



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0718247-3 B1**



**(22) Data do Depósito:** 08/11/2007

**(45) Data de Concessão:** 21/09/2021

**(54) Título:** COMPOSTO USADO COMO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE MONOAMINA VESICULAR 2, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O DITO COMPOSTO E USO DA DITA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS HIPERCINÉTICOS

**(51) Int.Cl.:** C07D 471/04.

**(30) Prioridade Unionista:** 08/11/2006 US 60/864.944.

**(73) Titular(es):** NEUROCRINE BIOSCIENCES, INC..

**(72) Inventor(es):** KYLE W. GANO; NICOLE HARRIOTT.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2007084176 de 08/11/2007

**(87) Publicação PCT:** WO 2008/058261 de 15/05/2008

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 05/05/2009

**(57) Resumo:** COMPOSTOS 2-ISOBUTIL-9,10-DIMETÓXI-1,3,4,6,7,11B-HEXAIDRO-2H-PIRIDO[2,1A]ISOQUINOLIN-2OL SUBSTITUÍDOS E MÉTODOS RELACIONADOS AOS MESMOS. Compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11B-hexaidro-2H-pirido[2, 1-a]isoquinolin-2-ol- substituídos são revelados como sendo inibidores do transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2). Os compostos da invenção possuem a estrutura (I): em que R1 é como definido aqui, incluindo estereoisômeros e sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis do mesmo. Também são revelados composições contendo um composto dessa invenção em combinação com um veículo farmaceuticamente aceitável, assim como métodos relacionados com o uso em um indivíduo que necessite do mesmo.

“COMPOSTO USADO COMO INIBIDOR DO TRANSPORTADOR DE MONOAMINA VESICULAR 2, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO O DITO COMPOSTO E USO DA DITA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA NO TRATAMENTO DE TRANSTORNOS HIPERCINÉTICOS”

#### CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] Esta invenção se refere, de modo geral, aos compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituídos, sua preparação e aos métodos para tratar transtornos por administração de tais compostos a um animal de sangue quente que precise do mesmo.

#### ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[0002] 3-Isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ona, também conhecida como tetrabenazina (TBZ), vem sendo usada como um medicamento por décadas. A tetrabenazina é um inibidor potente, reversível da absorção de catecolamina pelo transportador-2 de monoamina vesicular (VMAT2) (IC<sub>50</sub> = 3,2 nM) (Scherman, e outros, Proc.Natl. Acad. Sci. USA, (1983) 80:584-8) e é usada atualmente no tratamento de vários transtornos de movimento hipercinético. Os efeitos colaterais associados à TBZ incluem sedação, depressão, acatísia e parkinsonismo. A inibição de VMAT2 por TBZ resulta no esgotamento das monoaminas do cérebro in vivo (Pettibone, D.J. e outros, Eur. J. Pharmacol. (1984) 102:431-6). TBZ também inibe os receptores de dopamina pré-sinápticos e pós-sinápticos no cérebro de ratos (Login, I.S., e outros, (1982) Ann. Neurology 12:257-62; Reches, e outros, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1983) 225:515-521). Esta atividade for a do alvo de TBZ pode ser responsável por alguns dos efeitos colaterais observados.

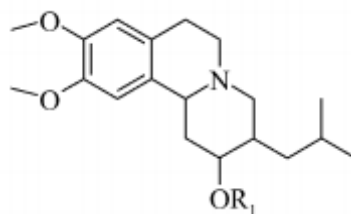
[0003] TBZ, que contém dois centros quirais e é uma mistura racêmica de dois estereoisômeros, é rápida e extensivamente metabolizada *in vivo* para sua forma reduzida, 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-

a]isoquinolin-2-ol, também conhecida como diidrotetrabenazina (HTBZ). Acredita-se que a HTBZ exista como quatro isômeros individuais: ( $\pm$ ) alfa-HTBZ e ( $\pm$ ) beta-HTBZ. Acredita-se que 2*R*, 3*R*, 11*bR* ou (+) alfa-HTBZ seja a configuração absoluta do metabólito ativo (Chirality 1997 9:59-62). Apesar do seu sucesso no tratamento dos transtornos hiperkinéticos, a tetrabenazina possui uma biodisponibilidade baixa e variável. A administração da tetrabenazina aos seres humanos é complicada pelo primeiro metabolismo de passagem extensivo e pouca ou nenhuma tetrabenazina sendo observada na urina.

[0004] Existe uma necessidade na técnica de análogos de tetrabenazina que forneçam as propriedades vantajosas da tetrabenazina, sem exposição do corpo a todos os estereoisômeros da diidrotetrabenazina. Existe também a necessidade de análogos de tetrabenazina que exibam uma meia vida mais longa que a tetrabenazina. Existe também a necessidade na técnica de análogos de tetrabenazina que exibam maior seletividade para VMAT2 que tetrabenazina. A presente invenção provê um análogo de tetrabenazina que expõe o corpo a um estereoisômero de diidrotetrabenazina, exiba seletividade maior para VMAT2 que a tetrabenazina, exiba uma meia vida mais longa que a tetrabenazina e possa exibir variabilidade mais baixa na dose necessária de paciente a paciente.

