento de la permeabilidad de la membrana. Además de la permeabilidad de la membrana, la degradación de una sustancia activa en el cuerpo tiene un papel crucial en su eficacia, especialmente en la administración sistémica, y también para los posibles efectos secundarios. Mientras que 9-metilo- $\beta$ -carbolina se degrada a través de una hidroxilación en la posición 6 y reacción de conjugación

posterior, esta vía metabólica se bloquea en 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina por el grupo de fluoruro. De este modo, la vida media de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina no sólo se incrementa, sino que también se reduce el riesgo de la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos. Debido a la eficacia incrementada de 6- y/o 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina parece posible una dosis reducida en comparación con otras 9-alquilo-β-carbolinas en la terapia. Esto es sólo para el tratamiento a largo plazo de las enfermedades crónicas de enorme importancia, ya que esto reduce la presión sobre el cuerpo y también los efectos secundarios no deseados se pueden reducir. Por lo tanto, la presente solicitud se trata de una invención de selección.

**[0016]** Con el término "6 y/o 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina" se entiende por una operación "o", o bien el compuesto 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina o bien el compuesto 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina, y por una operación "y" los compuestos 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina y 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina.

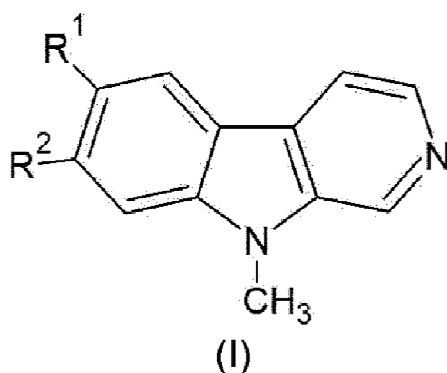
**[0017]** La presente invención comprende compuestos de la fórmula general (I), p.ej., fluoro-9-metilo-beta-carbolinas de la fórmula general (I):



donde  $R^1 = -F$  y  $R^2$  es  $-H$  o  $-F$ , o  
donde  $R^1 = H$  y  $R^2 = -F$ ;

así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos, y compuestos complejos de los compuestos antes mencionados.

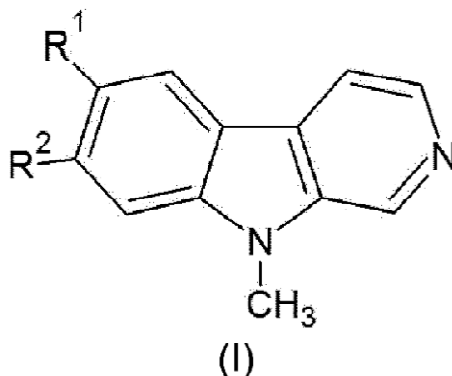
**[0018]** La presente invención también se refiere a compuestos de fórmula general (I) o fluoro-9-metilo-β-carbolina de fórmula general (I):



donde  $R^1$  y  $R^2$  son  $-F$  o  $-H$  independientes el uno del otro, y  
donde al menos uno de los dos radicales  $R^1$  o  $R^2$  es  $-F$ ;

así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos, y compuestos complejos de los compuestos de comparación mencionados.

**[0019]** La presente invención también se refiere a compuestos de la fórmula general (I) o fluoro-9-metilo-β-carbolina de fórmula general (I):



donde  $R^1$  y  $R^2$  son -F o -H independientes el uno del otro, y  
donde por lo menos uno de los dos radicales  $R^1$  o  $R^2$  no es -H;

así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos, y profármacos y complejos de los compuestos antes mencionados.

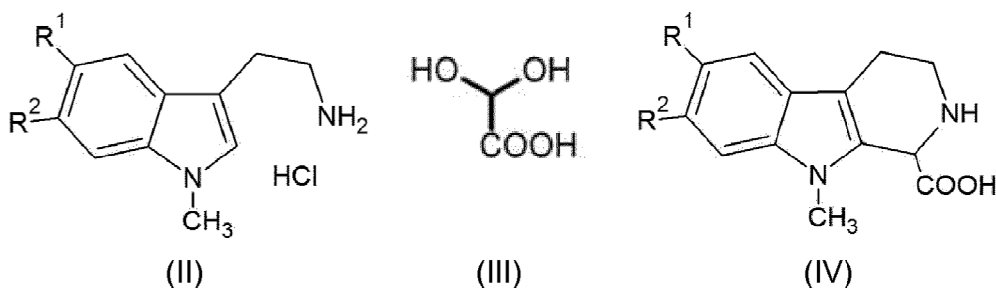
Es preferido cuando  $R^1 = -F$  y  $R^2 = -H$ , o cuando  $R^1 = H$  y  $R^2 = -F$ .

**[0020]** El término profármaco empleado en este documento se define como una sustancia farmacológica que se administra en una forma inactiva o menos activa. Después de la administración, se convierte en el cuerpo del paciente en su forma activa y eficaz, tal como fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de fórmula general (I).

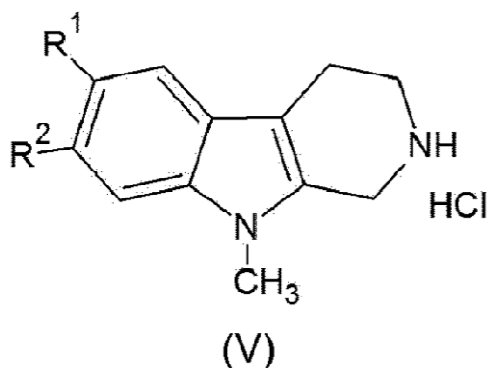
**[0021]** Como ácidos posibles que forman una sal de adición de ácido con el compuesto de la presente invención, se pueden mencionar los siguientes: ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido perclórico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido glucónico (glicon, ácido dextrónico), ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido tartrónico (ácido hidroximalónico, ácido hidroxipropanoico), ácido fumárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido malónico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, (o-, m-, p-) ácido toluico, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfónico de naftilamina, ácido sulfanílico, ácido sulfónico, ácido quínico (ácido quínico), ácido o-metilmándelico, ácido hidrogenbencensulfónico, ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), ácido adípico, ácido d-o-toliltartárico, aminoácidos tales como metionina, triptófano, arginina, y en particular aminoácidos, ácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Además, son posibles las formas de betaína.

**[0022]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto de la fórmula general (I) (o un átomo de flúor-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (I)), que comprende los pasos de:

a) reacción del compuesto de partida de fórmula general (II) (o un clorhidrato fluoro-1-metiltriptamina de la fórmula general (II)) con la adición de ácido de hidrato glioxílico de fórmula (III) y de una base a una unión de la fórmula general (IV)



b) descarboxilación del compuesto de fórmula general (IV) mediante la adición de un ácido, y bajo calentamiento a un compuesto de Fórmula general (V) (p.ej., a fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (V))



c) aromatización del compuesto de fórmula general (V) (es decir, de fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina de la fórmula general (V)) (para dar un compuesto de la fórmula general I) (p.ej., un fluoro-9-metilo-β-carbolina de la fórmula general (I)) con la adición de un catalizador;

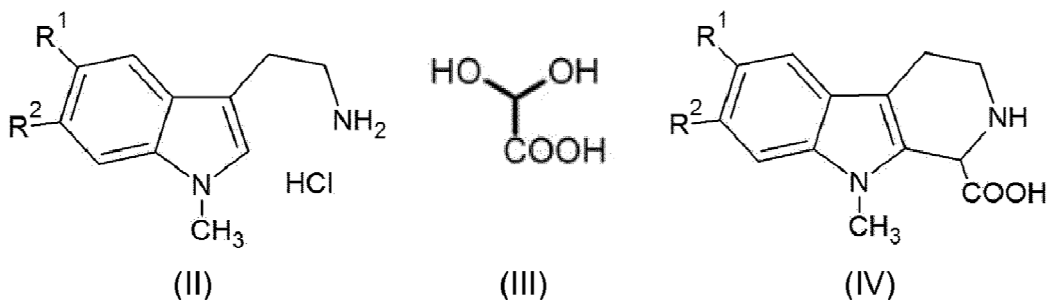
en la que

$R^1$  = es -F y  $R^2$  = -H o -F, o  
 $R^1$  = H y  $R^2$  = -F.

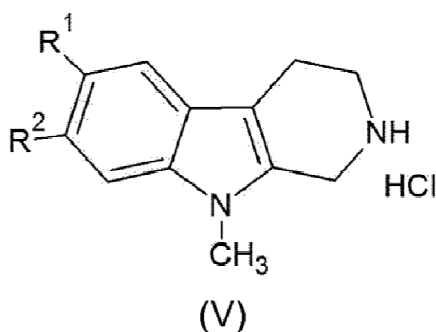
**[0023]** Se entiende que la representación de los radicales  $R^1$  y  $R^2$  como se indica anteriormente, sirve para un proceso en particular para la preparación de un compuesto de la invención no sólo para el producto de salida de la síntesis correspondiente, sino también para los productos intermedios obtenidos del mismo, así como para el producto final último de la síntesis.

**[0024]** Otro aspecto de la presente invención se refiere por tanto a un procedimiento para la preparación del compuesto de la invención de la fórmula general (I) (p.ej., un fluoro-9-metilo-β-carbolina de fórmula general (I)) que contiene las siguientes pasos:

a) reacción del compuesto de partida de fórmula general (II) (p.ej., fluoro-1-metiltriptamina-clorhidrato de la fórmula general (II)) con la adición de ácido de hidrato glicólico de la fórmula (III) y de una base a un compuesto de la fórmula general (IV)



b) descarboxilación del compuesto de fórmula general (IV) mediante la adición de un ácido y con calentamiento a un compuesto de la fórmula general (V) (p.ej., un fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina de la fórmula general (V))



c) la aromatización del compuesto de fórmula general (V) (p.ej. fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (V)) a un compuesto de la fórmula general (I) (p.ej. fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (I)) con la adición de un catalizador;

donde  $R^1 = -F$  y  $R^2 = -H$  o  $-F$  y esto sirve del mismo modo para los compuestos de fórmula general (I), (II), (IV) y (V),

o donde  $R^1 = H$  y  $R^2 = -F$  y esto sirve para los compuestos de fórmula general (I), (II), (IV) y (V).

**[0025]** Los fluoro-1-metiltriptaminclorhidratos están disponibles comercialmente como productos de salida (véase a abajo). En una realización preferida de la invención mediante la adición de la base en el paso a), se alcanza un valor de pH de entre 2 y 6, preferiblemente un valor de pH de entre 3 y 5 y preferiblemente particularmente un valor de pH de 4. En una realización preferida adicional, la cristalización del compuesto IV en un paso a) se promueve por la incubación en agua con hielo.

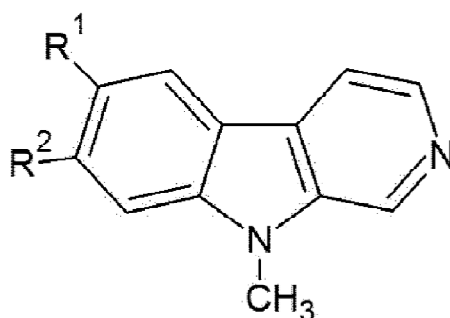
**[0026]** En una realización preferida adicional, la reacción en el paso b) bajo un gas inerte, es especialmente preferible en  $N_2$ . Además, preferiblemente, la cristalización del producto de reacción del paso b) mediante un paso b)' de incubación en frío, es particular preferiblemente para promover entre  $0^\circ C$  y  $5^\circ C$  durante varias horas. En una realización preferida adicional, la recristalización se lleva a cabo a partir de metanol para la purificación del producto de reacción del paso b) después de la cristalización. Además, es preferible disolver primero fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina (o el compuesto de fórmula general (V)) en el paso c) en agua y añadir una base, por ejemplo hidróxido de sodio o carbonato de sodio, a un pH básico, más preferiblemente un valor de pH entre pH 11 y pH 14, especialmente preferible pH. 13

**[0027]** En una forma de realización preferida, Pd / C, Pt / C,  $PdCl_2$ , Pd / sepiolita, Pd /  $SiO_2$  y Pd /  $AlO_4$  son posibles como catalizador de aromatización oxidativa en el paso c. Para expertos en la técnica, se conocen también aditivos adicionales que permiten la aromatización oxidativa. Sin embargo, se emplea preferiblemente Pd / C (*Paladium on carbon*, paladio sobre carbono activado) como catalizador.

**[0028]** Con la adición de una base en el paso a) y el paso c) puede tratarse independientemente el uno del otro de bases orgánicas o inorgánicas tales como NaOH, KOH,  $NH_4OH$ , hidróxido de tetraalquilamonio, lisina o arginina. Expertos en la técnica saben las bases que son adecuadas para realizar la reacción. Sin embargo, se prefieren KOH y NaOH.

**[0029]** Con la adición de un ácido en el paso b) puede tratarse de ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido hidroximaleico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido canforsulfónico, ácido quínico, ácido mandélico, ácido o-metilmandélico, ácido hidrogenbenzolsulfónico, ácido pícrico, ácido adípico, ácido d-o-toliltartárico, ácido tartrónico, ácido  $\alpha$ -toluico, (o-, m-, p-) ácido toluico, ácido sulfónico de naftilamina. El experto en la técnica es consciente de que el ácido en este caso es adecuado para llevar a cabo la reacción. Sin embargo, se prefiere ácido clorhídrico.

**[0030]** De acuerdo con otras formas de realización, la presente invención está dirigida a fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (I)



(I)

donde  $R^1 = -F$  y  $R^2 = -F$ , aún más preferiblemente donde  $R^1 = -H$  y  $R^2 = -F$ , y más preferiblemente donde  $R^1 = -F$  y  $R^2 = -H$ .

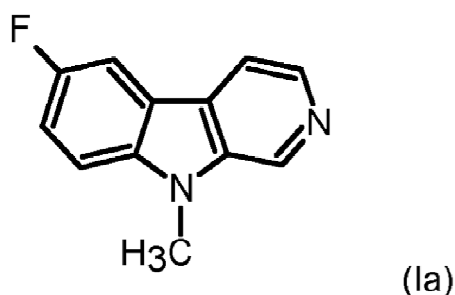
#### 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C)

[0031] De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, la presente invención comprende  $\beta$ -carbolina 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, cuya preparación y cuyo uso médico y compuesto farmacéutico contienen 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

[0032] El compuesto de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se abrevia en la presente memoria a "6F9M $\beta$ C" o "AC102". 9-metilo- $\beta$ -carbolina de la técnica anterior, sin embargo, se abrevia en lo sucesivo también a "9M $\beta$ C" o "AC002".

[0033] El compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina no se describe de modo individual, es decir, concreto, en el estado de la técnica. Además, se ha encontrado sorprendentemente que 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina según la invención promueve el uso terapéutico a través de propiedades particulares de la técnica anterior. De este modo, para 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de acuerdo con la invención, se pudo detectar mayor eficacia en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina en la promoción de la diferenciación neuronal en células de neuroblastoma humano (véase el Ejemplo 2). Además, 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina muestra lipofilia significativamente aumentada, lo cual se asocia con un aumento de la permeabilidad de la membrana. Esto tiene implicaciones de gran alcance para el uso terapéutico del compuesto novedoso para el tratamiento de enfermedades o daños en el oído interno. Como ya se ha descrito, membranas biológicas tales como la membrana timpánica, la membrana de la ventana redonda y las membranas de la escala media (Membrana tectoria y membrana de Reissner) forman una barrera natural para una sustancia activa en la forma de las células pilosas del oído interno. Esto es especialmente cierto en la aplicación tópica de un ingrediente activo en el tímpano o ventana redonda. Por lo tanto la disponibilidad del ingrediente activo se incrementa a las células diana a través del aumento de la permeabilidad de la membrana. Además de la permeabilidad de la membrana, la degradación de un fármaco en el cuerpo también tiene un papel vital en su eficacia, especialmente cuando se administra por vía sistémica, y también para los posibles efectos secundarios. Mientras que 9-metilo- $\beta$ -carbolina se degrada a través de una hidroxilación en la posición 6 y con una reacción de conjugación posterior, se bloquea esta vía metabólica en 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina por el grupo de fluoruro. De este modo, se pudo no solo incrementar la vida media de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, sino también reducir el riesgo de la formación de productos de degradación potencialmente tóxicos. Debido a la mayor eficacia de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina parece posible una dosis más reducida en comparación con otra 9-alquilo- $\beta$ -carbolina en la terapia. Esto de enorme importancia sólo para el tratamiento a largo plazo de las enfermedades crónicas, ya que se puede reducir la presión sobre el cuerpo y también los efectos secundarios no deseados.

[0034] La presente invención se refiere al compuesto 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula (Ia)



así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos, y compuestos complejos del compuesto mencionado.

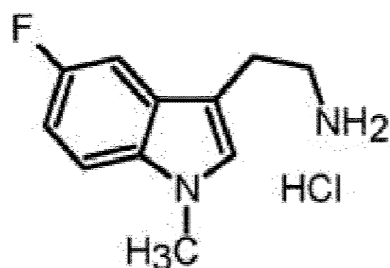
[0035] Tal como se utiliza aquí, el término profármaco se define como una sustancia farmacológica que se administra en una forma inactiva o menos activa. Después de la administración, se convierte en el cuerpo del paciente en su forma activa y eficaz, en el caso anterior la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

[0036] Como ácidos posibles, los cuales forman una sal de adición de ácido con el compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, se pueden mencionar los siguientes: ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido perclórico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido glucónico (glicon., ácido dextrónico), ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido tartrónico (ácido hidroximalónico, ácido hidroxipropanoico), ácido fumárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido malónico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, (o-, m-, p-) ácido toluico, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilenosulfónico,

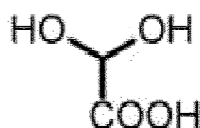
ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfónico, ácido, ácido canforsulfónico, ácido quínico (ácido quínico), ácido o-metilo-mandélico, ácido hidrogenbencensulfónico, ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol), ácido adípico, ácido do-toliltartárico, aminoácidos tales como metionina, triptófano, arginina y aminoácidos especialmente ácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Además, son posibles las formas de betaína.

[0037] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la preparación del compuesto según la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, que comprende las pasos de:

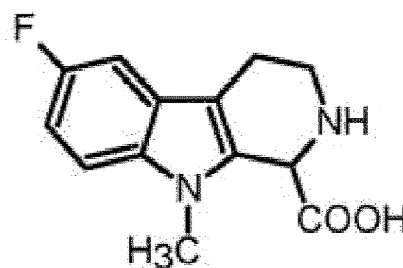
a) reacción del compuesto de salida 5-fluoro-1-metiltriptamina-clorhidrato de fórmula (IIa) con la adición de ácido de hidrato glioxílico de fórmula (III) y una base al compuesto de fórmula (IVa)



(IIa)

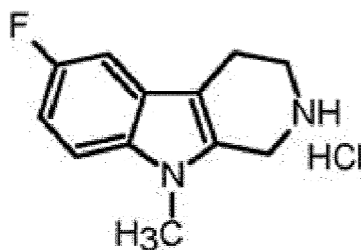


(III)



(IVa)

b) descarboxilación del compuesto de fórmula (IVa) con la adición de un ácido y con calentamiento para dar 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina de fórmula (Va)



(Va)

c) aromatización de 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina (Va) para dar 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia) con la adición de un catalizador.

[0038] El material de partida 5-fluoro-1-metiltriptaminclorhidrato está comercialmente disponible, por ejemplo a través de AKos GmbH (piedras). En una forma de realización preferida de la invención se logra mediante la adición de la base en el paso a) un valor de pH de entre 2 y 6, preferiblemente un valor de pH de entre 3 y 5 y especialmente preferiblemente un valor de pH de 4. En una forma de realización preferida adicional, la cristalización del compuesto IVa se consigue en el paso a)' mediante la incubación en agua con hielo.

[0039] En una realización preferida adicional, se logra la reacción en el paso b) bajo una atmósfera inerte, con especial preferencia en atmósfera de N<sub>2</sub>. Además, preferiblemente, se promueve la cristalización del producto de reacción del paso b) mediante un paso b)' de incubación en frío, especialmente preferiblemente entre 0°C y 5°C durante varias horas. En una realización preferida adicional, la recristalización se lleva a cabo a partir de metanol para la purificación del producto de reacción del paso b) después de la cristalización. Además, preferiblemente, la 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahydro- $\beta$ -carbolina se disuelve inicialmente en agua y alcalina en el paso c) mediante la adición de una base tal como hidróxido de sodio o carbonato de sodio, a un valor de pH básico, más preferiblemente un valor de pH de entre pH 11 y pH 14, especialmente preferiblemente pH. 13

[0040] En una realización preferida, entre otros Pd/C, Pt/C, PdCl<sub>2</sub>, Pd/sepiolita, Pd/SiO<sub>2</sub> y Pd/AlO<sub>4</sub> son posibles como catalizador de aromatización oxidativa en el paso c). Expertos en la técnica conocerán también aditivos

adicionales que permiten la aromatización oxidativa. Sin embargo, Pd/C (*paladio sobre carbono*, paladio sobre carbono activado) se usa preferiblemente como catalizador.

**[0041]** Con la adición de una base en el paso a) y el paso c) puede tratarse de forma independiente de bases orgánicas o inorgánicas tales como NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, hidróxido de tetraalquilamonio, lisina o arginina. El experto en la técnica conoce que las bases que son adecuadas para realizar la reacción. Sin embargo, se prefieren KOH y NaOH.

**[0042]** Con la adición de un ácido en el paso b) puede tratarse de ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, p-aminoácido benzoico, ácido p-hidroxibenceno, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilenosulfónico, ácido p-toluolsulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido canforsulfónico, ácido quínico, ácido mandélico, ácido o-metilmandélico, ácido hidrogenbencenosulfónico, Ácido pícrico, ácido adipico, ácido d-o-toliltartárico, ácido tartrónico,  $\alpha$ -ácido toluico, (o-, m-, p-) ácido toluico, ácido naftilaminasulfónico. El experto en la técnica es consciente de que el ácido es adecuado para la realización de la reacción. Sin embargo, se prefiere ácido clorhídrico.