#### BREVE RESUMO DA INVENÇÃO

[0005] Em resumo, esta invenção se refere, de modo geral, aos compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11*b*-hexaidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ol substituídos, enantiômeros individuais dos mesmos, bem como aos métodos para sua preparação e uso e às composições farmacêuticas contendo os mesmos. Mais especificamente, os compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11*b*-hexaidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ol substituídos desta invenção possuem a estrutura geral que se segue (I):



(I)

[0006] incluindo estereoisômeros, sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos, onde  $R_1$  é conforme definido a seguir.

[0007] Os compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituídos desta invenção possuem utilidade em uma ampla faixa de aplicações terapêuticas e podem ser usados para tratar vários transtornos incluindo a família dos transtornos de movimento hiperkinético. Adicionalmente, estes compostos podem apresentar utilidade no tratamento de outros estados de doença ou condições que são associados à inibição do transportador 2 de monoamina vesicular (VMAT2).

[0008] Os métodos desta invenção incluem administração de uma quantidade eficaz de 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituído, preferivelmente na forma de uma composição farmacêutica, a um mamífero que precise do mesmo. Assim, ainda em uma modalidade adicional são reveladas composições farmacêuticas contendo um ou mais compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituídos desta invenção em combinação com um veículo e/ou diluente farmaceuticamente aceitável.

[0009] Estes e outros aspectos da invenção ficarão claros com referência à descrição detalhada que se segue. Para este fim, várias referências são estabelecidas aqui, as quais descreve em mais detalhes determinadas informações básicas, procedimentos, compostos e/ou composições e são incorporadas a este documento como referência em sua totalidade.

#### BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

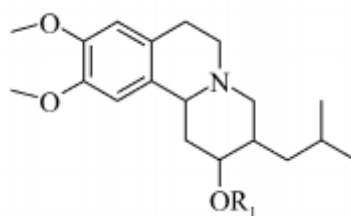
[00010] As figuras 1a, 1b, e 1c compreendem três gráficos mostrando a conversão de tetrabenazina, composto 2-1 e composto 3-1 para os seus respectivos metabólitos em hepatócitos humanos.

[00011] As figuras 2a – 2f compreendem seis gráficos mostrando o perfil de estabilidade dos compostos 3-1 e 2-1 em microsomas do fígado de rato, cão e seres humanos.

[00012] As figuras 3a – 3d compreendem quatro gráficos mostrando as propriedades farmacocinéticas dos compostos 2-1 e 3-1 em cães e ratos e de 1d.1 no rato.

### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00013] Conforme mencionado acima, a presente invenção se refere, de modo geral, aos compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituídos. Os compostos desta invenção apresentam a estrutura (I) que se segue:



(I)

e estereoisômeros, sais e solvatos farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos,

onde:

R<sub>1</sub> é:

a) -C(=O)-O-alquila; ou

b) -C(=O)-alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub>,

onde a dita alcanodiila C<sub>1-6</sub> é opcionalmente substituída com um grupo selecionado de NH C(=NH)NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>Me, SH, C(O)NH<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, SCH<sub>3</sub>, fenila, OH, 4-hidróxi-fenila, imidazolila e indolila.

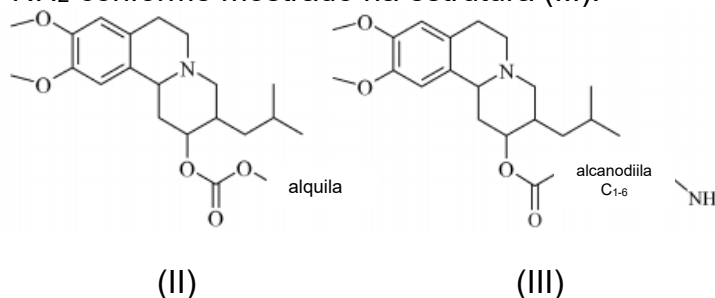
[00014] Conforme empregado aqui, os termos acima possuem o significado que se segue:

“Alquila” significa um hidrocarboneto alifático, de cadeia linear ou ramificada, não cíclico ou cíclico, insaturado ou saturado contendo de 1 a 10 átomos de carbono, enquanto o termo “alquila C<sub>1-4</sub>” possui o mesmo significado que alquila, porém contém de 1 a 4 átomos de carbono. “Alquila C<sub>1-6</sub>” possui o mesmo significado que alquila, porém contém de 1 a 6 átomos de carbono. Cadeias alquila lineares, saturadas, representativas incluem metila, etila, n-propila, n-butila, n-pentila, n-hexila, e semelhantes; enquanto alquilas ramificadas saturadas incluem isopropila, sec-butila, isobutila, *t*-butila, isopentila, e semelhantes. Alquilas cíclicas saturadas, representativas incluem ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, cicloexila, -CH<sub>2</sub>-ciclopropila, -CH<sub>2</sub>-ciclobutila, -CH<sub>2</sub>-ciclopentila, -CH<sub>2</sub>-cicloexila, e semelhantes; enquanto alquilas cíclicas insaturadas incluem ciclopentenila e cicloexenila, e semelhantes. Alquilas cíclicas incluem anéis di e poli-homocíclicos, tais como, decalina e adamantila. Alquilas não saturadas contém pelo menos uma ligação dupla ou tripla entre átomos de carbono (referidas como uma “alquenila” ou “alquinila”, respectivamente). Alquenilas de cadeia linear ou ramificada representativas incluem etilenila, propilenila, 1-butenila, 2-butenila, isobutilenila, 1-pentenila, 2-pentenila, 3-metil-1-butenila, 2-metil-2-butenila, 2,3-dimetil-2-butenila, e semelhantes; enquanto alquinilas de cadeia linear ou ramificada representativas incluem acetilenila, propinila, 1-butenila, 2-butenila, 1-pentinila, 2-pentinila, 3-metil-1 butinila, e semelhantes.

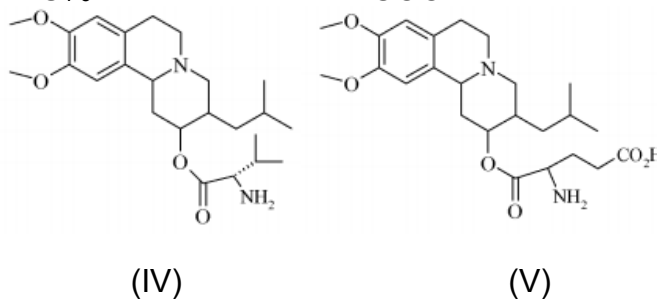
“Acanodiila C<sub>1-6</sub>” significa uma alquila C<sub>1-6</sub> divalente da qual dois átomos de hidrogênio foram retirados do mesmo átomo de carbono ou de átomos de carbono diferentes, tais como, CH<sub>2</sub>-, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)- -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, e semelhantes.

“Resíduo de aminoácido” significa uma estrutura e aminoácido que não possui a hidroxila do grupo  $\alpha$ -carboxila. Por exemplo, o resíduo de alanina é  $C(=O)CH(NH_2)CH_3$ .

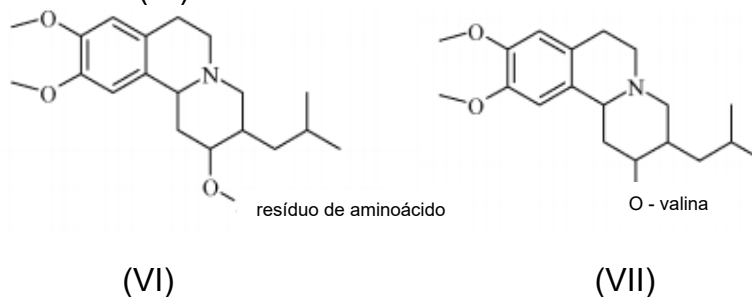
[00015] Em uma modalidade,  $R_1$  da estrutura (I) é  $-C(=O)O$ -alquila conforme mostrado na estrutura (II) e em outra modalidade,  $R_1$  da estrutura (I) é  $-C(=O)$ -alcanodiil  $C_{1-6}$ - $NH_2$  conforme mostrado na estrutura (III).



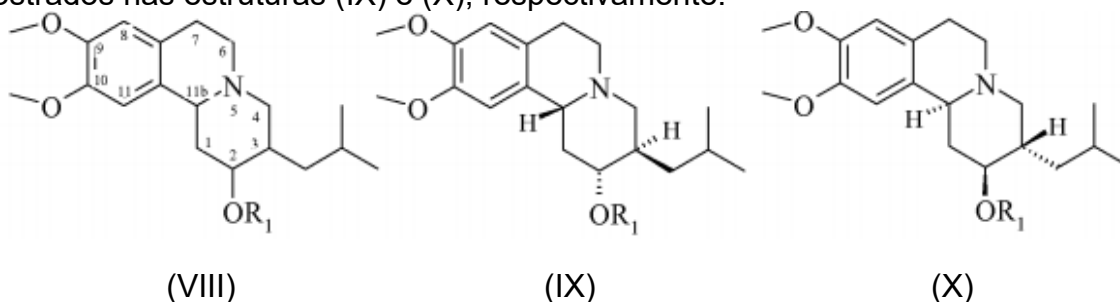
[00016] Em uma modalidade, a estrutura alcanodiil  $C_{1-6}$ - $NH_2$  da estrutura (III) é (S)-1-amino-2-metil-propan-1-ila conforme mostrado na estrutura (IV). A estrutura (V) mostra uma modalidade da estrutura (I) onde  $R_1$  é  $-C(=O)$ -alcanodiil  $C_{1-6}$ - $NH_2$  e a alcanodiila  $C_{1-6}$  é substituída com  $-COOH$ .