**[0043]** Se ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia) tiene en comparación con  $\beta$ -Carbolina ya conocida y probada tales como 9-metilo- $\beta$ -carbolina un eficacia aumentada en el tratamiento de enfermedades del oído interno. Esto se reflejó tanto en los estudios sobre la expresión génica inducida por fármacos de los factores celulares importantes (véase el Ejemplo 4), que son de importancia para la regeneración celular (especialmente en el oído interno) después de traumas como en exámenes histológicos (véase el Ejemplo 6) y fisiológicos (véase el ejemplo 7) para la regeneración del sistema auditivo después de un trauma acústico éxito. Además, varios experimentos muestran un aumento de la lipofilia significativa (véase el Ejemplo 3) del compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia). En comparación con la misma sustancia 9-metilo- $\beta$ -carbolina existen las siguientes ventajas:

1. Se aumenta la permeabilidad de la membrana.
2. La eliminación se hace más lenta (tiempo de vida media de eliminación de 6F9M $\beta$ C circa 1,75 veces mayor que para 9M $\beta$ C).
3. Al conocerse que  $\beta$ -carbolinas se degradan por la hidroxilación en la posición 6 y reacción de conjugación posterior, mediante el bloqueo de esta vía de metabolización por el grupo de fluorescencia en la posición 6:

- la biodisponibilidad tras la administración oral se mejora.
- se minimiza el riesgo de metabolitos tóxicos o metabolitos potencialmente alergénicos.

4. Otra vía metabólica conocida de  $\beta$ -carbolinas, que genera productos de degradación demasiado tóxicos di-metilados, procede a través de la N-metilación secuencial in vivo, en la que primero el átomo de nitrógeno está metilado en la posición 2, y después el átomo de nitrógeno en la posición 9. En los experimentos actuales, se demostró que el 6F9M $\beta$ C, afortunadamente, no genera productos tóxicos di-metilados (véase el Ejemplo 8), por lo que se reduce aún más riesgo de metabolitos tóxicos.

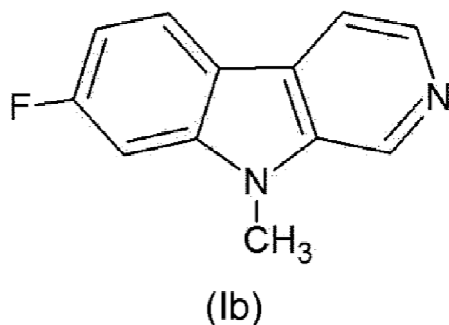
5. Eficacia mejorada en la expresión génica inducida por fármacos de los factores celulares importantes (véase el Ejemplo 4), que son de importancia para la regeneración celular (especialmente en el oído interno) después de traumas, así como en investigaciones histológicas (véase el Ejemplo 6) y fisiológicas (véase el ejemplo 7) para la regeneración del sistema auditivo después del logro de un trauma acústico.

#### **7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (7F9M $\beta$ C)**

**[0044]** Según una realización adicional, la presente invención comprende  $\beta$ -carbolina 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, cuya preparación y cuyo uso médico y composiciones farmacéuticas incluyen 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**[0045]** El compuesto de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se abrevia en el presente documento en ocasiones también a "7F9M $\beta$ C".

**[0046]** La presente invención se refiere a un compuesto de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula (Ib)



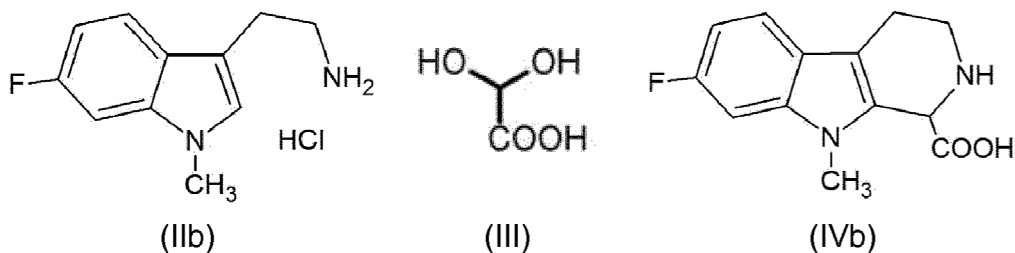
así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos, y profármacos y complejos del compuesto antes mencionado.

**[0047]** El término profármaco que se utiliza en el presente documento se define, como ya se ha explicado, como una sustancia farmacológica que se administra en una forma inactiva o menos activa. Después de la administración, se convierte en el cuerpo del paciente en su forma activa, eficaz, en el caso anterior, el 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina.

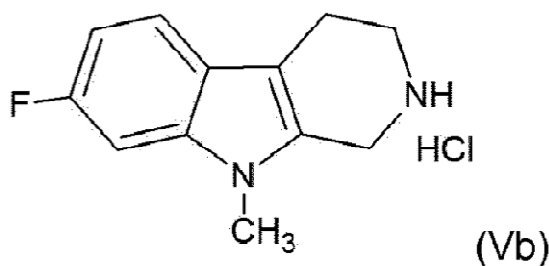
**[0048]** Como posibles ácidos, que forman una sal de adición de ácido con el compuesto de la invención 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina, se puede mencionar los siguientes: ácido sulfúrico, ácido sulfónico, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido nitroso, ácido perclórico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido glucónico (Glycon., dextrónico), ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido tartrónico (ácido hidroximalónico, ácido hidroxipropanoico), ácido fumárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido malónico, ácido hidroximaleico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, (o-, m-, p-) del ácido toluico, ácido benzoico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfónico naftilamina, ácido sulfanílico, ácido canforsulfónico, ácido quínico (ácido quínico), ácido o-metilo-mandélico, ácido hidrogenbencenosulfónico, ácido picrínico (2,4,6-trinitrofenol), ácido adípico, ácido do-toliltartárico, aminoácidos tales como metionina, triptófano, arginina, y en particular los aminoácidos tales como ácido glutámico o ácido aspártico. Además, formas de betaína son posibles.

**[0049]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para preparar el compuesto de la invención 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina, que comprende los siguientes pasos:

a) La reacción del compuesto de partida 6-fluoro-1-metiltriptamina-clorhidrato de la fórmula (IIb) con la adición de hidrato de ácido glioxílico de fórmula (III) y una base al compuesto de fórmula (IVb)



b) Descarboxilación del compuesto de la fórmula (IVb) con la adición de un ácido y bajo calentamiento para dar 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina de la fórmula (Vb)



5

c) aromatización de 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (Vb) para dar 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib) bajo adición de un catalizador.

10 **[0050]** El material de partida es 6-fluoro-1-metilriptaminclorhidrato disponible comercialmente, por ejemplo a través de la Otavachemicals Ltd. (Vaughan, Canadá). En una forma de realización preferida de la invención se alcanza mediante la adición de la base en el paso a) un pH de entre 2 y 6, preferiblemente entre 3 y 5 y especialmente preferiblemente un valor de pH de 4. En una forma de realización preferida adicional, la cristalización del compuesto IVb en un paso a)' promueve la incubación en agua con hielo.

15 **[0051]** En una forma de realización preferida adicional, la reacción en el paso b) se realiza en una atmósfera inerte, con especial preferencia en atmósfera de N<sub>2</sub>. Además, es preferible promover la cristalización del producto de reacción del paso b) por un paso b)' de incubación en el frío, en particular preferiblemente para promover entre 0°C y 5°C durante varias horas. En una forma de realización preferida adicional, la purificación del producto de reacción del paso b) después de la cristalización realiza una recristalización a partir de metanol. Además, se prefiere disolver 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -carbolina en el paso c) primero en agua y mediante la adición de una base, tal como hidróxido de sodio o carbonato de sodio, ajustar el pH a un valor básico, más preferiblemente un valor de pH de entre pH 11 y pH 14, con especial preferencia pH 13.

25 **[0052]** En una forma de realización preferida,) como catalizador de aromatización oxidativa en el paso c) son posibles entre otros Pd/C, Pt/C, PdCl<sub>2</sub>, Pd/sepiolita, Pd/SiO<sub>2</sub> y Pd/AlO<sub>4</sub>. Expertos en la técnica conocerán también aditivos adicionales que permiten la aromatización oxidativa. Sin embargo, se prefiere Pd/C (*Palladium on carbon*, paladio sobre carbón activado) como catalizador.

30 **[0053]** Con la adición de una base en el paso a) y el paso c) puede tratarse de modo independiente de bases orgánicas o inorgánicas tales como NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, tetraalquilamonio hidróxido, lisina o arginina. El experto en la técnica sabe las bases que son adecuadas para realizar la reacción. Sin embargo, se prefieren KOH y NaOH.

35 **[0054]** Con la adición de un ácido en el paso b) puede tratarse de ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico, ácido salicílico, ácido p-aminosalicílico, ácido malónico, ácido fumárico, ácido succínico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido sulfónico, ácido fosfónico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido fórmico, ácido propiónico, ácido glucónico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido pirúvico, ácido fenilacético, ácido benzoico, ácido hidroximaleico, ácido p-aminobenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido nitroso, ácido hidroxietanosulfónico, ácido etilensulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftilsulfónico, ácido sulfanílico, ácido canforsulfónico, ácido quínico, ácido mandélico, ácido o-metilmandélico, ácido hidrogenbencenosulfónico, ácido pícrico, ácido adipico, ácido d-o-toliltartárico, ácido tartrónico, ácido  $\alpha$ -toluico, (o-, m-, p-) ácido toluico, ácido sulfónico naftilamina. El experto en la técnica sabrá qué ácidos son adecuados para realizar la reacción. Sin embargo, se prefiere ácido clorhídrico.

45 **[0055]** Se ha encontrado sorprendentemente que el compuesto de la invención 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib) en comparación con  $\beta$ -carbolinas ya conocidas y probadas tales como 9-metilo- $\beta$ -carbolina, tienen una eficacia aumentada en el tratamiento de enfermedades del oído interno. En base a los estudios actuales sobre los ingredientes activos de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con la misma sustancia 9-metilo- $\beta$ -carbolina, existen, entre otras, las siguientes ventajas:

1. Se aumenta la permeabilidad de la membrana.
2. Se hace más lenta la eliminación (tiempo de vida media de eliminación de 7F9M $\beta$ C ca 1,5 veces mayor que para 9M $\beta$ C).
- 55 3. Eficiencia incrementada de la expresión génica inducida por fármacos de factores celulares importantes (véase el Ejemplo 4 y 5), que son importantes para la regeneración celular (especialmente en el oído interno) después de un trauma.

#### **Aplicaciones y formulaciones farmacéuticas**

60 **[0056]** Los compuestos de la invención son particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades o daños en el oído interno, en particular las estructuras neuronales y sensoriales del oído interno. Estas enfermedades o daños relacionados afectan especialmente la audición y el funcionamiento vestibular. Los síntomas asociados incluyen, entre otros, daños en la audición, pérdida de la audición, mareos, problemas de equilibrio, tinnitus, desorientación, náuseas y vómitos.

65

**[0057]** Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a los compuestos de la fórmula general (I) (o fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (I)) para su uso como un medicamento. También, la presente invención se refiere al compuesto 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina para su uso como un medicamento. También, la presente invención se refiere al compuesto de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina para su uso como un medicamento. El suministro de los presentes compuestos de la invención, en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, son particularmente adecuados para el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, en particular pérdida de audición neurosensorial. En las enfermedades y/o daños en el oído interno, se tratan especialmente de enfermedades agudas y crónicas del oído interno. Entre las enfermedades agudas del oído interno se encuentran el trauma acústico, el trauma de explosión de la oreja, la pérdida de audición y el trauma auditivo durante la implantación de prótesis de oído interno (trauma de inserción). Las enfermedades crónicas del oído interno incluyen, entre otros trauma acústico crónico (pérdida de la audición debido a la exposición crónica a ruido), la presbiacusia (audición relacionada con la edad), otosclerosis y la enfermedad de Meniere. La pérdida auditiva neurosensorial (también denominada pérdida de audición coclear o sensorial) incluye tanto la pérdida de audición debido a la exposición crónica a ruido (también conocida como pérdida de audición crónica o trauma acústico crónico), así como la presbiacusia (audición relacionada con la edad).

**[0058]** Otro aspecto de la presente invención se refiere por tanto a un compuesto de la fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para la aplicación en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, donde en las enfermedades y/o daños en el oído interno se trata de enfermedades y/o trastornos agudos del oído interno, seleccionados de entre el grupo consistente en trauma acústico, trauma por explosión del oído, la pérdida repentina de la audición y el trauma de inserción.

**[0059]** Otro aspecto de la presente invención se dirige por tanto a un compuesto de fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para la aplicación en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, donde en las enfermedades y/o daños del oído interno se trata de enfermedades crónicas del oído interno, seleccionadas del grupo que consiste en trauma crónico acústico, tinnitus y presbiacusia.

**[0060]** Además, los compuestos de la invención son adecuados para el tratamiento del vértigo y trastornos en el equilibrio causan una pérdida de audición o enfermedades del oído, causadas en particular por daños en el sentido del equilibrio en el oído y para mejorar la memoria, para aumentar la capacidad de aprendizaje y el aumento de la capacidad de retención, en particular, la memoria a corto plazo y la memoria a largo plazo.

**[0061]** Enfermedades y daños en el oído interno también pueden ser causados por sustancias ototóxicas, tales como antibióticos y/o citostáticos. Los compuestos de la invención, en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y con especial preferencia 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, son adecuados para el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, caracterizado porque el daño en el oído interno es debido a sustancias ototóxicas. En las sustancias ototóxicas se trata preferiblemente de antibióticos y/o fármacos citostáticos, en particular preferentemente de entre el grupo que comprende o que consiste en: ampicilina, baAMPcicilina, indanilo carbenicilina, mezlocilina, piperacilina, ticarcilina, amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, bencilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina, metilicina, oxacilina, penicilina G, penicilina V, piperacilina, tazobactam, ticarcilina, ácido clavulánico, nafcilina, cefalosporinas, cefadroxilo, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefapirina, cefradina, cefaclor, cefamandol, cefonicida, cefotetan, cefoxitina, cefprozilo, ceftmetazol, cefuroxima, loracarbef, cefdinir, ceftibuteno, cefoperazon, cefixima, cefotaxima, proxetilo de cefpodoxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona, cefepima, azitromicina, claritromicina, clindamicina, diritromicina, eritromicina, roxitromicina, telitromicina, cetromicina, espiramicina, ansimacina, oelandomicina, lincomicina, troleandomicina, cinoxacina, ciprofloxacina, enoxacina, gatifloxacina, grepafloxacina, levofloxacina, lomefloxacina, moxifloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, trovafloxacina, ácido oxolínico, gemifloxacina, perfloxacina, imipenem-cilastatina, meropenem, aztreonam, amikacina, gentamicina, kanamicina, neomicina, netilmicina, estreptomina, tobramicina, paromomicina, teicoplanina, vancomicina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina, tigeciclina, mafenida, sulfadiazina de plata, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfisoxazol, trimetoprima-sulfametoxazol, sulfametizol, rifabutina, rifampina, rifapentina, linezolid, estreptograminas, quinopristina, dalfopristina, bacitracina, cloranfenicol, fosfomicina, isoniazida, metenamina, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína, nitrofurazona, novobiocina, polimixina, espectinomicina, trimetoprima, colistina, cicloserina, capreomicina, etionamida, pirazinamida, ácido para-aminosalicílico, eritromicina-2-acetato, eritromicina-2-estearato, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, eritromicnglutamato, rifampicina, miconazol, ketoconazol, clotrimazol, econazol, bifonazol, butoconazol, fenticonazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, fluconazol, itroconazol, isavuconazol, ravuconazol, posaconazol, voriconazol, teraconazol, abfungina, terbinafina, amorolfina, naftifina, butenafina, anidulafungina, caspofungina, micafungina, ácido benzoico, ciclopiroxolamina, tolnaftato, 5-fluorocitosina, griseofulvina, haloprogina, ácido fusídico, gramicidina, pristamicina, ramoplanina, tirotricina, natamicina, rimocidina, filipina, nistatina, anfotericina B, candicina y hamicina.

**[0062]** Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente invención está dirigido a un compuesto de fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y en particular 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para su uso en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, en el que el daño al oído interno por sustancias ototóxicas es limitado.

**[0063]** Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos según la invención, en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para la fabricación de un medicamento para tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno. Una realización de la presente invención se refiere a un método para el tratamiento de enfermedades y/o daños del oído interno mediante la administración de un compuesto de la fórmula general (I), preferiblemente 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib), y especialmente preferiblemente de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia).

**[0064]** Además en este punto, se tomará un aspecto interesante adicional: Hemos encontrado en nuestros estudios a nivel celular que 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) aumenta la concentración de CREB por un factor 8 y aumenta la concentración de BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) hasta tres veces. Estos hallazgos sugieren que la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) de la invención se puede emplear no sólo en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno sino que también promueve el aprendizaje y la memoria.

**[0065]** Los mecanismos de aprendizaje y memoria subyacentes son extremadamente complejos. Se pueden ver a nivel molecular y celular, a nivel de la biología de sistemas y la psicología. Uno de los procesos clave para la formación de la memoria a nivel molecular es la activación del elemento de respuesta de proteína de unión AMPc (CREB). Esto conduce a la nueva formación de sinapsis, un proceso al que la formación de la memoria está acoplado en general. Este proceso se regula por muchos factores. Un refuerzo positivo se induce por el cerebro BDNF y su receptor TRKB. En los experimentos de biología del comportamiento (véase el Ejemplo 9) se pudo demostrar en el modelo animal de rata que la administración intraperitoneal de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) de la invención en comparación con animales de control no tratados aceleró los procesos de aprendizaje y mejoró la memoria,

**[0066]** Otro aspecto de la presente invención está por tanto dirigido a un compuesto de la fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina para la aplicación en la mejora del aprendizaje y la memoria y para aumentar la memoria, en el aumento de la capacidad de aprendizaje y de la capacidad de retención.

**[0067]** Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de los compuestos según la invención, en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para la preparación de una formulación farmacéutica para mejorar el aprendizaje y la memoria. Una forma ejemplar de la presente invención se refiere a un método para mejorar el aprendizaje y la memoria mediante la administración de un compuesto de la fórmula general (I), preferiblemente de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib) y se prefiere particularmente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia).

**[0068]** Otro aspecto de la presente invención está dirigida a un compuesto de general fórmula (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina para la aplicación en la mejora de los procesos de aprendizaje y/o memoria.

**[0069]** Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de los compuestos según la invención, en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, para preparar una formulación farmacéutica para mejorar los procesos de aprendizaje y/o memoria. Una realización de la presente invención se refiere a un método para la mejora de los procesos de aprendizaje y/o memoria mediante la administración de un compuesto de la fórmula general (I), preferiblemente de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib) y lo más preferiblemente de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia).

**[0070]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones para inyección que comprenden al menos uno de los compuestos de esta invención (o al menos un compuesto de fórmula general (I)).

**[0071]** Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones de inyección que comprenden uno o más de los compuestos de la invención (o uno o más compuestos de fórmula general (I)).

**[0072]** Sin embargo, otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones para inyección que comprenden 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**[0073]** Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones para inyección que contiene 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**[0074]** Sin embargo, otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones de inyección que comprende 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**[0075]** Por consiguiente, la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos en forma de gotas, ungüentos, sprays, liposomas, geles, emulsiones o soluciones de inyección que comprenden 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

5 **[0076]** Además, la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos que se prepararon usando al menos uno de los compuestos de la invención (o al menos un compuesto de fórmula general (I)) o una sal del mismo.

**[0077]** La presente invención se refiere también a compuestos farmacéuticos que se prepararon mediante el uso de uno o más de los compuestos de la invención (o uno o más compuestos de fórmula general (I)) o sus sales.

10 **[0078]** Además, la presente invención se refiere a compuestos farmacéuticos que se prepararon mediante el uso del compuesto de la invención 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina o una sal del mismo.

15 **[0079]** Además, la presente invención proporciona compuestos farmacéuticos que se prepararon mediante el uso del compuesto según la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina o una sal del mismo.

**[0080]** La presente invención también se refiere a compuestos farmacéuticos se prepararon mediante el uso del compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina o una sal del mismo, y el uso del compuesto de la invención 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina o una sal del mismo.

20 **[0081]** Del mismo modo, la presente invención se refiere compuestos farmacéuticos que se prepararon mediante el uso del compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y/o 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina o sales de los mismos.

25 **[0082]** Además de al menos un compuesto de la presente invención (o un compuesto de la fórmula general (I)), en particular junto a 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y lo más preferiblemente junto a 6-Fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, los compuestos farmacéuticos preferiblemente incluyen un vehículo, excipiente y/o disolvente farmacológicamente aceptable.

30 **[0083]** Además de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la presente invención, los compuestos farmacéuticos comprenden preferiblemente un vehículo, excipiente y/o disolvente farmacológicamente aceptable.

**[0084]** Los compuestos farmacéuticos, que contienen el compuesto de la invención, se pueden de preparar y administrar en la forma de sistemas de administración transdérmica (parches, lámina), gotas, píldoras, comprimidos, comprimidos recubiertos con lámina, comprimidos con lámina, grageas, geles, hidrogeles, ungüentos, jarabes, gránulos, supositorios, emulsiones, dispersiones, microcápsulas, cápsulas, microformulaciones, nano-formulaciones, liposomas, polvos, polvos de espolvoreo, pulverizaciones, aerosoles, soluciones, zumos, suspensiones, soluciones para soluciones de infusión o de inyección. Se prefieren compuestos farmacéuticos en forma de liposomas, geles y emulsiones. En particular, se prefieren formulaciones de hidrogel.

40 **[0085]** Tales composiciones son adecuadas para la administración, entre otros medios, por inhalación o por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, mucocutánea, oral, rectal, transdérmica, tópica, bucal, intradérmica, intragástrica, intracutánea, intranasal, intrabucal, percutánea, intratimpánica o sublingual. Se prefiere particularmente la administración o inyección en el oído medio, así como la administración tópica en el tímpano.