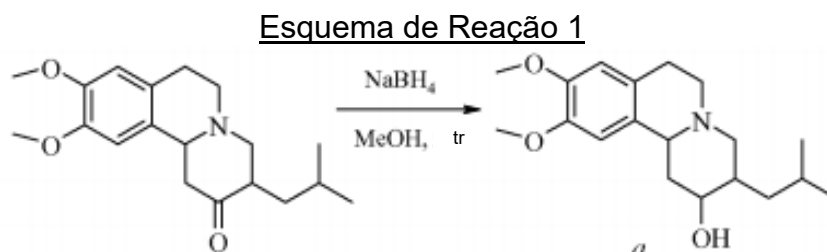
[00017] Nas modalidades adicionais,  $R_1$  da estrutura (I) é um resíduo de aminoácido conforme mostrado na estrutura (VI). A estrutura (VII) mostra uma modalidade da estrutura (VI) onde o resíduo de aminoácido é valina.



[00018] Em uma modalidade, os compostos da presente invenção podem existir como a mistura racêmica, como um par diastereomérico ou como o enantiômero individual ou mistura de enantiômeros. A estrutura (VIII) mostra a numeração do anel para os compostos 3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol substituídos da invenção. Estereocentros estão localizados nas posições 2, 3, e 11b do sistema do anel. Os compostos da presente invenção incluem a configuração 2*R*, 3*R*, 11*bR*, bem como os enantiômeros 2*R*, 3*R*, 11*bS*, os 2*R*, 3*S*, 11*bR*, os 2*S*, 3*R*, 11*bR*, os 2*R*, 3*S*, 11*bS*, os 2*S*, 3*R*, 11*bS*, os 2*S*, 3*S*, 11*bR*, e os enantiômeros 2*S*, 3*S*, 11*bS*. Os enantiômeros 2*R*, 3*R*, 11*bR* e 2*S*, 3*S*, 11*bS* são mostrados nas estruturas (IX) e (X), respectivamente.



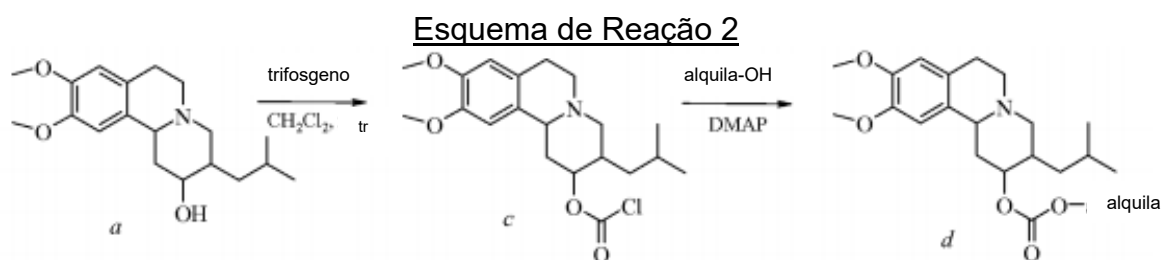
[00019] Os compostos da presente invenção podem ser preparados por técnicas de síntese orgânica conhecidas, incluindo os métodos descritos em mais detalhes nos Exemplos. Em geral, os compostos da estrutura (I) acima podem ser fabricados pelos esquemas de reação que se seguem onde todos os substituintes são definidos acima, a menos que de outra forma indicado.



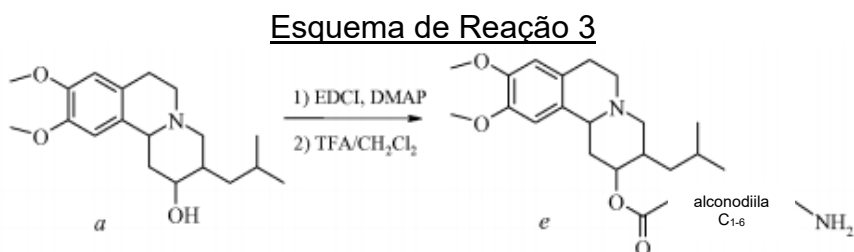
[00020] A redução de uma mistura racêmica de *R,R* e *S,S* tetrabenazina com um agente de redução de boroidreto fornece diidrotetrabenazina a. Quando o agente de redução for boroidreto tri-sec-butil lítio (L-Selectrida), predominantemente



os isômeros 2*S*, 3*R*, 11*bR* e 2*R*, 3*S*, 11*bS* serão gerados. O uso de boroidreto de sódio resulta em uma mistura de todos os 4 estereoisômeros. Os estereoisômeros remanescentes podem ser sintetizados por tomar-se qualquer ou todos os estereoisômeros gerados anteriormente e reagir os mesmos com agente de desidratação, tal como, pentacloreto de fósforo para formar o composto insaturado que é então reidratado estereoseletivamente, por exemplo, um procedimento de hidroboração usando borano-THF para formar um complexo borano que é oxidado na diidrotetrabenazina apropriada com peróxido de hidrogênio (Clarke e outros, WO2005077946). Os produtos racêmicos podem ser adicionalmente separados por cromatografia quiral nos enantiômeros individuais por cromatografia quiral.



[00021] O intermediário de cloroformato *c* pode ser gerado por tratamento de *a* com fosgeno ou trifosgeno. O tratamento de *c* com um álcool na presença de uma base, tal como DMAP, gera o produto de carbonato *d*. Alternativamente, o carbonato *d* pode ser gerado diretamente por tratamento do álcool *a* com um pirocarbonato sob catálise com DMAP.



[00022] Diidrotetrabenazina *a* é condensada com um aminoácido protegido com BOC empregando cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) e dimetilaminopiridina (DMAP) em dimetilformamida e cloreto

de metileno, seguido por desproteção da funcionalidade de BOC, por exemplo, com solução de ácido trifluoracético/cloreto de metileno a 50/50 para fornecer e. Alternativamente, diidrotetrabenazina a pode ser condensada com um aminoácido protegido com CBZ usando DCC (1,3-dicicloexilcarbodiimida) seguido por desproteção da funcionalidade de CBZ por hidrogenação sob condições apropriadas.

[00023] Os compostos da presente invenção exibem funcionalidade maior para VMAT2 em relação a tetrabenazina. Como resultado, eles podem prover propriedades desejáveis de tetrabenazina sem todos os efeitos colaterais indesejáveis. Além disto, conforme mostrado nas figuras 3<sup>a</sup>-3d, determinados compostos desta invenção, tal como, por exemplo, o 2-1, fornecem inesperadamente uma duração mais longa de ação que a tetrabenazina. Isto pode ser especificamente benéfico porque pode permitir um regime de administração que requer menos doses por dia em relação à tetrabenazina. Por exemplo, enquanto a tetrabenazina é tipicamente administrada 2-3 vezes ao dia, determinados compostos desta invenção, tais como, por exemplo, composto 2-1, podem ser terapeuticamente eficazes quando administrados uma vez ao dia. Assim, em razão da duração inesperadamente mais longa de ação fornecida por estes compostos, uma dose diária pode ser obtida.

[00024] Os compostos da presente invenção incluem os ésteres que se seguem:

Éster                      3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do ácido (S)-2-amino-3-metil-butírico

[00025] Os compostos da presente invenção incluem os carbonatos que se seguem:

Éster                      3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster etílico do ácido carbônico

Éster                      3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster butílico do ácido carbônico

Éster                    3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster pentílico do ácido carbônico

Éster                    3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster isobutílico do ácido carbônico

Éster                    3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster sec-butílico do ácido carbônico

Éster                    3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster 3-metil-butílico do ácido carbônico;

Éster                    3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do éster t-butílico do ácido carbônico;

[00026] Os compostos da presente invenção podem ser usados, de modo geral, como o ácido livre ou a base livre. Alternativamente, os compostos desta invenção podem ser usados na forma de sais de adição de ácido ou base. Os sais de adição de ácido dos compostos amino livres da presente invenção podem ser preparados por métodos bem conhecidos na arte, e podem ser formados de ácidos orgânicos e inorgânicos. Ácidos orgânicos apropriados incluem ácido maléico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanossulfônico, acético, trifluoracético, oxálico, propiônico, tartárico, salicílico, cítrico, glucônico, láctico, mandélico, cinâmico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutâmico e ácidos benzenossulfônicos. Ácidos inorgânicos apropriados incluem ácido clorídrico, bromídrico, sulfúrico, fosfórico e ácidos nítricos. Sais de adição de base incluem sais que se formam com o ânion carboxilato e incluem sais formados com cátions orgânicos e inorgânicos, tais como aqueles escolhidos de metais alcalinos e alcalino terrosos (por exemplo, lítio, sódio, potássio, magnésio, bário e cálcio), bem como o íon amônio e derivados substituídos do mesmo (por exemplo, dibenzilamônio, benzilamônio, 2-hidroxietilamônio e semelhantes). Assim o termo “sal farmaceuticamente aceitável” da estrutura (I) pretende englobar quaisquer e todas as formas de sal aceitáveis.

[00027] Com relação aos estereoisômeros, os compostos da estrutura (I) podem ter centros quirais e podem ocorrer como racematos, misturas racêmicas e como enantiômeros ou diastereômeros individuais. Todas tais formas isoméricas estão incluídas dentro da presente invenção, incluindo misturas das mesmas. Adicionalmente, algumas das formas cristalinas dos compostos da estrutura (I) podem existir como polimorfos, que estão incluídos na presente invenção. Além disto, alguns dos compostos da estrutura (I) podem também formar solvatos com água ou outros solventes orgânicos. Tais solvatos estão incluídos, de modo semelhante, dentro do escopo desta invenção.