45 **[0086]** Como vehículo farmacológicamente aceptable se puede aplicar, por ejemplo, lactosa, almidón, sorbitol, sacarosa, celulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, talco, manitol, alcohol etílico y similares. Polvos, así como tabletas pueden estar presentes a 5 a 95 % en peso de un portador semejante.

50 **[0087]** Además, se pueden añadir los compuestos farmacéuticos o disgregantes, colorantes, aromatizantes y/o aglutinantes.

**[0088]** Las formulaciones líquidas incluyen soluciones, suspensiones, aerosoles y emulsiones. Por ejemplo, las inyecciones de solución, a base de glicol-agua o agua-propilenglicol para inyección parenteral. Para preparar supositorios, se utilizan ceras de bajo punto de fusión, ésteres de ácidos grasos y glicéridos.

55 **[0089]** Las cápsulas se preparan, por ejemplo, de celulosa de metilo, alcoholes de polivinilo, o gelatina desnaturalizada o almidón. Como almidón disgregante, se puede emplear carboximetilo de almidón sódico, gomas naturales y sintéticas tales como goma de algarroba, karaya, guar, tragacanto y agar, y derivados de celulosa tales como metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa microcristalina y alginatos, arcillas y bentonitas. Estos ingredientes se pueden utilizar en cantidades de 2 a 30 % en peso.

60 **[0090]** Como aglutinante, se puede emplear azúcar, almidón de maíz, arroz o patatas, gomas tanto naturales como sintéticas tales como goma de acacia o goma de guar, gelatina, tragacanto, ácido alginico, alginato de sodio, alginato de calcio y amonio, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa de hidroxipropilo, polivinilpirrolidona, poliétilenglicol, ceras, y se añaden compuestos inorgánicos tales como silicatos de aluminio de

magnesio. Los aglutinantes pueden aplicarse en cantidades de 1 a 30 % en peso.

**[0091]** Como lubricante, se emplean estearatos como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de potasio, ácido esteárico, ceras de alto punto de fusión, y lubricantes solubles en agua tales como cloruro de sodio, benzoato de sodio, acetato de sodio, oleato de sodio, polietilenglicol, ácido bórico y aminoácidos tales como leucina. Tales lubricantes se pueden utilizar en cantidades de 0,05 a 15 % en peso.

**[0092]** De este modo se prefieren todas las formulaciones farmacéuticas adecuados para la administración del ingrediente activo localmente a la membrana de ventana redonda. Se prefiere además que las formulaciones farmacéuticas contengan un promotor de penetración de membrana, el cual apoya el paso del compuesto de la fórmula general (I), en particular de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y en particular preferiblemente de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina a través de la membrana de ventana redonda. De acuerdo con ello, se prefieren particularmente las formulaciones líquidas o en gel. Por supuesto, también es posible administrar el fármaco por vía oral.

**[0093]** Los compuestos farmacéuticos para cualquier vía de administración de los compuestos de la fórmula general (I) contienen una cantidad de compuesto/s de la fórmula general (I) suficiente para el efecto terapéutico y, si es necesario, vehículos farmacéuticamente aceptables orgánicos u inorgánicos, sólidos o líquidos. Los compuestos farmacéuticos adecuados para la administración tópica en el oído medio incluyen soluciones acuosas o suspensiones que se pueden preparar antes de la administración en el oído medio, por ejemplo, en el caso de formulaciones liofilizadas que contienen el compuesto de la fórmula general (I), eventualmente junto con un vehículo.

**[0094]** Los compuestos farmacéuticos para cualquier vía de administración de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina contienen un efecto terapéutico suficiente para la cantidad de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y, si es necesario, vehículos farmacéuticamente aceptables inorgánicos u orgánicos, sólidos o líquidos. Compuestos farmacéuticos, adecuados para la administración tópica en el oído medio, incluyen soluciones acuosas o suspensiones que se pueden preparar antes de la administración en el oído medio, por ejemplo, en el caso de formulaciones liofilizadas, las cuales contienen 7-fluoro-9- metilo- $\beta$ -carbolina solo o junto con un vehículo.

**[0095]** Los compuestos farmacéuticos para cualquier vía de administración de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina contienen un efecto terapéutico suficiente para la cantidad de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y, si es necesario, vehículos farmacéuticamente aceptables inorgánicos u orgánicos, sólidos o líquidos. Compuestos farmacéuticos, adecuadas para la administración tópica en el oído medio, incluyen soluciones acuosas o suspensiones que se pueden preparar antes de la administración en el oído medio, por ejemplo, en el caso de formulaciones liofilizadas, 6-fluoro-9- metilo- $\beta$ -carbolina sola o incluida con un vehículo.

**[0096]** Los compuestos farmacéuticos comprenden además geles, a base de microesferas biológicamente degradables o no biodegradables, acuosas o no acuosas. Ejemplos de tales geles incluyen poloxámeros, hialuronatos, xiloglucanos, quitosanos, poliésteres, polilactidas, poliglicolide o su co-polímero PLGA, isobutirato de acetato de sacarosa y monooleato de glicerina. Los compuestos farmacéuticos que son adecuados para la administración enteral o parenteral incluyen tabletas o cápsulas de gelatina o soluciones acuosas o suspensiones como se describe anteriormente.

**[0097]** Los compuestos farmacéuticos pueden estar esterilizados y/o contener adyuvantes, por ejemplo, conservantes, estabilizantes, agentes, humectantes y/o emulsionantes, sales para regular la presión y/o tampones osmóticos. El compuesto farmacéutico de la invención puede, si se desea, contener otros ingredientes activos. Estos compuestos farmacéuticos se pueden preparar por cualquier método que se conoce de la técnica anterior, se pueden preparar, por ejemplo, por métodos convencionales tales como mezclado, granulación, confección, disolución y liofilización y pueden variar desde aproximadamente 0,01 a 100 por ciento en peso, preferiblemente entre 0,1 y 50 por ciento en peso, liofilizados hasta 100 por ciento en peso de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. Estos compuestos farmacéuticos pueden estar presentes también en aproximadamente 0,01 a 100 por ciento en peso, preferiblemente entre 0,1 y 50 por ciento en peso, liofilizados hasta un 100 por cien en peso de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. Estos compuestos farmacéuticos pueden estar presentes también en aproximadamente 0,01 a 100 por ciento en peso, preferiblemente entre 0,1 y 50 por ciento en peso, liofilizados hasta 100 por ciento en peso de compuestos de la fórmula general (I)

**[0098]** En una forma de realización preferida, se formula el compuesto farmacéutico de la invención para la administración tópica. Vehículos adecuados para la administración otogénica son sustancias orgánicas o inorgánicas, que son farmacéuticamente aceptables y que no reaccionan con un compuesto de la invención y/o más ingredientes activos, por ejemplo, solución salina, alcoholes, aceites vegetales, alcoholes bencílicos, glicoles de alquilo, polietileno, triacetato de glicerina, gelatina, carbohidratos tales como lactosa o almidón, carbonato de magnesio (magnesia, tiza), estearato (ceras), talco y petrolato (vaselina). Las composiciones descritas pueden estar esterilizadas y/o auxiliares como lubricantes, conservantes, tales como timerosal (por ejemplo, 50 % en peso), estabilizantes y/o agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, sustancias de tampón, sustancias colorantes y/o saborizantes. Estas composiciones también pueden contener una o más sustancias. De acuerdo con la invención, composiciones otogénicas pueden comprender varios materiales y/o sustancias, incluyendo otras sustancias biológicamente activas, por ejemplo, otros ingredientes activos biológicos,

como antibióticos, sustancias antiinflamatorias tales como esteroides, cortisona, analgésicos, antipirina, benzocaína, procaína.

**[0099]** Las composiciones de la invención para la administración tópica pueden incluir otras sustancias y/o sustancias farmacéuticamente aceptables. En realizaciones preferidas de la presente invención, se selecciona un excipiente tópico que no fortalece la administración de los compuestos de la fórmula general (I), en particular, 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y particularmente preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y opcionalmente además sustancias activas o las sustancias activas en el sistema circulatorio de la sangre o en el sistema nervioso central cuando se administra a la oreja, en el oído medio o en el canal auditivo. Posibles vehículos incluyen ácidos hidroxicarboxílicos, agente de absorción anhidro tal como petrolato hidrófilo (vaselina), y lanolina anhidra (por ejemplo, Aquaphor®), y medios basados en emulsiones de agua-en-aceite tales como lanolina y *crema fría*. Más preferidos son vehículos que son sustancialmente no exclusivos y típicamente incluyen aquellos excipientes, que son solubles en agua, así como los materiales a base de emulsiones aceite-en-agua (cremas o ungüentos hidrofilicos) y sustancia de base soluble en agua tal como excipientes y soluciones acuosas a base de glicol de polietileno, que se gelifican con varios agentes como metilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa.

**[0100]** Para la administración oral en forma de comprimidos o cápsulas, un compuesto de la invención puede ser mezclado en general con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables seleccionados de la lista que comprende agentes aglutinantes tales como almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa; material de relleno tales como lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, sorbitol y otros azúcares reductores y no reductores, celulosa microcristalina, sulfato de calcio o fosfato de hidrógeno de calcio; lubricantes tales como estearato de magnesio, talco o sílice, ácido esteárico, estearilo de fumarato sódico, behenato de glicerilo, estearato de calcio y similares; agentes tales como almidón de patata o almidón de glicolato sódico de desintegración; humectantes tales como dodecilo de sulfato sódico; colorantes; agentes aromatizantes; gelatina; edulcorantes; gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginatos; sales de tampón; carboximetilcelulosa; polietilenglicol; ceras y similares.

**[0101]** Los comprimidos pueden recubrirse con una solución concentrada de azúcar que contiene goma árabe, por ejemplo, puede contener gelatina, talco, dióxido de titanio y similares. En otra realización, los comprimidos se pueden revestir con un polímero que se disuelve en un disolvente orgánico fácilmente volátil o mezcla de disolventes orgánicos. En realizaciones preferidas, los compuestos de la fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina como un comprimido formulado para liberación inmediata o en forma de tabletas para liberación sostenida. Formas de dosificación para la liberación inmediata permiten la liberación de una gran parte o de la cantidad total de un compuesto de fórmula general (I) dentro de un período tan corto como 60 minutos o menos, y permiten la rápida absorción del compuesto de la invención. Formas de liberación sostenida permiten la liberación sostenida durante un período de tiempo más largo para alcanzar niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces de un compuesto de fórmula general (I) y/o para mantener estables estos niveles plasmáticos terapéuticamente eficaces durante un período prolongado y/u para modificar otras propiedades farmacocinéticas de los compuestos de fórmula general (I), en particular de 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y en particular preferiblemente de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**[0102]** Para la formulación de cápsulas de gelatina blanda, se puede mezclar un compuesto de la invención, por ejemplo, con un aceite vegetal o glicol de polietileno. Cápsulas de gelatina dura pueden incluir un compuesto de la invención en forma de gránulos incluidos utilizando los excipientes mencionados anteriormente para tabletas, tales como lactosa, sacarosa, manitol, almidones tales como almidón de patata, almidón de maíz o amilopectina, derivados de celulosa o gelatina general. También formas líquidas o semi-líquidas del compuesto activo se pueden llenar en cápsulas de gelatina dura.

**[0103]** Los compuestos de la invención de la fórmula general (I), en particular 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y más preferiblemente 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, pueden introducirse también en microesferas o microcápsulas, las cuales se producen por ejemplo a partir de ácido poliglicólico/ácido láctico (PGLA). Polímeros biocompatibles, seleccionados de la lista que comprende ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico y poliglicólico, poli- $\epsilon$ -caprolactona, ácido polihidroxi butírico, polioetoester, poliacetales, polihidropurano, policianoacrilatos y copolímeros de bloque anfipáticos de hidrogeles se pueden utilizar para proporcionar una liberación controlada para conseguir la liberación de un compuesto de la invención a partir de los compuestos farmacéuticos de la presente invención.

**[0104]** En una forma de realización adicional de la invención los compuestos de fórmula general (I), en particular el 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, y más preferiblemente el 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, se prevén como una formulación líquida para administración oral. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden proporcionarse en la forma de soluciones, jarabes, emulsiones o suspensiones. Alternativamente, las formulaciones líquidas para administración oral pueden producirse por reconstitución de la formulación seca para la administración oral con agua o con otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones para administración oral pueden formularse de manera que se logre una liberación controlada o sostenida de un compuesto de acuerdo con la invención y opcionalmente otros agentes activos.

**[0105]** Para la administración oral en forma líquida, se pueden emplear un compuesto de la invención con sustancias de portador farmacéuticamente aceptables no tóxicas inertes tal como etanol, glicerol, agua; agentes de suspensión tales como jarabe de sorbital, derivados de celulosa o grasas comestibles endurecidas; emulsionantes tales como lecitina, o acacia; vehículos no acuosos tales como aceite de almendra, ésteres oleosos, etanol o aceites vegetales fraccionados; conservantes tales como p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico; y similares. Estabilizadores tales como, por ejemplo, antioxidantes como butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno, galato de propilo, ascorbato de sodio, ácido cítrico también se pueden utilizar para estabilizar la forma de dosificación. Por ejemplo, las soluciones pueden contener de aproximadamente 0,2% en peso hasta aproximadamente 20% en peso de un compuesto de acuerdo con la invención, con lo que la masa de equilibrado puede ser azúcar y una mezcla de etanol, agua, glicerol y propilenglicol. Opcionalmente, estas formulaciones líquidas pueden contener agentes saborizantes, colorantes, sacarina, celulosa carboxílica como espesante y/u otros excipientes.

**[0106]** En otra realización, una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención se administra por vía oral a través de una solución, pudiendo contener la solución un conservante, un edulcorante, un solubilizante y un disolvente. La solución para la administración oral puede contener uno o más tampones, aromatizantes u otros excipientes. En otra realización, se añade hierbabuena u otro aromatizante a la solución del compuesto de la invención para la administración oral.

**[0107]** Para la administración por inhalación, un compuesto de acuerdo con la invención se puede administrar de un modo adecuado, tal como por pulverización de aerosol con paquetes presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, tal como diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. Cuando se utiliza un aerosol presurizado, la dosificación puede determinar que se proporcione una válvula para extender una cantidad medida a administrar. Las cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para uso en inhaladores o insufladores, pueden formularse de tal forma que las cápsulas y los cartuchos contengan una mezcla en polvo del compuesto de la invención y opcionalmente otro o más de otros ingredientes activos y un material de base en polvo adecuado tal como lactosa o almidón.

**[0108]** Las soluciones para administración parenteral por inyección se pueden preparar a partir de una solución acuosa de una sal farmacéuticamente aceptable soluble en agua de un compuesto de la invención, en particular, 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y de modo particularmente preferible 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, a una concentración de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 10% en peso. Estas soluciones pueden también contener estabilizantes y/o sustancias de tampón y pueden proporcionarse en viales con diferentes unidades de dosificación apropiada.

**[0109]** Por lo tanto, los compuestos de la invención que se presentan aquí, en particular, 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina y especialmente preferiblemente, 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, son útiles para la preparación de compuestos farmacéuticos para el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno. Con ello, en las enfermedades y/o daños en el oído interno se trata preferiblemente del tratamiento de enfermedades agudas y/o crónicas del oído interno. Entre las enfermedades agudas del oído interno se incluye el trauma acústico, trauma por explosión del oído, pérdida de audición y el trauma de inserción. Entre los trastornos crónicos del oído interno se incluyen trauma crónico acústico, tinnitus y la presbiacusia. Las enfermedades y/o daños en el oído interno también se pueden caracterizar por deberse a sustancias ototóxicas.

#### Descripción de las figuras

##### **[0110]**

**Fig.1:** El esquema de reacción para la reacción de tres pasos de fluoro-1-metiltriptamina (como clorhidrato) de la fórmula general (II) y hidrato de ácido glioxílico (III) a través del producto intermedio de la fórmula general (IV) y fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (V) a fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la fórmula general (I). Aquí, o bien  $R^1$  es -F y  $R^2$  es -H o -F y esto se aplica para los compuestos de fórmula general (I), (II), (IV) y (V), o  $R^1 = H$  y  $R^2 = -F$  y esto se aplica del mismo modo para los compuestos de fórmula general (I), (I I), (IV) y (V).

**Fig. 1a:** El esquema de reacción para la reacción de tres pasos de hidrocloreto de 5-fluoro-1-metiltriptamina (IIa) y hidrato de ácido glioxílico (III) a través del producto intermedio (IVa) y 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (Va) para 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ia).

**Fig. 1b:** El esquema de reacción para la reacción de tres pasos de clorhidrato de 6-fluoro-1-metiltriptamina (IIb), y hidrato de ácido glioxílico (III) a través del producto intermedio (IVb) y 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro- $\beta$ -carbolina (Vb) para dar 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (Ib).

**Fig. 2:** SH-SY5Y-línea celular de 15 días de incubación con AC102 (6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina)

**Fig. 3:** SH-SY5Y-línea celular de 15 días de incubación con AC002 (9-metilo- $\beta$ -carbolina)

**Fig. 2 y 3:** muestran el cultivo de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) que se expondrían con crecientes

concentraciones de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (AC102) durante 15 días (Fig. 2). En comparación, en la Fig. 3 se muestra el efecto de 9-metilo- $\beta$ -carbolina bajo las mismas condiciones (AC002), respectivamente. La fila superior procede del experimento actual con la concentración de 70  $\mu\text{mol/L}$ , mientras que la fila inferior muestra la dependencia de la concentración de un experimento anterior. El compuesto de la invención (AC102) inhibe la proliferación de las células e induce la germinación de las proyecciones delgadas y un cambio en el tamaño y forma de las células. Esto se puede explicar con la inducción de una diferenciación. Este efecto del compuesto se hace particularmente evidente en la comparación de las concentraciones 0  $\mu\text{M}$  (control) y 30  $\mu\text{M}$  a ambos puntos de tiempo.

**Fig. 4:** Cromatograma de HPLC de 9-metilo- $\beta$ -carbolina (9M $\beta$ C, AC002) y 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C, AC102). Los tiempos de retención fueron 5,3 y 7,3 min. Columna: Phenomenex Luna 3uC18 (2) 100A; Eluyente: ACN90%/NH<sub>4</sub>Ac 40 mM [45/55]

**Fig. 5** muestra la relativa expresión de genes de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, **Fig. 5A**), de Lif (*Leukemia inhibitory factor*, **Fig. 5B**) de NT3 (*neurotrophin 3*, **Fig. 5C**) de Id2 (*inhibitor of Differentiation 2*, **Fig. 5D**) de BTG2 (*B-cell translocation gene 2*, **Fig. 5E**), de CBLN (*Cerebellin 1 precursor Protein*, **Fig. 5F**) de DRD2S (*variante corta del subtipo 2 de receptor de dopamina*, **Fig. 5H**) de DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*, **Fig. 5I**) y el cociente Bax/Bcl-2 (**Fig. 5G**) en cada caso después de la exposición de 2 días (vigas gris claro), 7 días (vigas gris oscuro) y 14 días (vigas negras) de células SH-SY5Y a 6F9M $\beta$ C (10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ ) o 9M $\beta$ C (30  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , y 70  $\mu\text{M}$ ). La expresión génica relativa significa la expresión de cada factor relativo a las condiciones de control.

**Fig. 6** muestra la expresión génica relativa de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, **Fig. 6A**) de Lif (*Leukemia inhibitory factor*, **Fig. 6B**) de DRD2S (*variante corta del subtipo 2 de receptor de dopamina*, **Fig. 6C**) y de DKK1 (*Dickkopf-related Protein 1*, **Fig. 6D**) en cada caso después de exposición de 2 días (vigas gris claro), 7 días (vigas gris oscuro) y 14 días (vigas negras) de células SH-SY5Y a 7F9M $\beta$ C. La expresión génica relativa significa la expresión del factor respectivo con relación a las condiciones de control.

**Fig. 7** Micrografías de fluorescencia de secciones de cóclea después de la tinción inmunohistoquímica con faloidina (etiquetadas con Alexa Fluor® 488) de un conejillo de Indias después de un trauma acústico, en el que un oído está tratado con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C, un total de 0,105 mg por oído) (**Fig. 7B**) y el segundo oído no tratado se utilizó como control intra-individual (también conocido como "contr." **Fig. 7A**). Las células internas de pelo (IHC) y las tres filas (I, II, III) de células ciliadas externas (OHC) también son visibles. Las células muertas están marcadas con flechas blancas y demuestran el efecto nocivo del trauma acústico. Escala = 25  $\mu\text{M}$ .

**Fig. 8** Micrografías de fluorescencia de secciones de cóclea después de la tinción inmunohistoquímica con faloidina (etiquetadas con Alexa Fluor® 488) de un conejillo de Indias después de un trauma acústico, en el que un oído se trata con 9-metilo- $\beta$ -carbolina (9M $\beta$ C, en total 0,2 mg por oído) (**Fig. 8B**) y el segundo oído no tratado sirve como control intra-individual (también conocido como "contr.", **Fig. 8A**). Las células internas de pelo (IHC) y células ciliadas externas (OHC) también son visibles. Células muertas están marcadas por flechas blancas y demuestran el efecto dañino de los traumas acústico. Escala = 100  $\mu\text{M}$ .

**Fig. 9** muestra el desplazamiento permanente del umbral de audición en el conejillo de Indias después de un trauma acústico inducido acústicamente, en el que un oído se trató después del trauma con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C, un total de 0,18 mg por oído) y el segundo oído no tratado sirvió como control intra-individual (contr.). El umbral de audición se determinó mediante medición la del potencial del tronco encefálico acústicamente evolucionado, midiéndose 3 días antes del trauma por ruido acústico (D-3), 30 minutos después del trauma acústico (D0), así como 14 días después del trauma acústico (D14). El desplazamiento permanente del umbral de audición se calcula a partir de los valores medidos D14 - D3. Los valores mostrados son valores promedio de cuatro mediciones independientes (n = 4).

**Fig. 10:** En la Fig. 9, sin embargo, se muestra la recuperación de los umbrales auditivos en el conejillo de Indias de acuerdo con cualquier trauma acústico acústicamente inducido. Esto se calcula a partir de los valores medidos D0 - D14. Los valores mostraron en general valores medios a partir de cuatro mediciones independientes (n = 4).