[00028] Conforme mencionado acima, os compostos desta invenção e seus sais podem reduzir o fornecimento de monoaminas no sistema nervoso central por inibição da isoforma de transportador de monoamina humana 2 (VMAT2). Como tal, estes compostos e seus sais podem ter utilidade em relação a uma ampla faixa de aplicações terapêuticas e podem ser usados para tratar uma variedade de transtornos que são causados ou ligados para inibição da isoforma de transportador de monoamina humana 2. Estes transtornos incluem transtornos hipercinéticos.

[00029] Em uma modalidade, as condições que podem ser tratadas pelos compostos da presente invenção incluem, porém não estão limitados ao tratamento dos transtornos hipercinéticos, tais como, doença de Huntington, discinésia tardia, síndrome de Tourette e tique.

[00030] Em outra modalidade da invenção, os compostos desta invenção e seus sais podem ser hidrolisados no corpo de um mamífero nos compostos que podem inibir a isoforma de transportador de monoamina humana 2. Como tal, estes compostos e seus sais podem ter utilidade adicional na alteração das propriedades *in vivo* do metabólito em um mamífero, tal como a concentração ou duração máxima da ação.

[00031] Em outra modalidade da invenção, são reveladas as composições farmacêuticas contendo um ou mais inibidores de reabsorção de monoamina. Para os fins de administração, os compostos da presente invenção podem ser formulados como composições farmacêuticas. As composições farmacêuticas da presente invenção compreendem um inibidor de reabsorção de monoamina da presente invenção e um veículo e/ou diluente farmaceuticamente aceitável. O inibidor VMAT2 está presença na composição em uma quantidade que é eficaz para tratar um transtorno específico, isto é, em uma quantidade suficiente para reduzir o fornecimento de monoaminas no sistema nervoso central e, preferivelmente, com toxicidade aceitável pelo paciente. Concentrações e dosagens apropriadas podem ser prontamente determinadas por um versado na técnica.

[00032] Veículos farmaceuticamente aceitáveis e/ou diluentes são familiares aos versados na técnica. Para composições formuladas como soluções líquidas, veículos aceitáveis e/ou diluentes incluem salmoura e água estéril e podem incluir opcionalmente antioxidantes, tampões, bacteriostatos e outros aditivos comuns. As composições também podem ser formuladas como pílulas, cápsulas, grânulos ou comprimidos que contém, além do inibidor de VMAT2, diluentes, agentes ativos de superfície e dispersão, ligantes e lubrificantes. Um versado na técnica pode formular, adicionalmente, o inibidor VMAT2 em um modo apropriado e de acordo com as práticas aceitas, tal como revelado em *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA 1990.

[00033] Em outra modalidade, a presente invenção provê um método para tratamento de transtornos do sistema nervoso central ou periférico. Tais métodos incluem administração do composto da presente invenção a um animal de sangue quente, em uma quantidade suficiente para tratar a condição. Neste contexto, “tratar” inclui administração profilática. Tais métodos incluem administração sistêmica de um inibidor de VMAT2 desta invenção, preferivelmente na forma de uma composição

farmacêutica, conforme discutido acima. Conforme usado neste documento, administração sistêmica inclui métodos de administração oral e parenteral. Para administração oral, composições farmacêuticas apropriadas incluem pós, grânulos, pílulas, comprimidos e cápsulas, bem como líquidos, xaropes, suspensões e emulsões. Estas composições também podem incluir aromatizantes, preservantes, agentes de suspensão, espessamento e emulsionantes e outros aditivos farmacêuticamente aceitáveis. Para administração parenteral, os compostos da presente invenção podem ser preparados em soluções aquosas de injeção que podem conter, além do inibidor de VMAT2, tampões, antioxidantes, bacteriostatos e outros aditivos geralmente empregados em tais soluções.

### Exemplos

#### **Métodos HPLC para análise das amostras**

Tempo de Retenção,  $t_R$ , em minutos

#### Método 1 Analítico de HPLC-EM (LCDaily)

Plataforma: Agilent série 1100: equipada com um autoamostrador, um detector de UV (220 nm e 254 nm), um detector de EM (APCI);

Coluna de HPLC: Phenomenex Synergi-Max RP 80A, coluna 2,0 x 50 mm;

Gradiente de HPLC: 1,0 mL/minuto, de acetonitrila a 10% em água a acetonitrila a 90% em água em dois minutos e meio, mantendo 90% por 1 minuto. Ambas acetonitrila e água possuem TFA a 0,25%.

#### Método 2 Analítico de HPLC-EM (LCDaily)

Plataforma: Agilent série 1100: equipada com um autoamostrador, um detector de UV (220 nm e 254 nm), um detector de EM (APCI);

Coluna de HPLC: Phenomenex Synergi-Max RP 80A, coluna 2,0 x 50 mm;

Gradiente de HPLC: 1,0 mL/minuto, de acetonitrila a 5% em água a acetonitrila a 95% em água em treze minutos e meio, mantendo 90% por 2 minutos. Ambas acetonitrila e água possuem TFA a 0,25%.

### Método 3 Analítico de HPLC-EM (Greasy)

Plataforma: Autoamostrador Gilson 215, Compartimento de Coluna Dionex Thermostatted TCC-100 mantido a 30°C, Detector Array de Fotodiodo Dionex PDA-100 (220 nm e 254 nm), Bomba Dionex P680 HPLC, Espectrômetro de Massa Térmico quadrangular simples Finnigan MSQ (APCI)

Coluna de HPLC: Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C18 110A, 4,6 x 150 mm

Gradiente de HPLC: 2,5 mL/minuto, acetonitrila a 5% em água a acetonitrila a 90% em água em 9 minutos e 86 segundos a partir de acetonitrila a 90% em água a acetonitrila a 95% em água em 1 segundo, mantendo a 95% por 1 minuto e 19 segundos. Ambas acetonitrila e água possuem NH<sub>4</sub>OH a 0,04%.

### Método 4 Analítico de HPLC-EM (Greasy)

Plataforma: Autoamostrador Gilson 215, Compartimento de Coluna Dionex Thermostatted TCC-100 mantido a 30°C, Detector Array de Fotodiodo Dionex PDA-100 (220 nm e 254 nm), Bomba Dionex P680 HPLC, Espectrômetro de Massa Térmico quadrangular simples Finnigan MSQ (APCI)

Coluna de HPLC: Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C18 110A, 3,0 x 150 mm

Gradiente de HPLC: 1,5 mL/minuto, acetonitrila a 5% em água a acetonitrila a 90% em água em 9 minutos e 86 segundos a partir de acetonitrila a 90% em água a acetonitrila a 95% em água em 1 segundo, mantendo a 95% por 1 minuto e 19 segundos. Ambas acetonitrila e água possuem NH<sub>4</sub>OH a 0,04%.

### Cromatografia de Fluido Supercrítico Quiral para Método 1 de Separação Quiral

Plataforma: Sistema Berger Multigram II SFC da Autochem

Coluna: Chiralcel OD-H, 2,1 x 25 cm, coluna SFC

Modificador: metanol a 20%

Taxa de circulação: 60 mL/minuto

Pressão: 10 MPa

Temperatura do forno: 35°C

Carregamento: aproximadamente 14 mg/injeção (metanol)

Cromatografia de Fluido Supercrítico Quiral para Método 2 de Separação Quiral

Plataforma: Sistema Berger Multigram II SFC da Autochem

Coluna: Chiralpak AS-H, 2,1 x 25 cm, coluna de SFC

Modificador: metanol a 20%

Taxa de circulação: 60 mL/minuto

Pressão: 10 MPa

Temperatura do forno: 35°C

Carregamento: 40 mg/injeção (MeOH)

Cromatografia de Fluido Supercrítico Quiral para Método 3 de Separação Quiral

Coluna: Chiralpak IA, 2,1 x 25 cm, coluna SFC

Modificador: 28% (Metanol/Acetona = 7:3)

Taxa de circulação: 55 mL/minuto

Pressão: 10 MPa

Temperatura do forno: 35°C

Carregamento: 50 mg/injeção

[00034] A amostra foi dissolvida em mistura de 1:1 de Metanol/Acetona. A concentração final foi de 50 mg/mL.

Exemplo 1

(2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol ((2R,3R,11bR)-diidrotetrabenazina)

Etapa 1A: 3-Dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona

[00035] HCl de dimetilamina (90 g, 1,1 mol), 5-metil-2-hexanona (450 mL, 3,3 mol) e aldeído paraformico (50 g, 1,7 mol) foram suspensos em MeOH (80 mL) e HCl concentrado (200 µL) foi adicionado. A mistura de reação foi aquecida a 80°C por 12 horas. A mistura foi deixada resfriar para temperatura ambiente e NaOH a 10% foi adicionado até se tornar básica. A mistura inteira foi extraída com Et<sub>2</sub>O (100 mL, 2



vezes). A camada orgânica foi seca sobre  $\text{MgSO}_4$  e concentrada. A mistura de reação bruta foi passada por coluna através de cromatografia de coluna flash (0,5:9,5  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) para fornecer 30 g (175 mmol) de 3-dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona 1a com um rendimento de 16%.

#### Etapa 1B: Metiodeto de 3-dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona

[00036] A um frasco de fundo redondo foi adicionada 3-dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona 1a (30 g, 175 mmol) e  $\text{EtOAc}$  (300 mL) seguido por iodeto de metila (22 mL, 351 mmol). A mistura foi agitada por toda noite e um precipitado branco se formou. O precipitado foi filtrado, lavado com  $\text{Et}_2\text{O}$  (150 mL, 3 vezes) e seco para render metiodeto de 3-dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona 1b (44,9 g, 81% de rendimento) como um sólido branco em lanugem.