**Fig. 11** muestra la recuperación de los umbrales auditivos en el conejillo de Indias de acuerdo con cualquier trauma acústico acústicamente inducido, en el que una oreja después del trauma acústico se trató con 9-metilo- $\beta$ -carbolina (9M $\beta$ C, un total de 0,2 mg por oído) y la segunda oreja no tratada sirvió como control intra-individual (contr.). El umbral de audición se determinó mediante medición la del potencial del tronco encefálico acústicamente evolucionado, midiéndose 3 días antes del trauma acústico (D-3), después del trauma acústico (D1) y 14 días después del trauma acústico (D14). La recuperación de los umbrales de audición se calcula a partir de los valores medidos D1 - D14.

**Fig. 12:** Como se muestra en la Fig. 11, se administró 0,35 mg de 9-metilo- $\beta$ -carbolina por oído.

**Fig. 13:** Los cromatogramas de HPLC de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina no tratada (6F9M $\beta$ C, **Fig. 13A**), 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se incubaron durante 1 h con homogeneizado de hígado (**Fig. 13B**), 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (6F29DM $\beta$ C, **Fig. 13C**) y 2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (29DM $\beta$ C, **Fig. 13D**). Los tiempos de retención

eran 19,0 min (6F9MβC & hígado + 6F9MβC), 10,1 min (6F29DMβC) y 9,1 min (29DMβC). Columna: Phenomenex Luna 3uC18 (2) 100A; Eluyente: ACN90%/NH<sub>4</sub>Ac 40 mM [45/55]

## Ejemplos

### Ejemplo 1a Síntesis de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina

[0111] De manera análoga al método de Ho y Walker (Beng T. Ho y K.E. Walker; Org. Synth. 1971, 51, 136 o Org. Synth. 1988, Coll. Vol. 6, 965) se disuelven en 10 mL de agua 3,5 mmol (800 mg) de 5-fluoro-1-clorhidrato de metilotriptamina (**Figura 1a, Fórmula IIa**, AKos GmbH, piedras) y se trató con una solución de 3,9 mmol (356,4 mg) hidrato de ácido glioxílico (**1a, Fórmula III**) en 810 µL de agua unida. Con agitación, a continuación, se añade con una pipeta una solución de 3,4 mmol (190,4 mg) de hidróxido de potasio, en el que el pH se ajusta a aproximadamente 4. La mezcla de reacción se agita durante 3 h a temperatura ambiente y se coloca en un baño de hielo durante una hora adicional para completar la cristalización. El precipitado beige anaranjado de la betaína (**1a, Fórmula IVa**) se separa por filtración y se lava con una cantidad de agua con hielo.

[0112] Para la descarboxilación, se transfiere la torta de filtro aún húmeda de la betaína (**1a, fórmula IVa**) a un matraz y se disuelve en ácido clorhídrico diluido (6,48 mL de agua y 918 µL de ácido clorhídrico concentrado). La mezcla de reacción se calienta a reflujo bajo nitrógeno durante 10 min, de nuevo 945 µL de ácido clorhídrico concentrado se añade a través de un septo y se somete a reflujo durante otros 15 min. A continuación, la solución se vuelve a la temperatura ambiente y 12 h se almacena a 0-5°C. Los cristales resultantes de la 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina (**1a, Fórmula Va**) se filtran y se recrystalizan a partir de metanol. Rendimiento: 230 mg (52%).

[0113] Para la aromatización se disuelve 230 mg de 6-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina (**Figura 1a, Fórmula Va**) en 15 mL de agua, con hidróxido de sodio a pH 13 y se extrae con una mezcla de acetato de etilo y tolueno (1: 1) 3 x. Las capas orgánicas purificadas se secan con sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y se evaporan bajo presión reducida. El residuo oleoso se recoge en 50 mL de tolueno, se le añade 100 mg de Pd/C (10%) y somete a reflujo durante 24 h. De la solución todavía caliente Pd/C se separa por filtración y la torta del filtro se lava con 20 mL de tolueno caliente. La fase orgánica se evapora a vacío. El residuo oleoso de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina (**Figura 1a, Fórmula Ia**) se cristaliza en reposo, y forma 183 mg (96%) de cristales amarillos.

Punto de fusión: 117-118°C; GC/MS para la base libre: m/z = 201 (10%), 200 (100%), 199 (71%), 185 (13%), 145 (6%), 131 (6%), <sup>1</sup>H RMN: δ (ppm) de metanol d<sub>4</sub>, 400 MHz: 3,80, s, 3H, N-CH<sub>3</sub>; 7,34, m, <sup>1</sup>H; 7,43, m, <sup>1</sup>H; 7,73, m, <sup>1</sup>H; 7,91, m, <sup>1</sup>H; 8,24, m, <sup>1</sup>H; 8,73, m, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-RMN: δ (ppm) Metanol d<sub>4</sub>, 100 MHz: 28,23; 106,38; 106,64; 110,20 y 110,29, d; 114,67; 116,25; 116,52; 120,59 y 120,66, d; 127,91; 131,30; 136,95; 137,51; 138,35; 156,20 y 158,55, d,

Análisis elemental: para C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub> x 0,1 H<sub>2</sub>O x 0,1 tolueno: C, H, N,  
Calculado: C: 72,21; H: 4,77; N: 13,26, Encontrado: C: 72,01; H: 4,55; N: 13,45

### Ejemplo 1b Síntesis de 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina

[0114] De manera análoga a la síntesis de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina en 10 mL de agua 3,5 mmo I (800 mg) de clorhidrato de 6-fluoro-1-metiltriptamina (**Figura 1b, Fórmula IIb**, Otavachemicals Ltd., Vaughan, Canadá) y se trató con una solución de 3,9 mmol (356,4 mg) hidrato de ácido glioxílico (**Figura 1b, Fórmula III**) en 810 µL de agua. Bajo agitación, después se añade con pipeta una solución de 3,4 mmol (190,4 mg) mediante hidróxido de potasio, ajustándose el pH a aproximadamente 4. La mezcla de reacción se agita durante 3 h a temperatura ambiente y se coloca durante otra hora en un baño de hielo para completar la cristalización. El precipitado beige anaranjado de la betaína (**Figura 1b, Fórmula IVb**) se separa por filtración y se lava con un poco de agua con hielo. Para la descarboxilación de la torta del filtro aún húmeda es de la betaína (**Figura 1b, Fórmula IVb**) se transfiere a un matraz y se disuelve en ácido clorhídrico diluido (6,48 mL de agua y 918 µL de ácido clorhídrico concentrado) se disuelve. La mezcla de reacción se calienta a reflujo bajo nitrógeno durante 10 min, de nuevo 945 µL de ácido clorhídrico concentrado se añade a través de un septum y de nuevo a reflujo durante 15 min. A continuación, la solución se vuelve a la temperatura ambiente y 12 h a 0-5°C almacenado, en el que 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina falla como sal de HCl (**Figura fórmula 1b Vb**). Los cristales resultantes se separan por filtración y se recrystalizan en metanol. Rendimiento: 1 mmol y 250 mg (28%).

[0115] Para la aromatización se disuelve 250 mg de 7-fluoro-9-metilo-2,3,4,9-tetrahidro-β-carbolina x HCl (**Figura 1b, Fórmula Vb**) en 15 mL de agua, se disuelve en solución de hidróxido de potasio a pH 13 y se almacena en el refrigerador durante la noche. La base libre se cristaliza como un sólido cristalino beige que se filtra, se lava con agua y se seca a vacío. El sólido se suspende en 50 mL de tolueno, se coloca con 100 mg de Pd/C (10%) y 8 h se calienta a reflujo (DC como control de conversión). De la solución todavía caliente se separa Pd/C por filtración y la torta del filtro se lava con 20 mL de tolueno caliente. La fase orgánica se evapora a vacío. El residuo aceitoso de 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina (**Figura 1b, Fórmula Ib**) se cristaliza al dejarse en reposo, y forma cristales de color amarillo mostaza que purifican cromatografía en columna (CHCl<sub>3</sub>/metanol 9: 1). Se mantienen 160 mg (80%).

**Ejemplo 2: Diferenciación de células de neuroblastoma humano (SH-SY5Y)**

[0116] La línea celular SH-SY5Y se obtuvo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares - DSMZ, Braunschweig. Las células se cultivaron en MEM (medio esencial mínimo, Life Technologies) suplementado con 10% de FCS (suero de ternero fetal, Biochrom AG) y penicilina/estreptomicina (Biochrom AG). Para los estudios morfológicos, las células se sembraron con 1 mL de medio a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> en placas de 24 pocillos (Falcon, cultivo celular tratado). Una solución madre de 10 mmol/L del compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se preparó en 50% de etanol y filtrado estéril. Cinco horas después de sembrar las células, el compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se aplicó en la cantidad apropiada al medio dado para obtener la concentración final deseada. El medio se cambió una vez por semana. Las células se examinaron microscópicamente con regularidad. Micrografías se tomaron en BZ Keyence 10 con 10 x objetivo y 4 x Digitalzoom. Una mejora del contraste automático se realizó con el programa BZ Analyzer.

[0117] Los resultados proporcionan una ventaja del nuevo compuesto 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina frente a 9-metilo- $\beta$ -carbolina, al observarse una diferenciación similar de las células de la prueba solamente en una concentración de aproximadamente 70  $\mu$ M 9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 30  $\mu$ M 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. 50  $\mu$ M 9-metilo- $\beta$ -carbolina condujo a un crecimiento más reducido de neuritas como signos de una diferenciación de células de neuroblastos humanos, como 30  $\mu$ M del presente compuesto 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

**Ejemplo 3: Lipofilia de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina**

[0118] Los siguientes experimentos se llevaron a cabo para comprobar si la lipofilia de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina es mayor que la de 9-metilo- $\beta$ -carbolina. Experimentalmente, la lipofilia se determina o bien a través de la distribución real entre octanol y agua, o bien, más simplemente, como se describe por Valkó mediante experimentos de HPLC con una columna de fase inversa (RP 18) (K. Valkó, Journal of Chromatography A 2004, 1037 (1- 2), 299-310). Con ello, interactúan los componentes de la sustancia objeto de investigación de modo diferente con las fases estacionarias. Cuando un componente interactúa más débilmente con las fases estacionarias, sale antes de la columna. Dependiendo de la fuerza de estas interacciones, los componentes de la sustancia aparecen en diversos momentos (tiempos de retención) al final de la columna de separación. Tales experimentos se llevaron a cabo para las dos sustancias. Se encontró que el compuesto de la invención 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina tiene un tiempo de retención más largo que 9-metilo- $\beta$ -carbolina (Figura 4), que indica en la columna elegida o fases estacionarias sin ambigüedad una mayor lipofilia de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina.

[0119] Además, se determinó la solubilidad de ambos compuestos en agua, en la que una serie de concentración se preparó en agua a temperatura ambiente para ambos compuestos. La concentración, que todavía era sólo soluble se determinó mediante una calibración externa. La concentración correspondiente se cuantificó por HPLC. Tiene una concentración soluble máxima de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (base) de 29,7 mg/L y 9-metilo- $\beta$ -carbolina (base) de 168,3 mg/L encontrado. Esta solubilidad en agua inferior de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina apoya por lo contrario el aumento de la lipofilia en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina.

[0120] La lipofiliidad de una sustancia tiene un fuerte efecto sobre sus parámetros de ADME ("absorción", "distribución", "metabolismo", y "excreción"). Por el aumento de lipófilas se concentran sustancias principalmente en compartimentos lipofílicos. Con el fin de atravesar las membranas, las sustancias químicas deben ser capaces de pasar a través de la región hidrófoba de una doble membrana biológica, por lo que deben ser auto-lipófilas. A menudo hay una buena correlación entre la solubilidad en lípidos y el paso de membrana. Por lo tanto, la lipofilia afecta de manera crucial la farmacocinética de una conexión. En resumen, varios experimentos muestran una lipofilia considerablemente mayor de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina

[0121] Otro aspecto importante del compuesto de la invención se refiere a la extensión de vida media de eliminación. Mientras que 9-metilo- $\beta$ -carbolina en una hidroxilación en la posición 6 se degrada con la reacción de conjugación final, se bloquea la vía metabólica en 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina por el grupo fluoruro. Esto es probablemente la razón por el aumento de la vida media de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina en comparación con 9-metilo- $\beta$ -carbolina. Dado que la vida media de Harman, un análogo estructural de 9-metilo- $\beta$ -carbolina, en el plasma sanguíneo del hombre es de aproximadamente 68 min (Rommelspacher et al.; Eu J Pharmacol 2002, 441 (1-2), 115-125) una extensión de este valor proporciona una ventaja relevante del compuesto de la invención, en particular en aplicaciones para el tratamiento de enfermedades crónicas.

[0122] Para una mejor evaluación de las vidas medias de 9-metilo- $\beta$ -carbolina (9M $\beta$ C), 6-Fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) y 7-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (7F9M $\beta$ C) en el organismo animal, o más específicamente en la perilinfa (sitio diana de la acción) se llevaron a cabo experimentos en cobayas. Para este propósito, se aplicó en cobayas el ingrediente activo particular (un total de 1,4 mg de cada ingrediente activo por oído), en 40  $\mu$ L de un hidrogel (18% Poloxamer 407, y 0,6% de alginato), una vez antes de la membrana de la ventana redonda en el oído medio. Esta membrana separa el oído medio lleno de aire del oído interno lleno de la perilinfa. Después de la expiración del tiempo deseado (20 min, 2 h, 8 h y 24 h) se retiró perilinfa de la punta de la cóclea (ápice) bajo anestesia cada 5  $\mu$ L. A continuación, el animal se mató. Por tiempo (20 min, 2 h, 8 h o 24 h) se tomaron mediciones a partir de al menos tres orejas.

**[0123]** La concentración de la sustancia activa en la muestra de perilinfa se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, en parte también indicada como cromatografía líquida de alta presión) y la medición de las propiedades de fluorescencia del compuesto activo correspondiente. En la HPLC, el eluyente consistió en 45% a partir de 90% de acetonitrilo y 55% de acetato de amonio (40 mM, pH <5). El caudal era de 0,4 ml/min y el volumen de inyección era de 10 µL. Cada muestra se diluyó con metanol al 60%, siempre que la señal era demasiado fuerte. Después de cada ejecución, la aguja de inyección se lavó abundantemente con 100% de isopropanol. El límite de detección era de 20 fmol/L.

**[0124]** De las concentraciones determinadas de ingrediente activo se pudo calcular la vida media de eliminación. Se encontró en este caso para 9-metilo-β-carbolina una vida media de eliminación de aproximadamente 3,4 h, para 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina una vida media de eliminación de aproximadamente 6,0 horas, y para el 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina una vida media de eliminación de aproximadamente 5,0 horas. Mediante el aumento de 1,5 veces (7F9MβC) a 1,75 veces (6F9MβC) la vida media de eliminación de las sustancias de la invención en comparación con 9-metilo-β-carbolina resultan en una biodisponibilidad significativamente mejorada en comparación con la técnica anterior. En general, se determina que las vidas medias en la perilinfa son más altas que las vidas medias estimadas en sangre (por ejemplo, en relación con 9MβC).

#### **Ejemplo 4: Experimentos RT-PCR I cuantitativos**

**[0125]** Respecto a células de neuroblastoma se debe investigar en qué medida los compuestos de la presente invención, 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina y 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina, y 9-metilo-β-carbolina del estado de la técnica afectan la expresión de factores neuroprotectores y neurotróficos importantes, de los cuales se conoce un efecto regenerador sobre las células ciliadas dañadas. También mejoran la vitalidad de las células nerviosas del ganglio espiral, que transmiten la información desde el oído interno a través de la base del cerebro y en el centro de audición del cerebro. En trauma, los axones se retraen de las células ciliadas, con lo que no se reenviará la señal de los sonidos correspondientes. Los factores neurotróficos causan conjuntos continuos de la conexión entre el nervio y se atan las células ciliadas apropiadas de nuevo para que los tonos apropiados se oigan de nuevo.

**[0126]** Para ello, a través de experimentos de RT-PCR cuantitativos (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa) se utilizaron de nuevo las líneas de células de SH-SY5Y que se hicieron disponibles por el Instituto de Genética Humana de la Clínica Universitaria de Eppendorf, el cual obtuvo las células del Centro de Recursos de Braunschweig.

**[0127]** Las células se cultivaron en MEM (medio esencial mínimo, Life Technologies) con FCS al 10% (suero de ternera fetal, Biochrom AG) y penicilina/estreptomicina (Biochrom AG). Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> en frascos de cultivo celular de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, cultivo celular tratado) con 5 ml de medio. Las soluciones madre de 10 mmol/L de las sustancias 9-metilo-β-carbolina (AC-002 o 9MβC) y 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina (AC102 o 6F9MβC) se disolvieron en agua destilada y se esterilizaron por filtración. Un día después de la siembra de las células, se añadieron las sustancias en las cantidades apropiadas (5-55 µL) para mantener la concentración final en el medio de 10 µM, 20 µM y 30 µM para 6F9MβC y 30 µM, 50 µM y 70 µM para 9MβC. Los controles recibieron sólo la cantidad apropiada de disolvente (agua destilada). El medio se cambió una vez por semana.

**[0128]** Las células se examinaron microscópicamente con regularidad y se cosecharon después de 2, 7 y 14 días de incubación, se lavaron con PBS y se congelaron inmediatamente a -80°C.

**[0129]** El aislamiento del ARN se realizó utilizando el HighPure RNA Isolation Kit de la empresa Roche. Este aislamiento comprende una digestión de AADNs. La concentración de ARN se midió en el espectrofotómetro nanoDrop y la integridad de ARN se determinó usando el Bioanalyzer 2100 (Agilent). Mediante la muestra, bajo el uso de Random-Hexamerprimer, del Protector RNA Inhibitor (Roche) y de la Transcriptor Reverse Transcriptase (Fermentas), se describió 300 ng de ARN en ADNc.

**[0130]** Después de la reacción, este enfoque 1: 4 se diluyó y se aplicó respectivamente 2 µl por RT-PCR cuantitativa. Esto se realizó en LightCycler 480 en condiciones estándar en el formato de SybrGreen con temperaturas de hibridación de cebadores. Si es posible, se emplearon cebadores de sobreextensión de exón.

**[0131]** La lista de los cebadores usados se dan en la Tabla 1 a continuación.

**Tab. 1:** Secuencias de cebador para experimentos cuantitativos de RT-PCR. Además, se muestran los números de identificación de secuencia de los soportes respectivos (SEQ ID). La secuencia de todos los cebadores se da en la dirección 5'-3'.

| Gen diana                                            | Cebador directo                      | Cebador inverso                      |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| BDNF ( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )    | GGATGAGGACCAGAAAGT (SEQ-ID 01)       | AGCAGAAAGAGAAGAGGAG (SEQ-ID 02)      |
| Lif ( <i>Leukemia inhibitory factor</i> )            | CCAACAACCTGGACAAGCTATG (SEQ-ID 03)   | GTGGCGTTGAGCTTGCTGTG (SEQ-ID 04)     |
| NT3 ( <i>Neurotrophin 3</i> )                        | CGGAGCATAAGAGTCACC (SEQ-ID 05)       | CCTGGCTTCCTTACATCG (SEQ-ID 06)       |
| Id2 ( <i>Inhibitor of Differentiation 2</i> )        | CATCCTGTCCTTGCAAGGCTT (SEQ-ID 07)    | CCATTCAACTTGTCTCCTTGTG (SEQ-ID 08)   |
| BTG2 (B-cell translocation gene 2)                   | CAGGAGGCACTCACAGAGCA (SEQ-ID 09)     | AATGCGGTAGGACACCTCATA (SEQ-ID 10)    |
| Cbln (Cerebellin 1 precursor Protein)                | CAAGTGCCTGGTGGTGT (SEQ-ID 11)        | GTTCACTAGTACCTGGTCAAGTAG (SEQ-ID 12) |
| DRD2S (kurze Variante des Dopaminrezeptors Subtyp 2) | GGACTCAATAACGCAGACCAGAA (SEQ-ID 13)  | CGGGCAGCCTCCTTTAGT (SEQ-ID 14)       |
| DKK1 (Dickkopf-related Protein 1)                    | CATTGACAACCTACCAGCCGT (SEQ-ID 15)    | ATCAGAAGACACACATATTCCATT (SEQ-ID 16) |
| Bax                                                  | GATGATTGCCGCCGTGGACA (SEQ-ID 17)     | CACCTTGGTGCACAGGGCCTT (SEQ-ID 18)    |
| Bcl2                                                 | GTGTGGAGAGCGTCAACC (SEQ-ID 19)       | CTTCAGAGACAGCCAGGAG (SEQ-ID 20)      |
| B2M ( $\beta$ 2-Mikroglobulin)                       | ACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACT (SEQ-ID 21) | CTTCAAACCTCCATGATGCT (SEQ-ID 22)     |

**[0132]** La especificidad fue verificada por análisis de la curva de fusión y la electroforesis en gel posterior. Para cada PCR, se determinó la eficiencia de PCR y el valor CQ mediante el programa LinRegPCR y estos se utilizaron en los cálculos adicionales. A partir de una pluralidad de genes de referencia, se determinó que B2M ( $\beta$ 2-microglobulina) era adecuada para las condiciones de investigación. Todos los resultados son resultados relativos en relación con las condiciones respectivas de control, en las que para el período de tiempo especificado (es decir, 2 días, 7 días o 14 días) se administró un único disolvente. En las Figuras 5A a 5I se muestra la expresión génica relativa (relativa a las condiciones de control) del correspondiente factor. Con ello, se muestra la exposición de 2 días en gris claro, la exposición de 7 días en gris oscuro y la exposición de 14 días en negro. Cada valor de medición a partir de las Figuras 5A - 5I representa una media de 3 muestras biológicas independientes.

**[0133]** La Figura 5A muestra la expresión génica relativa de la neurotrofina BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9M $\beta$ C (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) o 9M $\beta$ C (30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M). El comparar la expresión de BDNF después de la exposición a 30  $\mu$ M, 6F9M $\beta$ C o 9M $\beta$ C, se muestra en estas concentraciones, que 6F9M $\beta$ C lleva a una expresión de BDNF casi dos veces mayor que 9M $\beta$ C.

**[0134]** La Figura 5B muestra la expresión relativa del gen de Lif (*Leukemia inhibitory factor*), que estimula la diferenciación celular e inhibe la proliferación, después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9M $\beta$ C (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) o 9M $\beta$ C (30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 70  $\mu$ M). Al comparar la expresión de Lif después de la exposición a 30  $\mu$ M de 6F9M $\beta$ C o 9M $\beta$ C, se muestra en esta concentración que 6F9M $\beta$ C después de una exposición de sólo 2 días conduce a una expresión de Lif casi tres veces más alta como 9M $\beta$ C. Incluso después de 14 días de exposición a 6F9M $\beta$ C la expresión de Lif es aproximadamente dos veces más alta en comparación con 9M $\beta$ C. Sólo después de una exposición de 7 días respecto a 6F9M $\beta$ C, la expresión de Lif parece algo menor en comparación con 9M $\beta$ C. La alta expresión a concentraciones más bajas de 6F9M $\beta$ C también es notable.

**[0135]** La Figura 5C muestra la expresión génica relativa de la neurotrofina NT3 (*neurotrofina 3*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9M $\beta$ C (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) o 9M $\beta$ C (30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M). Al comparar la expresión de NT-3 después de la exposición con 30  $\mu$ M, 6F9M $\beta$ C o 9M $\beta$ C, se muestra a esta concentración, que 6F9M $\beta$ C conduce a una expresión de NT-3 casi 3,5 veces más alta después de 14 días de exposición como 9M $\beta$ C. La alta expresión de NT-3 a concentraciones más bajas a 6F9M $\beta$ C también es notable, especialmente después de la exposición de 7 días a solamente 10  $\mu$ M 6F9M $\beta$ C.

**[0136]** La Figura 5D muestra la expresión génica relativa de Id2 (*Inhibitor of Differentiation 2*), la cual inhibe la diferenciación celular y por lo tanto promueve la proliferación. También se informó de que los ratones en los que el gen se había desactivado, mostraron síntomas neurodegenerativos. La expresión génica relativa de Id2 tras 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9M $\beta$ C (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) o 9M $\beta$ C (30  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 70  $\mu$ M). Al comparar la

expresión de Id2 después de la exposición a 30µM 6F9MβC o 9MβC, se muestra en esta concentración, que 6F9MβC conduce a una expresión de Id2 casi dos veces a 3,5 veces tan alta, como 9MβC. La expresión alta de Id2 a concentraciones reducidas de 6F9MβC también es notable.

**[0137]** La Figura 5E muestra la expresión génica relativa del neuroprotector BTG2 (*B-cell translocación gene 2*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9MβC (10 µM, 20 µM, 30 µM) o 9MβC (30 µM, 50 µM, 70 µM). Al comparar la expresión de BTG2 después de la exposición a 30µM 6F9MβC o 9MβC, se muestra a esta concentración que 6F9MβC conduce a una expresión aproximadamente 1,25 veces a 2,7 veces mayor de BTG2, como 9MβC. Además, es notable que en 10µM 6F9MβC se calcula una expresión comparable de BTG2, como en la mayor concentración de 9MβC (excepto después de una exposición de 2 días).

**[0138]** La Figura 5F muestra la expresión génica relativa del neuroprotector de CBLN (*Cerebellin 1 precursor Protein*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9MβC (10 µM, 20µM y 30 µM) o 9MβC (30 µM, 50µM y 70 µM). Al comparar la expresión de CBLN después de la exposición a 30µM 6F9MβC o 9MβC, se muestra a esta concentración que 6F9MβC conduce a una expresión más alta de aproximadamente 1,5 veces de CBLN como 9MβC (excepto después de 2 días de exposición). A tan sólo 20µM 6F9MβC, la expresión de CBLN parece ser incluso más alta.

**[0139]** La Figura 5G muestra la relación entre la expresión génica de Bax y Bcl-2, que cuenta como marcadores de apoptosis, después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9MβC (10 µM, 20 µM, 30 µM) o 9MβC (30 µM, 50 µM, 70 µM). Cuanto menor sea el cociente de Bax/Bcl-2, cuanto menos apoptosis. Al comparar el cociente Bax/Bcl-2 después de la exposición a 30µM 6F9MβC o 9MβC, esto es, después de 6F9MβC, significativamente menor que después de 9MβC (excepto después de la exposición de 2 días). También es notable el bajo cociente de Bax/Bcl-2 a concentraciones más bajas de 6F9MβC.

**[0140]** La Figura 5H muestra la expresión génica relativa de DRD2S (*Variante corta de receptor de dopamina de subtipo 2*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9MβC (10 µM, 20 µM, 30 µM) o 9MβC (30 µM, 50 µM, 70 µM). Al comparar la expresión de DRD2S después de la exposición a 30µM 6F9MβC o 9MβC, se muestra a esta concentración que 6F9MβC a los 2 días y 14 días de exposición conduce a una mayor expresión de DRD2S como 9MβC y después de 7 días de exposición conduce a una menor expresión de DRD2S como 9MβC. A concentraciones más bajas de 6F9MβC la expresión de DRD2S después de 7 días de expresión parece comparable a la después de 9MβC.

**[0141]** La Figura 5I muestra la expresión génica relativa del factor DKK1 (*Dickkopf-related Protein 1*), el cual es de importancia para la diferenciación de las células nerviosas y también juega un papel en traumas en células sensoriales de acuerdo con el conocimiento actual, después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 6F9MβC (10 µM, 20µM, 30 µM) o 9MβC (30 µM, 50 µM, 70 µM). Al comparar la expresión de DKK1 después de la exposición con 30µM 6F9MβC o 9MβC, como es particularmente evidente a exposiciones reducidas (2 días y 7 días) que 6F9MβC conduce a una expresión aproximadamente 1,4 veces a 2,7 veces más alta de DKK1 como 9MβC. A los 14 días de exposición, los valores son comparables. Es de destacar también que, incluso a 10µM 6F9MβC, se describe una expresión de DKK1 que es comparable, que la mayor concentración de 9MβC.

**[0142]** En general, por lo tanto, se muestra que 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina de la invención tiene un efecto ventajoso con respecto a 9-metilo-β-carbolina en prácticamente todos los factores celulares investigados que afecten directa o indirectamente la diferenciación y proliferación de las células y por lo tanto una regeneración de tejidos después de trauma, con respecto al estado de la técnica. De particular interés son los factores de BDNF y Lif, que están entre los factores más importantes para los procesos de reparación celular después de un traumatismo en el oído interno. Según la invención 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina por lo tanto tiene el potencial, no sólo para utilizarse con éxito en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno, sino también en una concentración más baja como metilo-β-carbolina según el estado de la técnica.

#### Ejemplo 5: experimentos RT-PCR II cuantitativos

**[0143]** De manera análoga al Ejemplo 4, se realizaron experimentos de RT-PCR con el ingrediente activo de la invención 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina para algunos de los factores celulares importantes (7F9MβC). El procedimiento experimental en este caso era idéntico a los experimentos con 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina y 9-metilo-β-carbolina. Aquí también (como para 6F9MβC) se aplicaron concentraciones finales de 30 µM, 50µM y 70µM 7F9MβC en medios de cultivo. En los factores investigados se trata de BDNF (*Brain-derived neurotrophic Factor*), Lif (*Leukemia inhibitory factor*), DRD2S (variantes cortas del receptor de dopamina de subtipo 2) y DKK1 (*Dickkopf-related Protein 1*). Se empleó el mismo cebador que para los correspondientes genes diana en el Ejemplo 4 (Tabla 1). Como ya se ha mencionado, BDNF y Lif son factores particularmente importantes para los procesos de reparación celular después de un traumatismo en el oído interno.

**[0144]** La Figura 6A muestra la expresión génica relativa de la neurotrofina BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 7F9MβC (10 µM, 20µM, 30 µM). Al comparar la expresión de BDNF después de la exposición a 30µM 7F9MβC y con 30µM 9MβC (Fig. 5A), se muestra en una exposición de 2

días que 7F9MβC conduce a una expresión de BDNF tres veces más alta como 9MβC. Para las exposiciones más largas, los valores son comparables.

**[0145]** La Figura 6B muestra la relativa expresión génica de Lif (*Leukemia inhibitory factor*), que estimula la diferenciación e inhibe la proliferación celular, después de 2 días, 7 días y 14 días de exposición a 7F9MβC (10 μM, 20μM, 30 μM). Al comparar la expresión Lif después de la exposición a 30μM 7F9MβC con 30μM 9MβC (Fig. 5B), lo que muestra en una exposición de 2 días que 7F9MβC conduce a una expresión de Lif tres veces más alta como 9MβC. A los 7 días de exposición, la inducción por 7F9MβC es ligeramente más débil que a través de 9MβC y a los 14 días de exposición, los valores son comparables. La alta expresión de Lif después de 2 días de exposición con 20μM 7F9MβC también es notable.

**[0146]** La Figura 6C muestra la relativa expresión de genes de DRD2S (*variante corta de receptor de dopamina de subtipo 2*) después de exposición a 2 días, 7 días y 14 días a 7F9MβC (10 μM, 20μM, 30 μM). Al comparar la expresión de DRD2S después de la exposición a 30μM 7F9MβC con 30μM 9MβC (Fig. 5H), a continuación, se refleja en una exposición de 2 días que 7F9MβC conduce a una expresión dos veces más alta de DRD2S como 9MβC. A 7 días de exposición, los valores son comparables y en la exposición a 14 días, la inducción por 7F9MβC ligeramente es más débil que a través de 9MβC.

**[0147]** La Figura 6D muestra la expresión génica relativa del factor de DKK1 (*Dickkopf-related protein 1*), que es de importancia para la diferenciación de las células nerviosas y también tiene un papel en el trauma de células, después de exposición de 2 días, 7 días y 14 días de 7F9MβC (10 μM, 20μM, 30 μM). Al comparar la expresión de DKK1 después de la exposición a 30μM 7F9MβC con 30μM 9MβC (Fig. 5I), se muestra en una exposición de 2 días que 7F9MβC conduce a una expresión de DKK1 aproximadamente 1,4 veces más alta como 9MβC. A 7 días de exposición, los valores son comparables y a 14 días de exposición, la inducción por 7F9MβC es aproximadamente 2,2 veces mayor que 9MβC.

**[0148]** En general, 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina en comparación con 9-metilo-β-carbolina en el estado de la técnica logra efectos superiores, especialmente con una exposición corta. Una posible explicación es que 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina es más lipófila que 9-metilo-β-carbolina y por lo tanto penetra más rápidamente en las células, alcanzando rápidamente por lo tanto concentraciones más altas en la célula. Desde un punto de vista terapéutico tales ventajas son, por supuesto, deseables, ya que permiten una duración eficiente y más corta de tratamiento, que es por el bien del paciente. Desde el punto de vista terapéutico, 7-fluoro-9-metilo-β-carbolina es superior por lo tanto para el tratamiento de daño agudo del oído interno tales como trauma acústico y pérdida de audición aguda que 9-metilo-β-carbolina del estado de la técnica.

#### **Ejemplo 6: Experimentos inmunohistoquímicos**

**[0149]** En lo siguiente se debe examinar en cobayas sobre una base histológica cómo la administración de 9-metilo-β-carbolina (9MβC) o de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina (6F9MβC) afecta la muerte por trauma acústico de las células ciliadas externas (*outer hair cells*, OHC) en el oído interno. Cabe mencionar en este punto que las células ciliadas internas (IHC) son menos sensibles en comparación con cualquier trauma.

**[0150]** Para causar un trauma acústico se anestesiaron cobayas con 60 mg/kg de ketamina y 8 mg/kg de xilazina. Después se aplicó un ungüento (Bayer) a los ojos y se colocó el animal en una cámara insonorizada. Un altavoz calibrada se coloca directamente encima de la cabeza del animal, y esto se ajustó de modo que emitiera una banda de media octava a 8 kHz en un volumen de 110 dB durante un período de 30 minutos.

**[0151]** 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina y 9-metilo-β-carbolina, envueltas en un hidrogel (18% Poloxamer 407, y 0,6% de alginato) estaban recién preparadas para cada experimento, y almacenadas hasta su uso a 4°C en el refrigerador.

**[0152]** La mezcla líquida termosensible se aplicó directamente por medio de una jeringa Hamilton delante de la membrana de la ventana redonda del oído medio (10 μL). La primera dosis de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina (por ejemplo 0,07mg) se aplicó una hora después del trauma acústico (día 0) a una concentración de 0,007 mg/μl y la segunda dosis de 6-fluoro-9-metilo-β-carbolina (0,035mg en un volumen de 5μL) en el tercer día. Con ello, sólo se trató en cada caso un oído por animal, mientras que el segundo oído sirvió como control intra-individual. El control se abrevia en este documento en parte con "contr.". En experimentos de comparación, se encontró que una simple transferencia del vehículo fármaco (es decir, el hidrogel) en comparación con una oreja completamente no tratada no tuvo ningún efecto. Para cada sustancia activa (incluyendo los controles), se estudiaron cuatro cobayas.

**[0153]** En el día 14 después del trauma acústico se preparó la región de la oreja, de modo que contenía la cóclea. La preparación se suspendió en paraformaldehído helado de 4% (PFA) durante 24 horas y se almacenó a + 4°C. Después de la fijación de PFA, se enjuagó la preparación 2 veces 5 minutos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y después se coloca en un 10% de ácido tetraacético de etilendiamina (EDTA) para la descalcificación. Después de al menos 48 horas, se enjuagó la preparación dos veces con PBS y después se extrajo la cóclea. Todo el órgano de Corti, que contiene las células sensoriales, se extrajo de la cóclea y se cortó en cuatro secciones iguales. Cada una de las secciones corresponde al órgano de Corti de un tercio de una espira coclear. De esta

manera, el daño inducido por sonido puede ser localizado y cuantificado. Las secciones se colocaron durante 10 minutos en PBS que contiene 2% de albúmina de suero bovino (BSA) y (con Alexa Fluor® 488-faloidina etiquetada (Invitrogen, nº de catálogo A12379) en una dilución 1:40. Después de ello, las secciones se lavaron tres veces durante 10 minutos con PBS y se colocaron sobre un portaobjetos de microscopio. Una gota Pro Long DAPI, que comprende el medio de fijación (Invitrogen, nº de cat P36935), se añadió a las secciones, las cuales se cubrieron con un cubreobjetos. Posteriormente se selló la preparación con esmalte. Se hicieron imágenes de las secciones con un microscopio de fluorescencia (Keyence) con una ampliación de 40 veces. Las Figuras 7 y 8 muestran resultados representativos de los estudios de cuatro cobayas.

**[0154]** Se encontró en los controles no tratados (véase la Fig. 7A y la Fig. 8A), que se llevó por trauma acústico a una muerte aguda de células ciliadas externas. Esta muerte podría evitarse por administración intratimpánica de sólo un total de 0,105 mg de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (véase Fig. 7B). Además, la administración de 9-metilo- $\beta$ -carbolina podría prevenir la muerte de células ciliadas externas (véase la Fig. 8B), con lo que requiere una dosis significativamente mayor (un total de 0,2 mg de 9-metilo- $\beta$ -carbolina) que en la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la invención. Por consiguiente, la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la invención no sólo es adecuado para el tratamiento de pérdidas de audición, sino también es más eficiente que 9-metilo- $\beta$ -carbolina en el estado de la técnica.

#### **Ejemplo 7: potenciales auditivos evocados**

**[0155]** En lo siguiente, se debería investigar el efecto de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) y de 9-metilo- $\beta$ -carbolina (9M $\beta$ C) en el cambio del umbral de la audición inducido por el trauma acústico en el modelo de cobaya.

**[0156]** Para provocar un trauma acústico los cobayas se anestesiaron con 60 mg/kg de ketamina y 8 mg/kg de xilazina. Entonces se aplicó ungüento (Bayer) a los ojos y se colocó el animal en una cámara insonorizada. Un altavoz calibrado se coloca directamente encima de la cabeza del animal, y esto se ajustó de modo que emite una banda de media octava a 8 kHz en un volumen de 110 dB durante un período de 30 minutos.

**[0157]** Como medida para evaluar el umbral de audición en cobayas se midieron potenciales evocados auditivos. Para este propósito, la actividad electrofisiológica de las células nerviosas en el tronco cerebral, la cual reenvía los pulsos desde el oído interno, se derivó después de la sonicación de la oreja con 8, 11,3, 16, 22,6 y 32 kHz. El sonido siguió en orden ascendente desde 0 dB a 90 dB en pasos de 5 dB.

**[0158]** La medición se realizó 3 días antes del trauma acústico (D-3), 30 minutos después del trauma acústico (D0) y 14 días después del trauma acústico (D14).

**[0159]** En cada animal, un oído no se trató, y se utilizó como control intra-individual (abreviado en el presente documento también con "contr.") y la segunda oreja se trató con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. Para este propósito, una hora después del trauma acústico, se administró una dosis de 0,12 mg de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (en un hidrogel como vehículo) intratimpánico. 3 días después del trauma acústico tiene lugar una nueva administración intratimpánica de 0,06 mg de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. Las mediciones se realizaron a cuatro cobayas (n = 4).

**[0160]** En los experimentos de comparación, se encontró que una simple transferencia del vehículo de fármaco (es decir, los geles hidro) en comparación con una oreja completamente no tratada no tuvo ningún efecto.

**[0161]** Posteriormente, a partir de los valores medidos antes de la determinación del trauma acústico (D-3) y después de 14 días (D14), se determinó el desplazamiento restante del umbral de audición (también denominado desplazamiento permanente del umbral de audición). A partir de los valores medidos directamente después del trauma acústico (D0) y después de 14 días (D14) se determinó también la recuperación del trauma (D0 D14).

**[0162]** Se encontró que con respecto a la pérdida de la audición que queda después de 14 días (véase Fig. 9), la administración de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (en total 0,18 mg) conduce a una reducción significativa del umbral de audición en comparación con el control no tratado. Particularmente a una frecuencia sónica de 11,3 kHz y 16, se mostró por 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina una reducción en el umbral de audición a alrededor de 20 dB o 30 dB.

**[0163]** Además, con respecto a la recuperación del trauma acústico (véase Fig. 10) la recuperación podría mejorarse significativamente mediante la administración de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (0,18 mg total) en comparación con el control no tratado. Por lo tanto, con frecuencias de sonido de 8, 11,3 o 16 kHz se podría lograr una recuperación mejorada por aprox. 5 dB, 25 dB y 20 dB por 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la invención en comparación con la oreja no tratada.

**[0164]** De manera similar a los experimentos anteriores llevados a cabo con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina se realizaron también experimentos con 9-metilo- $\beta$ -carbolina. El procedimiento experimental era prácticamente idéntico, excepto, por supuesto, 9-metilo- $\beta$ -carbolina en lugar de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina. La dosis total de 9-metilo- $\beta$ -carbolina en este caso era de 0, 2 mg o 0,35 mg por oído.

**[0165]** Además, 9-metilo- $\beta$ -carbolina del estado de la técnica promovió la recuperación en comparación con el

control no tratado (véase la Fig. 11 y 12). En comparación con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina, sin embargo se mostró un aumento relativamente ligero en la dosis de 0,2 mg (véase la Fig. 11) solamente una mejora en la recuperación de aproximadamente 5 dB hasta un máximo de 10 dB. También en un aumento de la dosis adicional de 0,35 mg de 9-metilo- $\beta$ -carbolina (dos veces tan alta como la de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina) se evidenció solamente una mejora de aproximadamente 10 dB (véase la Fig. 12).

#### **Ejemplo 8: Degradación en el hígado a productos de degradación tóxicos**

**[0166]** En lo siguiente debe examinarse si 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) de la invención se metaboliza en el hígado a conocidos productos de degradación tóxicos.

**[0167]** Respecto a  $\beta$ -carbolina se ha sabido desde hace mucho tiempo que ésta se hace reaccionar en una reacción catalizada de N-metiltransferasas a cationes de  $\beta$ -carbolinio metilados. Éstos tienen algunas propiedades toxicológicas con 1-metilo-4-fenilpiridinio (MPP<sup>+</sup>, también conocido como neurotoxina Parkinson), ya que pueden inhibir la respiración mitocondrial, entre otras cosas, y son neurotóxicas. Particularmente tóxicos aquí son los cationes  $\beta$ -carbolinio dimetilados, es decir, 2,9-dimetilo- $\beta$ -carbolinio-cationes. Éstos se forman por metilación secuencial en la posición 2 y 9. Por lo tanto, debe examinarse a continuación si la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) de la invención se convierte en el hígado a las correspondientes toxinas 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -carbolinio-cationes (directamente derivados de 6F9M $\beta$ C) y 2,9-dimetilo- $\beta$ -carbolinio-catión (derivado de 9M $\beta$ C).

**[0168]** Para poder identificar estas sustancias por medio de HPLC, se sintetizaron tanto 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -carbolinio-cation (6F29DM $\beta$ C) como también 2,9-dimetilo- $\beta$ -carbolinio-catión (29DM $\beta$ C) en el sitio y los correspondientes tiempos de retención se determinaron por las mediciones de HPLC de referencia. Igualmente se realizó una medida de referencia con 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina pura (6F9M $\beta$ C).

**[0169]** Para simular el proceso de degradación en el hígado, diversas concentraciones (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) se incubaron durante una hora en condiciones fisiológicas (37°C en solución de salina de fosfato tamponada fisiológica, PBS) con el hígado homogeneizado de la rata. Finalmente, tuvo lugar una medición HPLC de un extracto filtrado.

**[0170]** La caracterización de las respectivas sustancias se llevó a cabo por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, a veces denominada cromatografía líquida de presión alta). En la HPLC, el eluyente consistió en 45% de 90% de acetonitrilo y 55% de acetato de amonio (40 mM, pH <5) era. El caudal era de 0,4 ml/min y el volumen de inyección era de 10  $\mu$ L. Cada muestra se diluyó con metanol al 60%, siempre que la señal era demasiado fuerte. Así, por ejemplo, la muestra del homogeneizado de hígado tuvo que diluirse antes de la medición 1:40, para estar en el rango dinámico del método analítico.

**[0171]** Para 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) no tratada, se midió un tiempo de retención de 19,0 minutos (véase la Fig. 13A), mientras que las mediciones de referencia para 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (6F29DM $\beta$ C) mostraron un tiempo de retención de 10,1 minutos (véase la Fig. 13C) y para 2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (29DM $\beta$ C) exhibió un tiempo de retención de 9,1 minutos (véase la Fig. 13D). Por lo tanto las muestras de referencia mostraron tiempos de retención claramente separables. La 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina incubada con homogeneizados de hígado de la rata (100  $\mu$ M) mostró el pico a los 19,0 minutos (es decir, 6F9M $\beta$ C), pero no hay picos para 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (6F29DM $\beta$ C) o 2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (29DM $\beta$ C). Las concentraciones más bajas también ensayadas de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) mostraron resultados idénticos.

**[0172]** Se puede concluir que 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina de la invención bajo las condiciones dadas afortunadamente no se metabolizan a productos de degradación tóxicos conocidos.

**[0173]** En lo siguiente, se describe brevemente la síntesis para los cationes de referencia 6-fluoro-2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (6F29DM $\beta$ C) y 2,9-dimetilo- $\beta$ -ion de carbolinio (29DM $\beta$ C).

**[0174]** Para la síntesis de 6F29DM $\beta$ C se añade 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (base libre) en 3 mL de acetonitrilo 200 mg (es decir, 1,4 mmol) de metilo yoduro a una solución de 50 mg (es decir, 0,25 mmol). La mezcla de reacción se agita en atmósfera de nitrógeno durante 24 horas a temperatura ambiente. Los disolventes después se inflan bajo una corriente de nitrógeno. El residuo amarillo fluorescente se recrystaliza en acetonitrilo. Rendimiento: 53 mg (es decir, 15 mmol) 60%.

**[0175]** Para la síntesis de 29DM $\beta$ C se añadió a una solución de 50 mg (es decir, 0,27 mmol) 9-metilo- $\beta$ -carbolina (base libre) en 3 mL de acetonitrilo de 200 mg (es decir, 1,4 mmol) de yoduro de metilo. La mezcla de reacción se agitó bajo nitrógeno durante 24 horas a temperatura ambiente. Los disolventes después se inflaron bajo una corriente de nitrógeno. El residuo amarillo fluorescente se recrystalizó en acetonitrilo, se filtró y se secó a vacío. De rendimiento: 43 mg (es decir, 13 mmol) 48%.

#### **Ejemplo 9: 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina mejora el aprendizaje y la memoria**

**[0176]** Los mecanismos de aprendizaje y memoria subyacentes son extremadamente complejos. Se pueden ver a nivel molecular y celular, a nivel de la biología de sistemas y la psicología. Uno de los procesos clave para la formación de la memoria a nivel molecular es la activación del cAMP response element binding proteins (CREB). Esto conduce a la formación de sinapsis, un proceso al que está vinculado en general la formación de la memoria. Este proceso es regulado por muchos factores. Un refuerzo positivo inducido por el brain derived neurotrophic factor (BDNF) y su receptor TrkB. Por lo tanto, se debe investigar al nivel celular, la 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) de la invención.

**[0177]** Hemos encontrado en nuestras investigaciones a nivel celular que 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) incrementa la concentración de CREB por un factor de 8 e incrementa la concentración de BDNF hasta tres veces. Estos descubrimientos sugieren que 6F9M $\beta$ C promueve el aprendizaje y la memoria. Esta hipótesis se puso a prueba en el siguiente experimento.

**[0178]** En un laberinto de ocho brazos el efecto de 6F9M $\beta$ C en el comportamiento de aprendizaje se puso a prueba. Ratas macho de 5 meses de edad fueron utilizadas en sesiones diarias durante 10 días en el experimentador. Después, eran capaces de explorar el laberinto durante 2 días y también aprendieron que recibieron una recompensa de comida allí. Posteriormente, se colocó una recompensa de comida en cada extremo de los 8 brazos del laberinto y se instaló una cámara que registró cada movimiento del animal. En el primer día de la prueba, se colocó la rata sin inyección en la plataforma en el centro del laberinto. Al día siguiente, se administró a la rata por vía intraperitoneal por el experimentador 2 mg/kg de peso corporal de 6-fluoro-9-metilo- $\beta$ -carbolina (6F9M $\beta$ C) como base libre disuelta en solución salina fisiológica. 2 horas después, el animal se colocó en la plataforma en el centro del laberinto, desde donde tenía acceso a todos los brazos. Este procedimiento se repitió todos los días hasta que el animal cometió un máximo de un error, p.ej. entró en un brazo, al cual ya había accedido en la correspondiente sesiones. Al final de la sesión, los ocho brazos habían sido visitados.

**[0179]** Se investigaron 12 ratas, a los que se administró 6F9M $\beta$ C y un grupo control de 12 ratas que solamente habían recibido solución salina. El grupo de fármacos (que ha recibido 6F9M $\beta$ C) alcanzó el criterio después de 6 días y el grupo de control después de 14 días. La diferencia se comprobó por ANOVA para mediciones repetidas y era significativa ( $p < 0,01$ ). Estos resultados muestran claramente que 6F9M $\beta$ C acelera el aprendizaje y mejora la memoria. Así pudimos comprobar nuestra hipótesis.

**[0180]** Esto demuestra que el ingrediente activo 6F9M $\beta$ C es eficaz no sólo para los trastornos del oído interno, pero también tiene una influencia favorable en comportamientos complejos como el aprendizaje y la memoria.

## Referencias

### [0181]

1.) Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. Valko K Journal of Chromatography A 2004;1037 (1-2): 299-310.

2.) The levels of norharman are high enough after smoking to affect monoamineoxidase B in platelets. Rommel-spacher et al., Eu J Pharmacol 2002;441 (1-2): 115-125.

## LISTADO DE SECUENCIAS

### [0182]

<110> Audiocure Pharma GmbH

<120> Fluoro-9-metil- $\beta$ -carbonilo

<130> AUD-P03632WO

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para BDNF

<400> 1  
 ggatgaggac cagaaagt 18  
  
 <210> 2  
 5 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 10 <223> Cebador inverso para BDNF  
  
 <400> 2  
 agcagaaaaga gaagaggag 19  
  
 15 <210> 3  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Cebador directo para Lif  
  
 <400> 3  
 25 ccaacaacct ggacaagcta tg 20  
  
 <210> 4  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para NT3  
  
 <400> 4  
 35 gtggcggtga gcttgctgtg 18  
  
 <210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo para Id2  
  
 <400> 5  
 45 cggagcataa gagtcacc 20  
  
 <210> 6  
 <211> 18  
 50 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para Id2  
 55  
 <400> 6  
 cctggcttcc ttacatcg 18  
  
 <210> 7  
 60 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 65 <223> Cebador directo para Id2

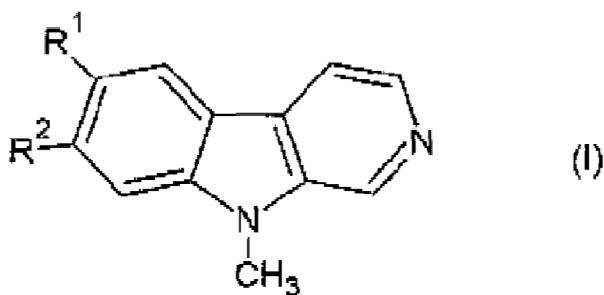
<400> 7  
 catcctgtcc ttgcaggctt 20  
 5 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> Cebador inverso para Id2  
 <400> 8  
 ccattcaact tgcctcctt gtg 23  
 15 <210> 9  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> Cebador directo para BTG2  
 <400> 9  
 25 caggaggcac tcacagagca 20  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para BTG2  
 35 <400> 10  
 aatgcggtag gacacctcat a 21  
 <210> 11  
 <211> 17  
 40 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador directo para Cbin  
 45 <400> 11  
 caagtcctg gtggtgt 17  
 <210> 12  
 50 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 55 <223> Cebador inverso para Cbln  
 <400> 12  
 gttcactagt acctggtcga agtag 25  
 60 <210> 13  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo para DRD2S  
  
 <400> 13  
 5 ggactcaata acgcagacca gaa 23  
  
 <210> 14  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para DRD2S  
  
 15 <400> 14  
 cgggcagcct ccttagt 18  
  
 <210> 15  
 <211> 20  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo para DKK1  
 25  
 <400> 15  
 cattgacaac taccagccgt 20  
  
 <210> 16  
 30 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 35 <223> Cebador inverso para DKK1  
  
 <400> 16  
 atcagaagac acacatatc catt 24  
  
 40 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Cebador directo para Bax  
  
 <400> 17  
 gatgattgcc gccgtggaca 20  
 50  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Cebador inverso para Bax  
  
 <400> 18  
 60 caccttggtg cacagggcct t 21  
  
 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Cebador directo para Bcl2  
 5     <400> 19  
       gtgtggagag cgtcaacc     18  
  
       <210> 20  
       <211> 19  
 10     <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
  
       <220>  
       <223> Cebador inverso para Bcl2  
 15  
       <400> 20  
       cttcagagac agccaggag     19  
  
       <210> 21  
 20     <211> 24  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
  
       <220>  
 25     <223> Cebador directo para B2M (referencias)  
  
       <400> 21  
       actggtcttt ctatctcttg tact     24  
 30     <210> 22  
       <211> 20  
       <212> ADN  
       <213> Secuencia Artificial  
  
       <220>  
 35     <223> Cebador inverso para B2M (referencias)  
  
       <400> 22  
 40     ctcaaact ccatgatgct     20  
  
 45  
  
 50  
  
 55  
  
 60  
  
 65

**Reivindicaciones**

1. Los compuestos de fórmula general (I)



donde

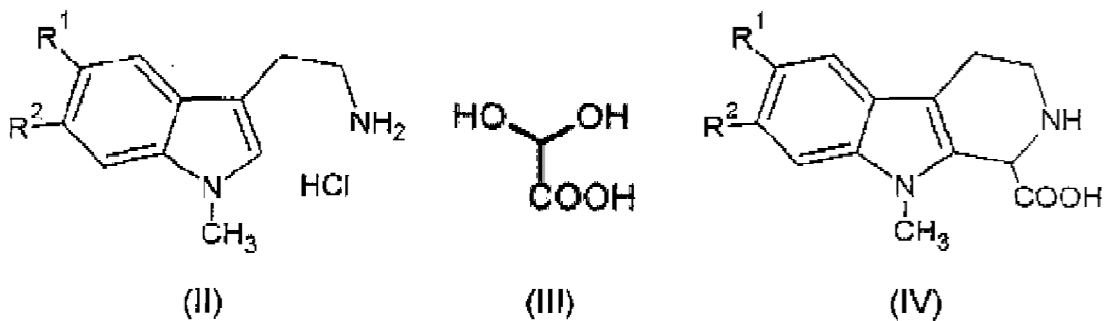
$R^1$  es -F y  $R^2$  es -H o -F, o  
 $R^1$  es -H y  $R^2$  es -F;

así como sales farmacológicamente aceptables, solvatos e hidratos de los compuestos antes mencionados.

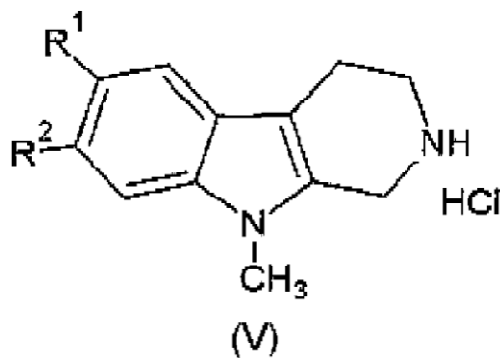
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que  $R^1$  es -F y  $R^2$  es -H.

3. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, que comprende los pasos siguientes:

a) Reacción del material de partida de fórmula general (II) bajo adición de hidrato de ácido glioxílico de la fórmula (III) y una base a un compuesto de fórmula general (IV)



b) Descarboxilación del compuesto de fórmula general (IV) bajo adición de un ácido y bajo calentamiento a un compuesto de fórmula general (V)



c) Aromatización del compuesto de fórmula general (V) a un compuesto de fórmula general (I) bajo adición de un catalizador

donde

$R^1$  es -F y  $R^2$  es -H o -F, o  
 $R^1$  es -H y  $R^2$  es -F.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado porque** el catalizador utilizado en el paso c) es Pd/C.

5. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2 para uso como medicamento.

6. Compuesto según la reivindicación 1 ó 2 para uso en el tratamiento de enfermedades y/o daños en el oído interno.

7. Compuesto para uso según la reivindicación 6, **caracterizado porque** las enfermedades y/o los daños del oído interno son enfermedades agudas del oído interno, seleccionadas del grupo que comprende traumatismo por explosión, lesión por explosión del oído, pérdida de audición e trauma de inserción,

8. Compuesto para uso según la reivindicación 6, **caracterizado porque** las enfermedades y/o daños del oído interno son enfermedades crónicas del oído interno, seleccionadas del grupo que comprende trauma acústico crónico, tinnitus y presbiacusis.

9. Compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 6 - 8, **caracterizado porque** el daño del oído interno es causado por sustancias ototóxicas.

10. Composición farmacéutica en forma de gotitas, ungüentos, aerosoles, liposomas, geles, emulsiones o soluciones de inyección que contienen al menos un compuesto según la reivindicación 1.

Fig. 1

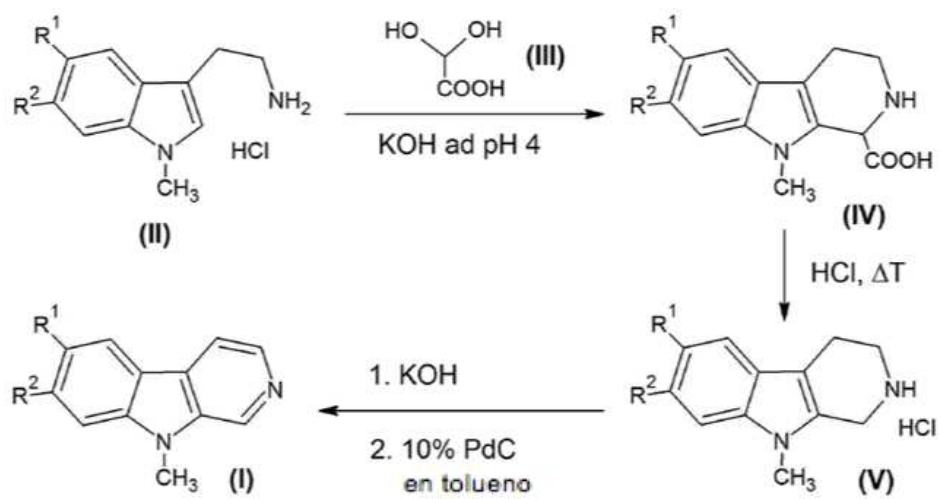


Fig. 1a

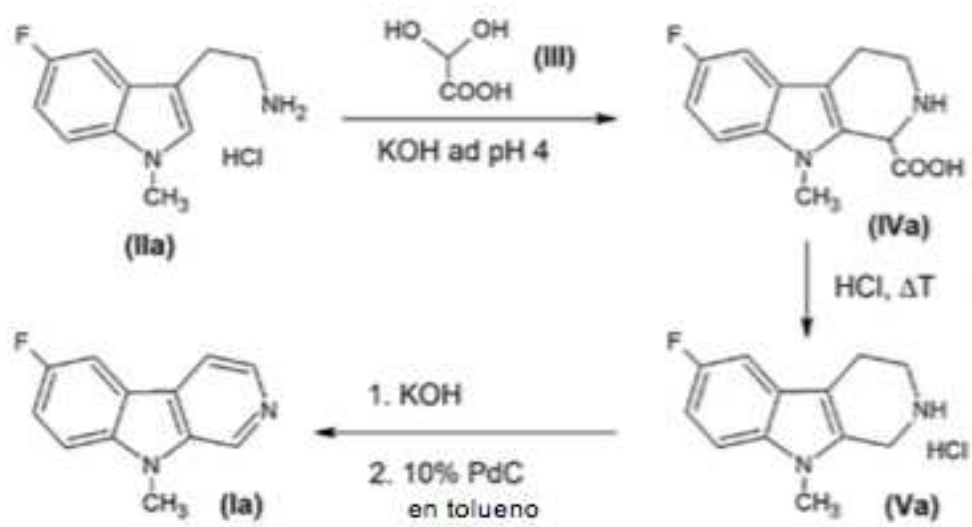


Fig. 1b

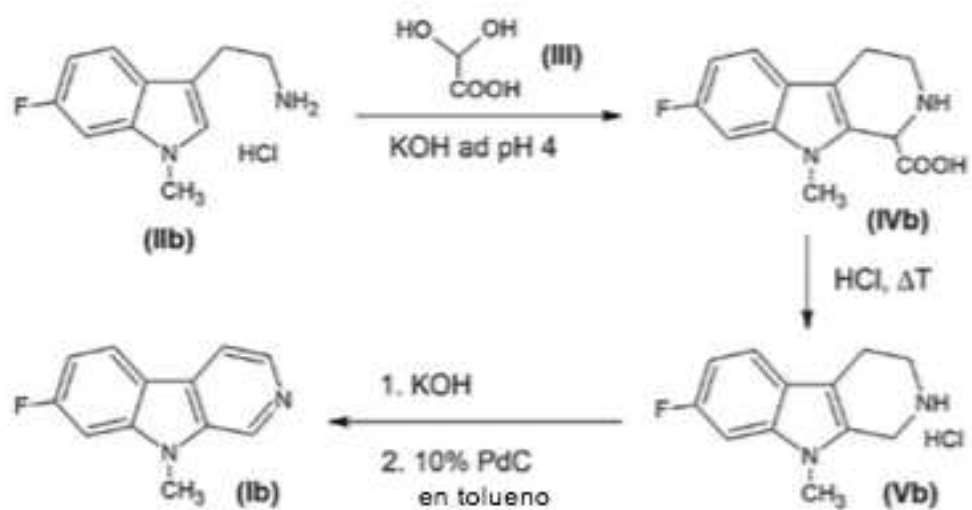


Fig. 2

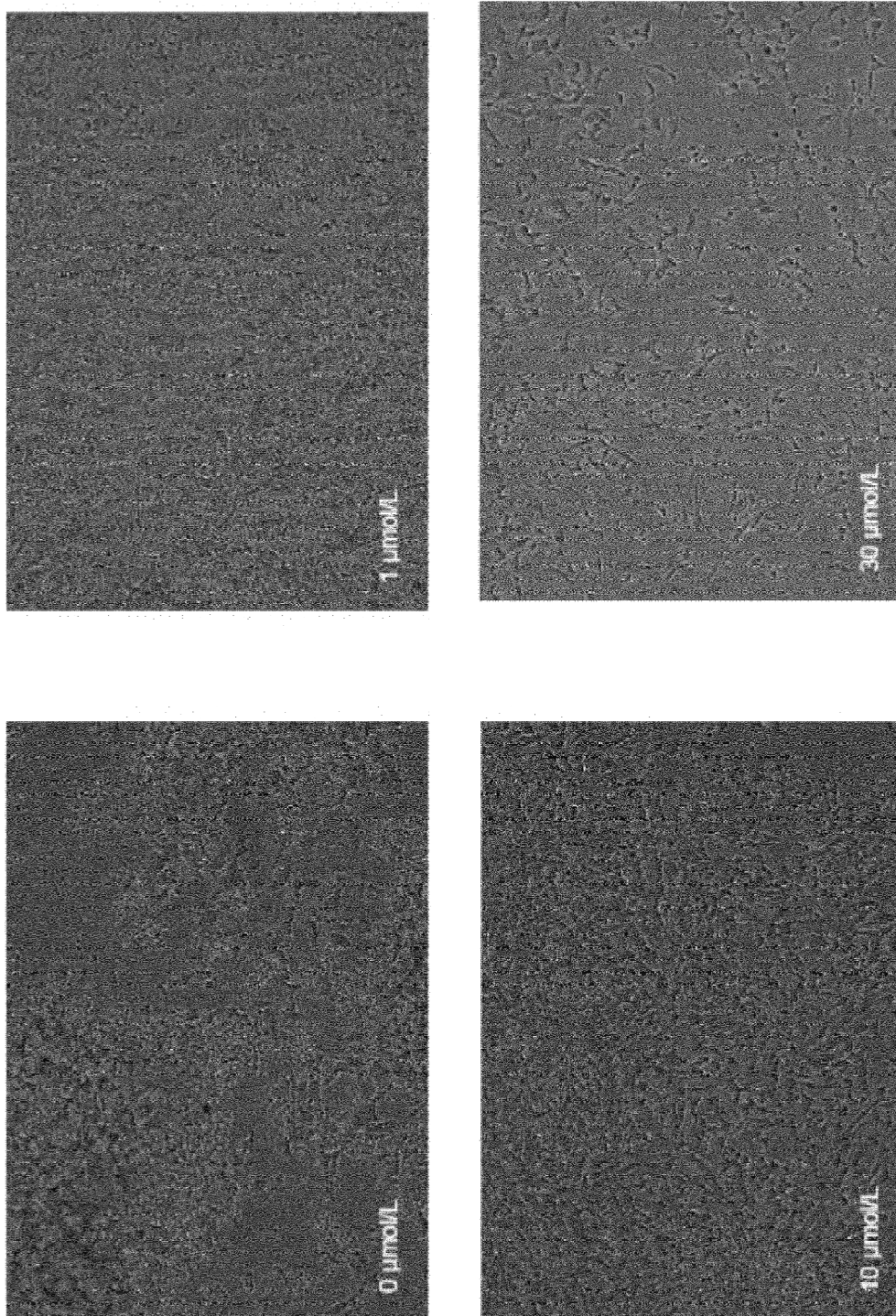
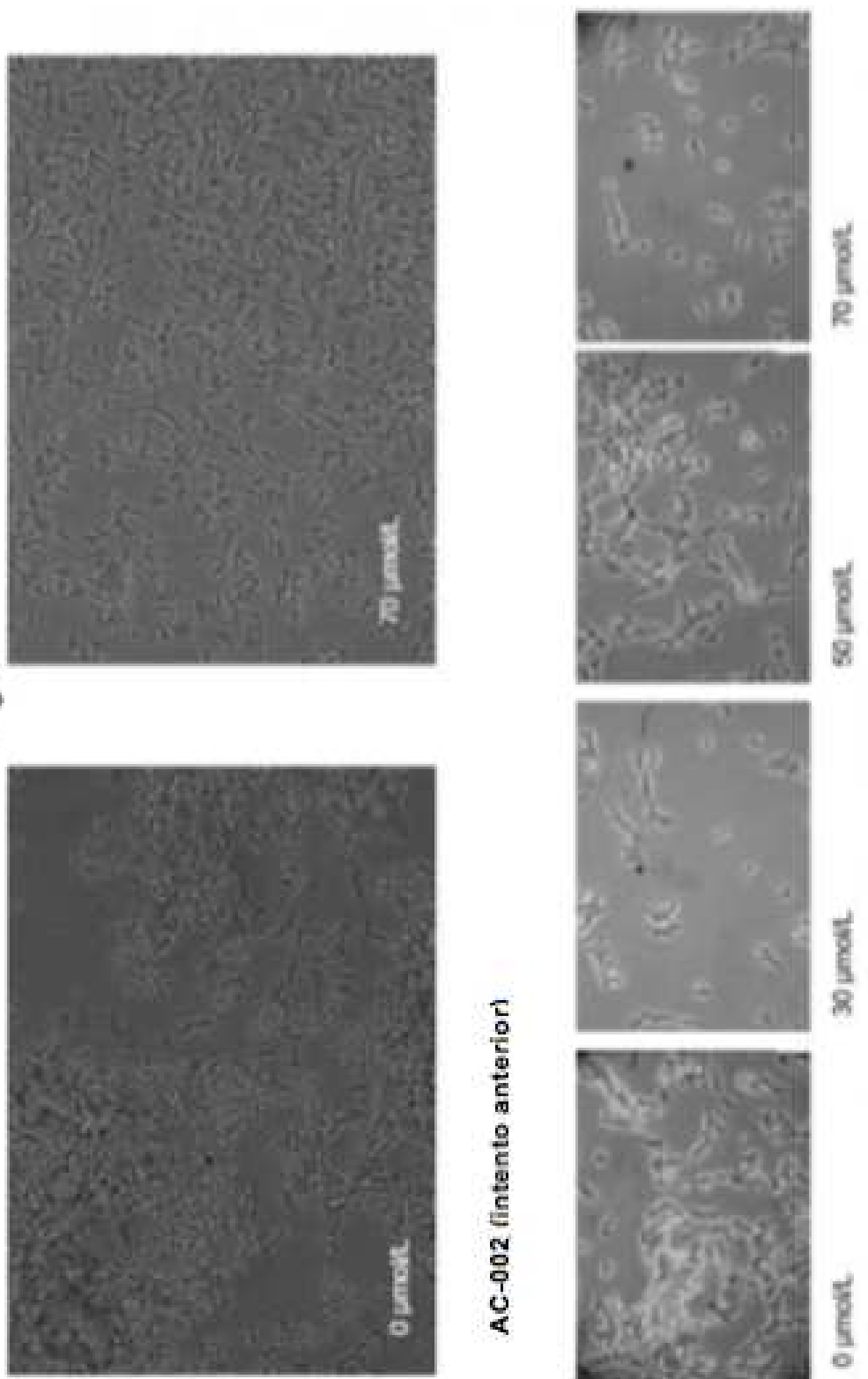
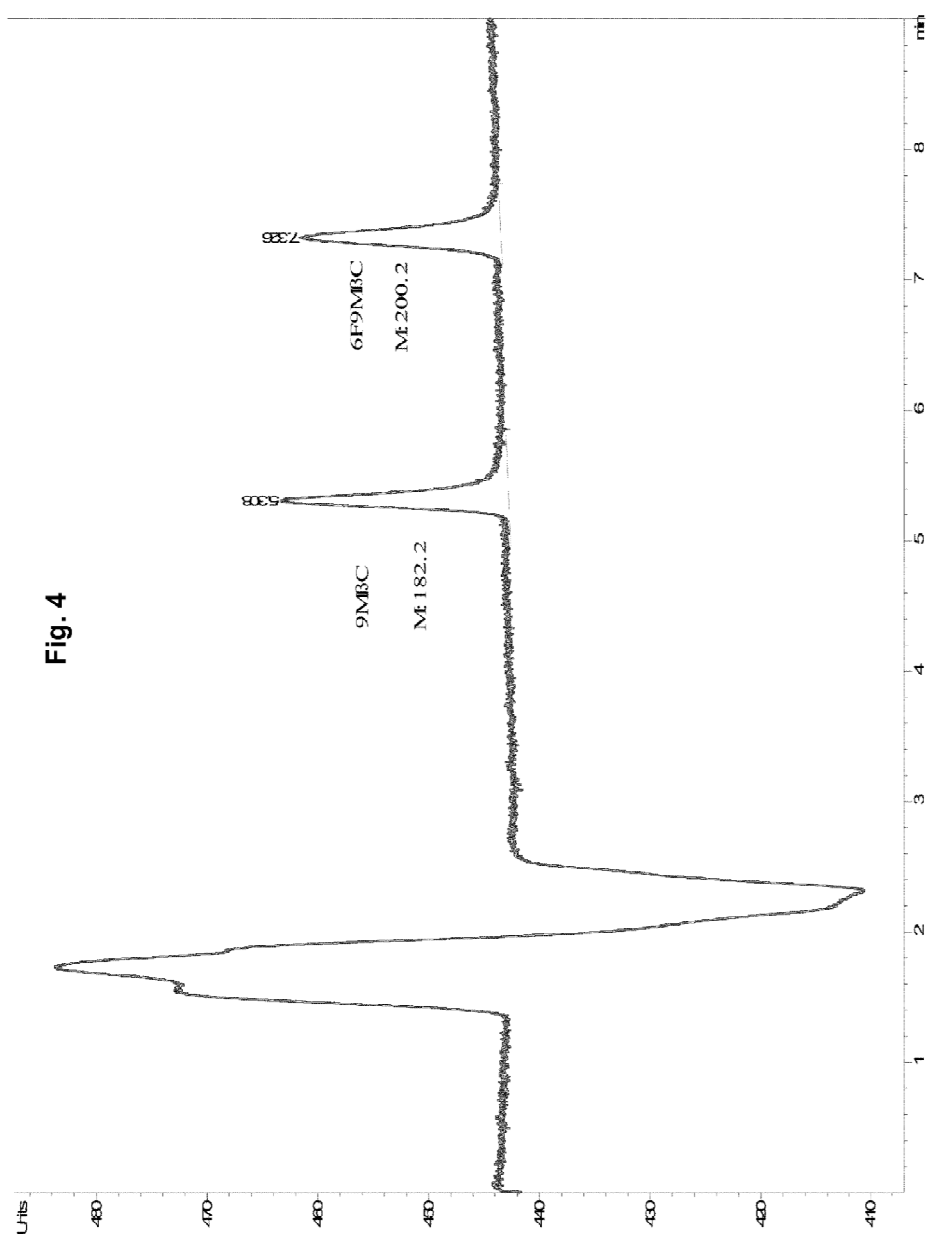


Fig. 3





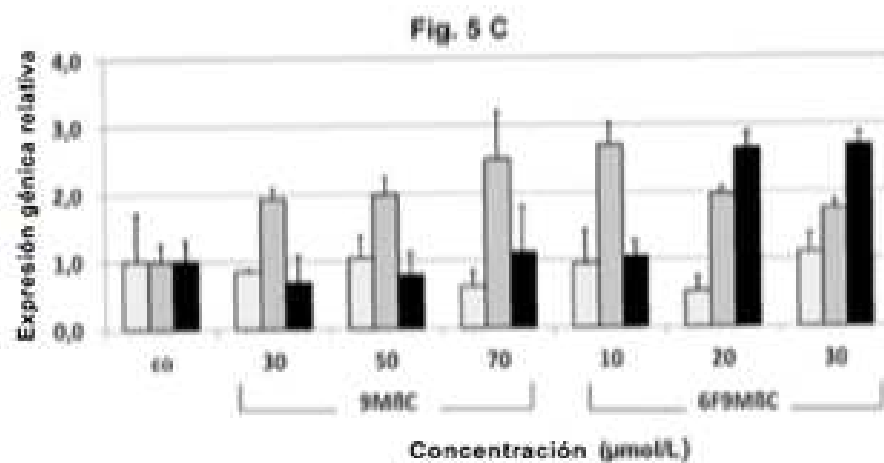
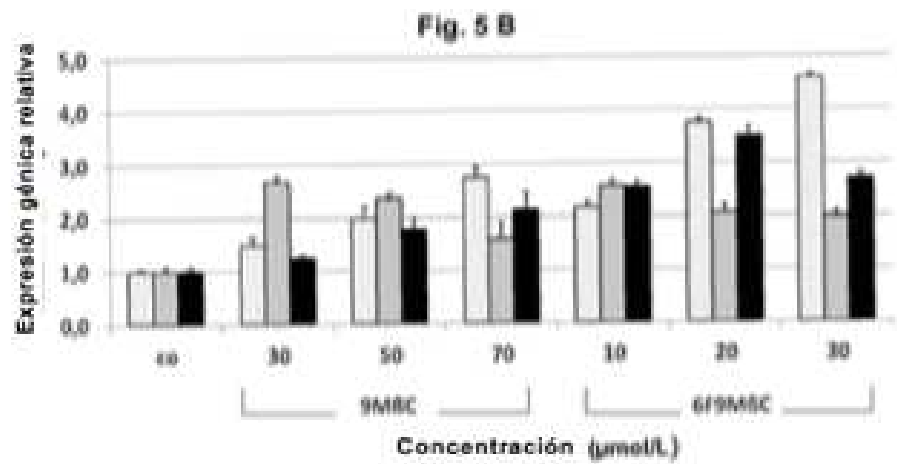
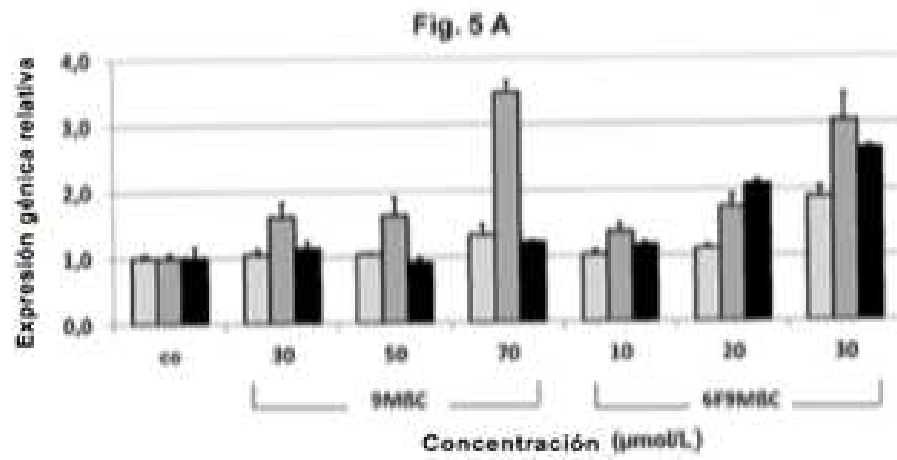


Fig. 5 D

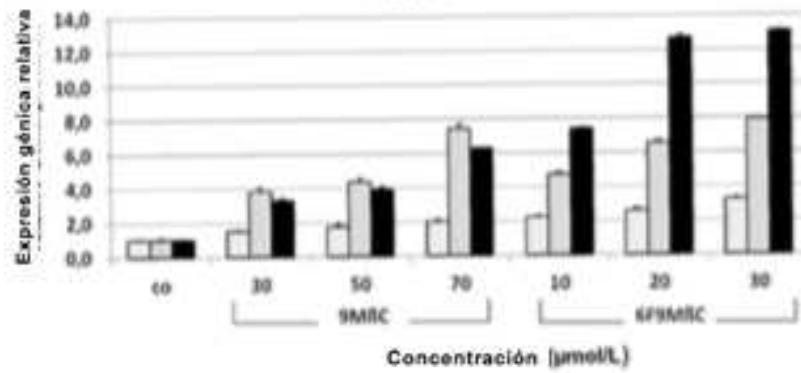


Fig. 5 E

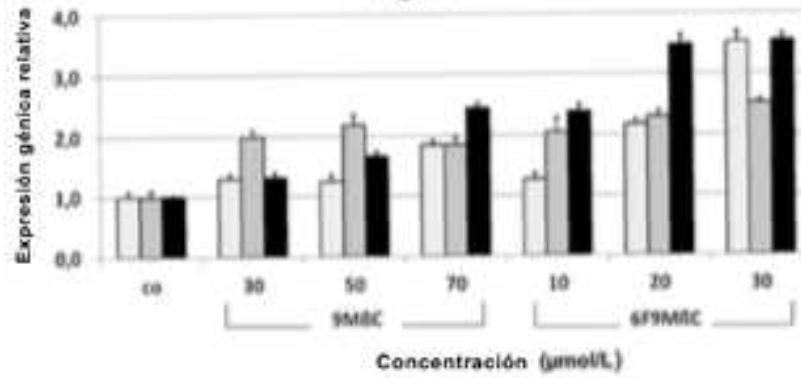


Fig. 5 F

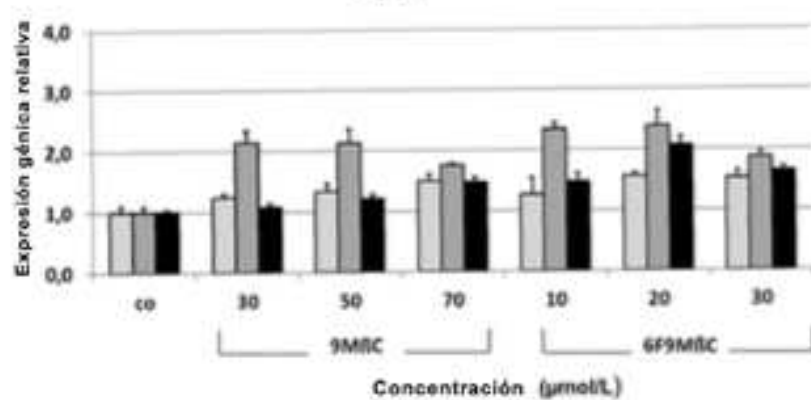


Fig. 5 G

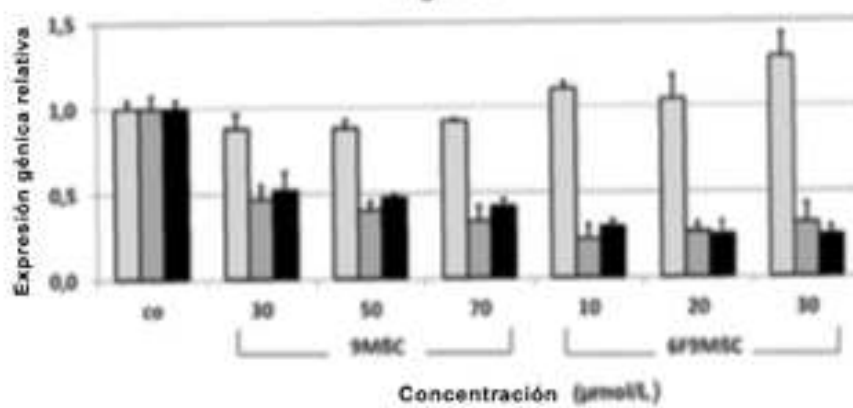


Fig. 5 H

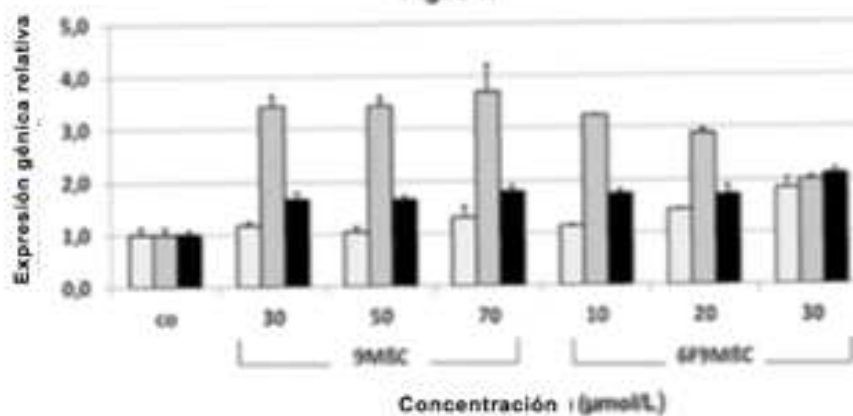


Fig. 5 I

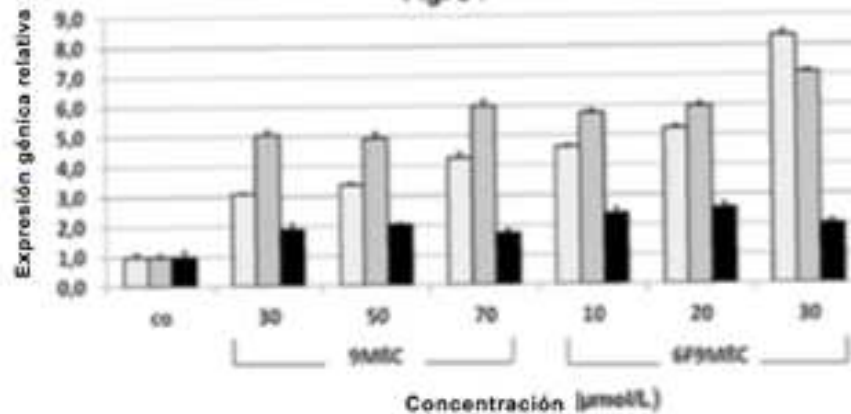


Fig. 6 A

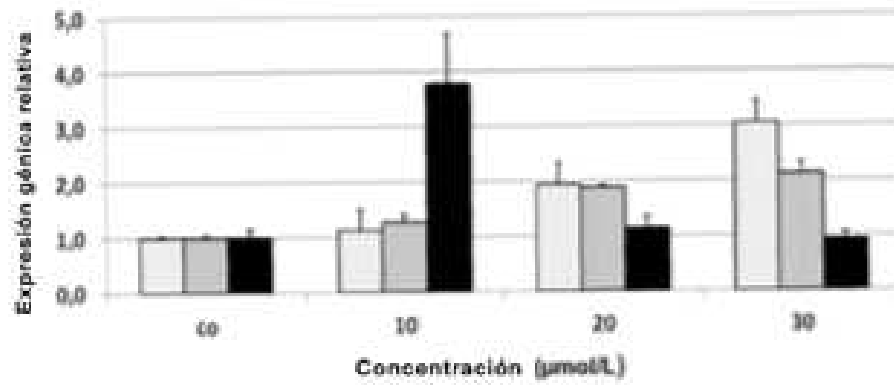


Fig. 6 B

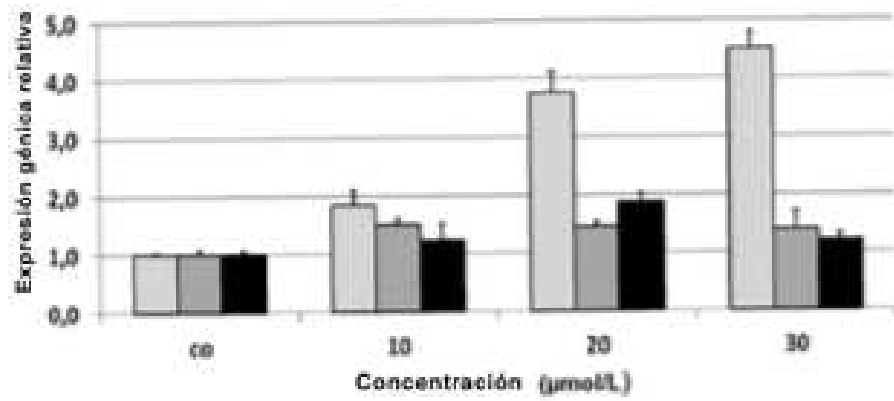


Fig. 6 C

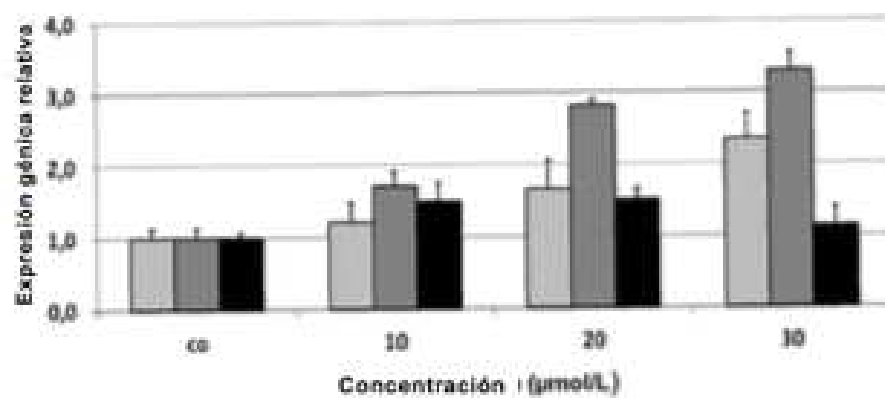


Fig. 6 D

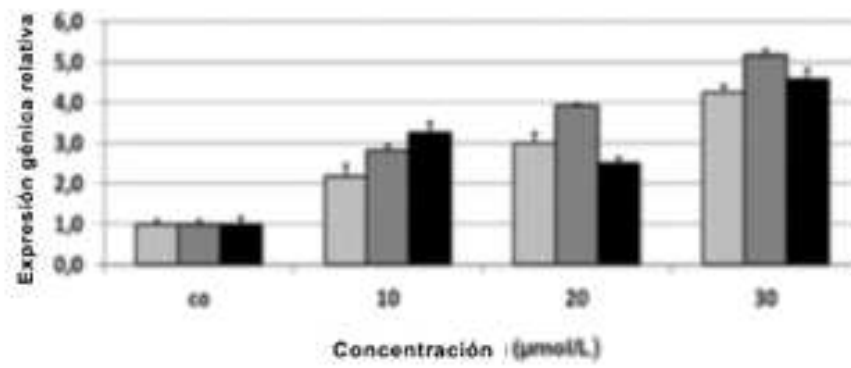


Fig. 7

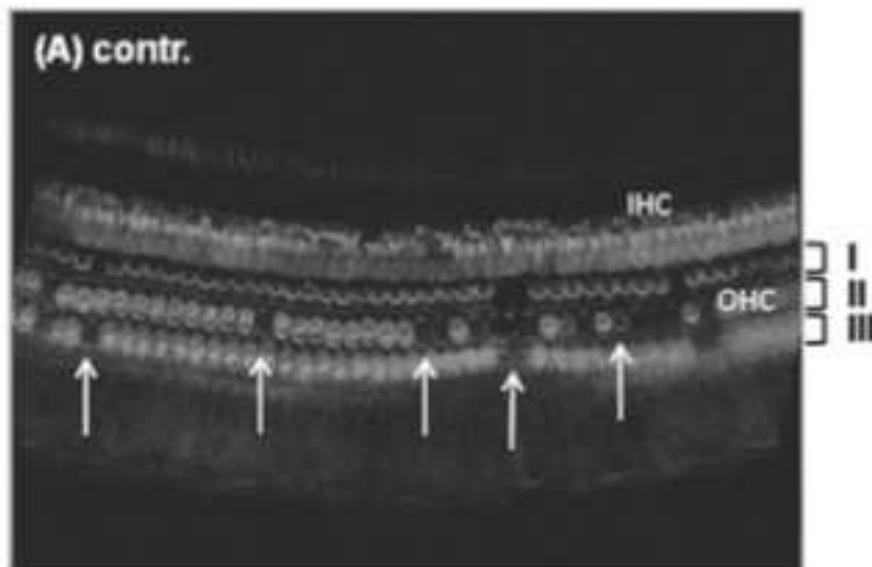


Fig. 7 B

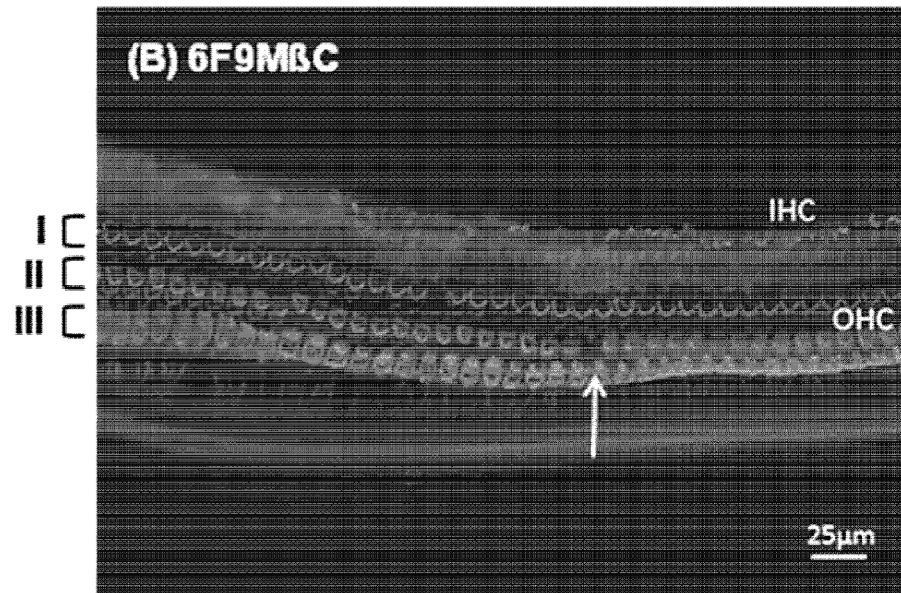


Fig. 8

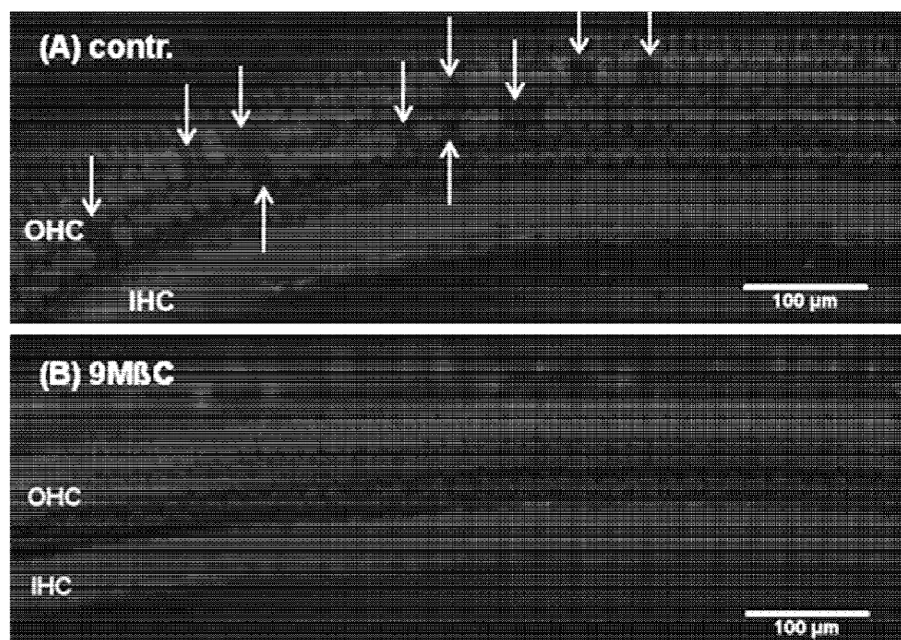


Fig. 9

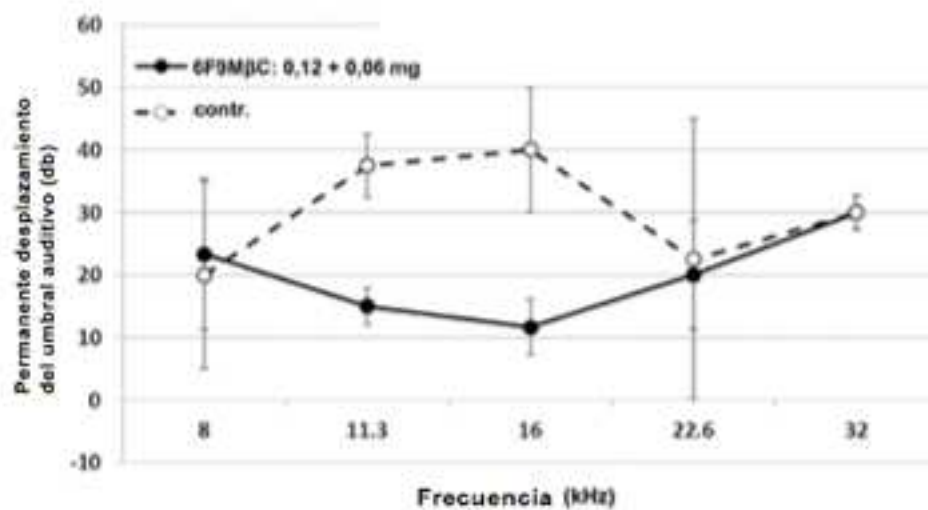


Fig. 10

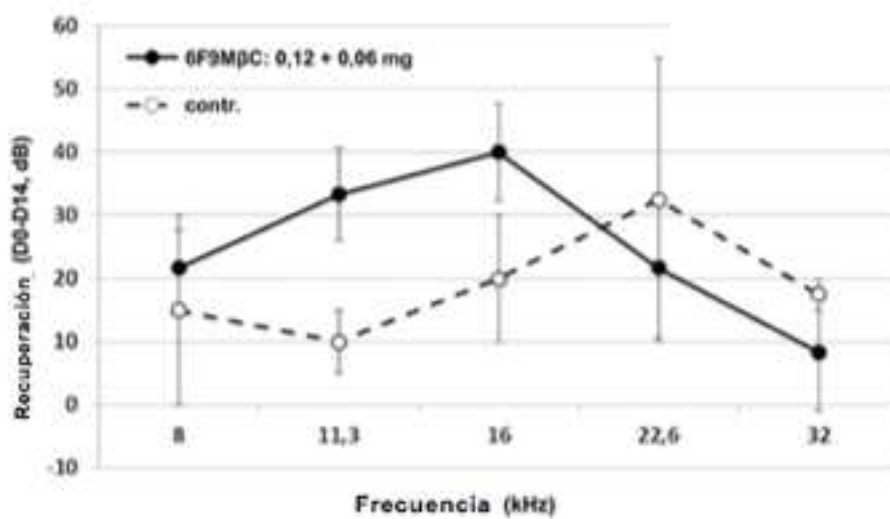


Fig. 11

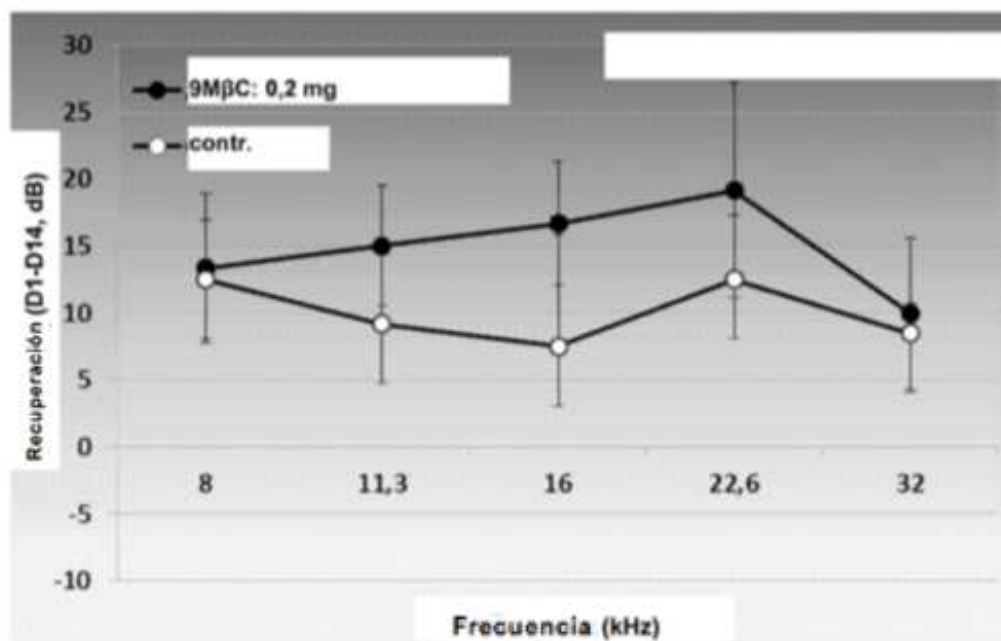


Fig. 12

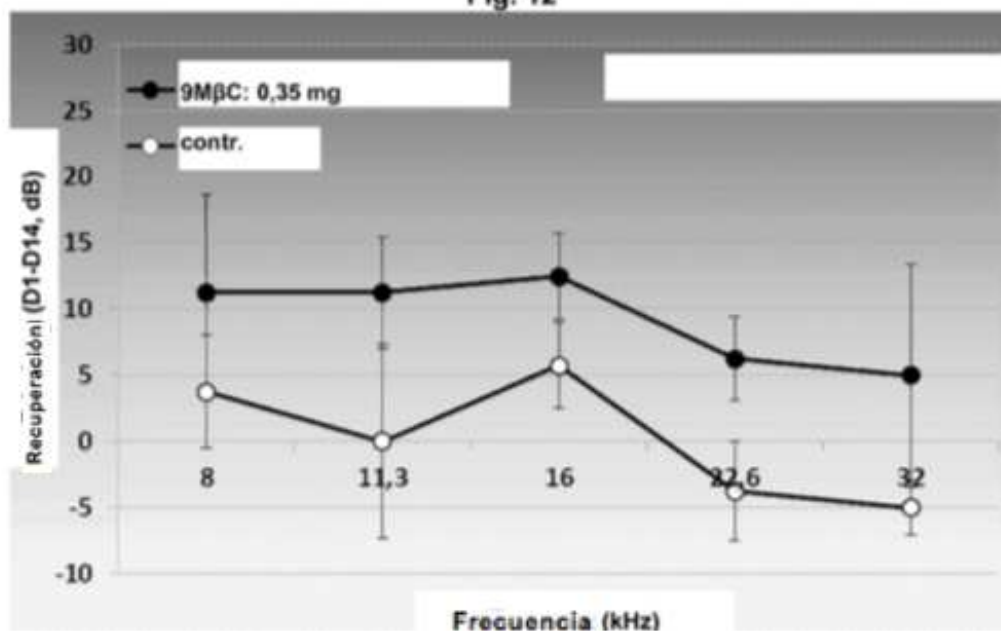


Fig. 13 A

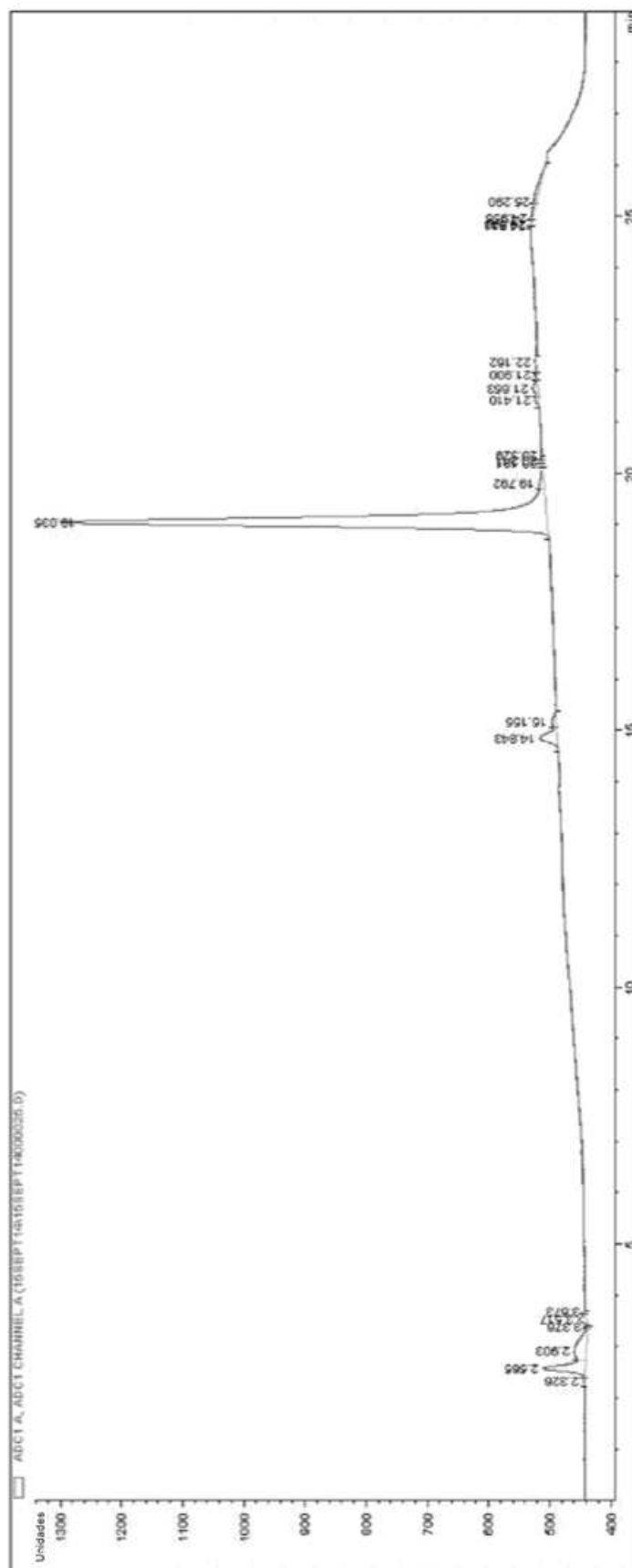


Fig. 13 B

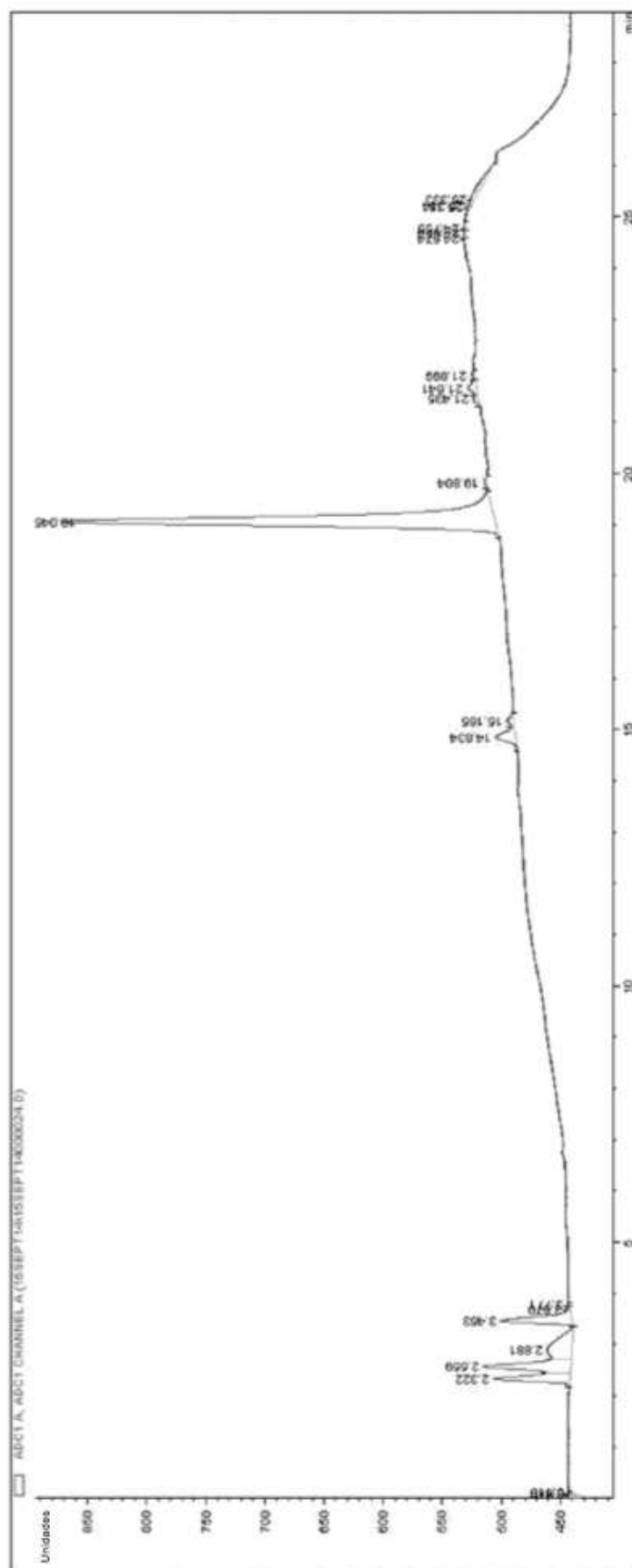


Fig. 13 C

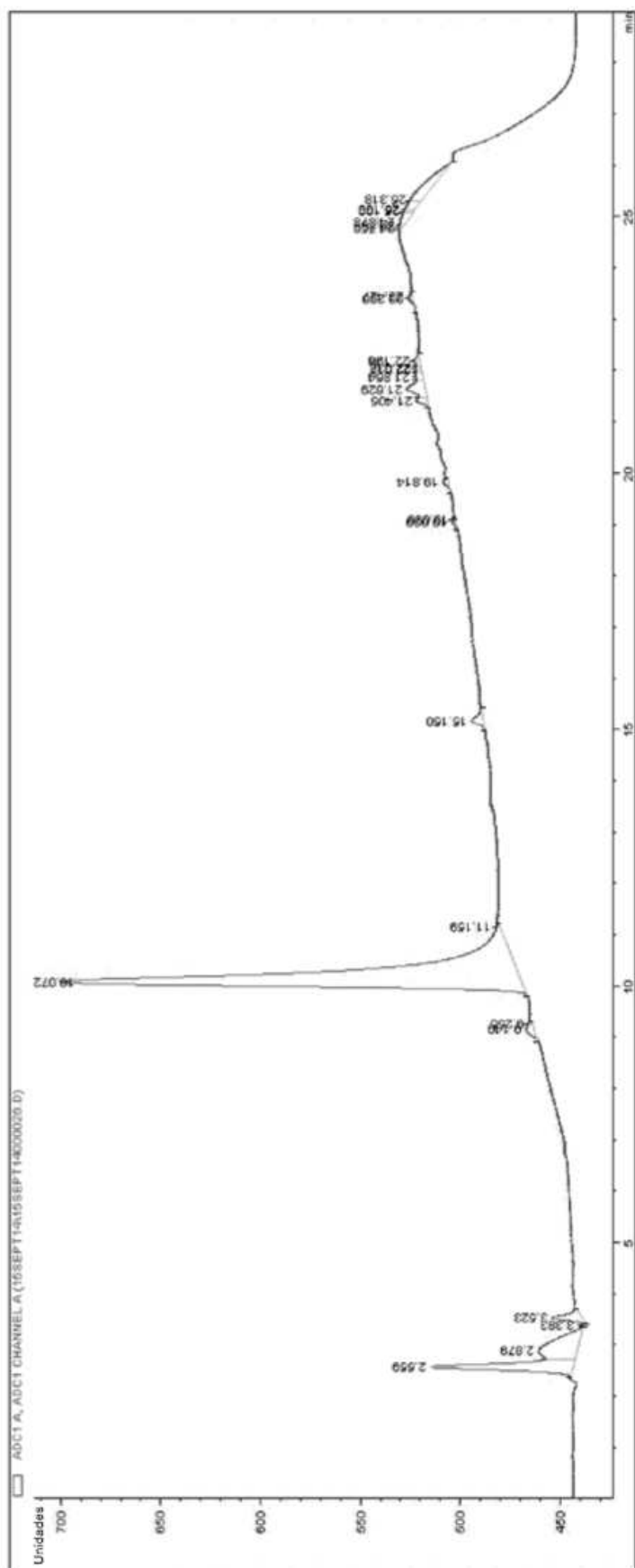


Fig. 13 D