#### Etapa 1C: Tetrabenazina

[00037] A um frasco de fundo redondo foram adicionados 6,7-dimetóxi-3,4-diidroisoquinolina (13 g, 67,8 mmol), metiodeto de 3-dimetilaminometil-5-metil-hexan-2-ona 1b (26 g, 81,4 mmol) e  $\text{EtOH}$  (130 mL). A suspensão foi aquecida a 80 °C durante a noite. A mistura de reação foi deixada resfriar para temperatura ambiente e  $\text{H}_2\text{O}$  (200 mL) foi adicionado formando um precipitado. O  $\text{EtOH}$  foi removido *in vacuo* e  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (400 mL) foi adicionado. Uma solução de  $\text{NaOH}$  a 10% foi adicionada à mistura até se tornar básico. A camada aquosa foi então extraída 3 vezes com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas sobre  $\text{MgSO}_4$  e concentradas. A mistura de reação bruta foi purificada via cromatografia de coluna flash (0,5:9,5 acetona: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e adicionalmente recristalizada a partir de  $\text{EtOAc}$  e Hexanos para fornecer 16,1 g (51 mmol) de uma mistura racêmica de (3S,11bS) e (3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ona 1c (tetrabenazina, TBZ) com 75% de rendimento. Os enantiômeros of tetrabenazina foram separados por SFC empregando uma coluna Chiralpak AD-H com  $\text{CAN}/\text{MeOH}$  a 15% mais DMEA a 0,5% a 2,5 mL/minuto a 10 MPa e 35°C para

render 4,3 g de (3R,11bR)-tetrabenazina 1c.1 e 4,3 g de (3S,11bS)-tetrabenazina 1c.2.

(3R,11bR)-tetrabenazina 1c.1: EM calculado: (317); Encontrado 318,7 (M + H).

(3S,11bS)-tetrabenazina 1c.2: EM calculado: (317); Encontrado 318,7 (M + H).

Etapa 1D: (2R,3R,11bR)-3-Isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol

[00038] (3R,11bR)-Tetrabenazina 1c.1 (2 g, 6,3 mmol) foi dissolvida em EtOH (70 mL) e resfriada para 0°C. Boroidreto de sódio (261 mg, 6,9 mmol) foi então adicionado em porções a 0°C. A reação estava completa após 30 minutos e foi saturada com NH<sub>4</sub>Cl saturado (4 mL). O precipitado branco formado foi filtrado e lavado com EtOH (5 mL, 2 vezes). O EtOH foi removido *in vacuo* e a camada aquosa extraída 3 vezes com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL). As camadas orgânicas foram combinadas, secas sobre MgSO<sub>4</sub> e concentradas. O produto bruto foi purificado através de cromatografia de coluna flash (0,5:9,5 MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para fornecer 1,6 g (5 mmol) de (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol ((2R,3R,11bR)-diidrotetrabenazina) 1d.1 e 410 mg (1,3 mmol) de (2S,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol ((2S,3R,11bR)-diidrotetrabenazina) 1d.2.

(2R,3R,11bR)-Diidrotetrabenazina 1d.1: EM calculado: (319); Encontrado 320.3 (M + H).

(2S,3R,11bR)-Diidrotetrabenazina 1d.2: EM calculado: (319); Encontrado 320.3 (M + H).

## Exemplo 2

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do ácido (S)-2-amino-3-metil-butírico

Etapa 2A: Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-1 do ácido (S)-2-amino-3-metil-butírico

[00039] (2R,3R,11bR)-3-Isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol 1d.1 (200 mg, 0,63 mmol) foi dissolvido em 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e DMAP (75,0 mg, 0,63 mmol) e Cbz-L-valina (190 mg, 0,75 mmol) foram adicionados e a mistura agitada por 5 minutos. DCC (155 mg, 0,75 mmol) foi adicionado e um precipitado branco se formou imediatamente. A mistura foi agitada por toda noite então filtrada e concentrada. Purificação através de cromatografia de coluna flash (0,2: 9,8, MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) forneceu 360 mg (0,63 mmol) do éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2a do ácido 2-benziloxicarbonilamino-3-metil-butírico como um sólido amarelo pálido em rendimento quantitativo. O composto 2a (163 mg, 0,29 mmol) foi dissolvido em MeOH (10 mL) e Pd/C foi adicionado e a mistura foi purgada com H<sub>2</sub>. A mistura foi agitada por toda noite, filtrada através de celite e concentrada. Purificação através de cromatografia de coluna flash (0,5: 9,5, MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) forneceu 105 mg (0,25 mmol) do éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-1 do ácido (S)-2-amino-3-metil-butírico em 85% de rendimento. EM calculado: (419); Encontrado 419,3 (M + H) NBI98854

[00040] Compostos adicionais sintetizados pelo mesmo procedimento empregando diferentes aminoácidos incluem:

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-2 do ácido (R)-2-amino-4-metil-pentanóico. EM calculado: (433); Encontrado 433,4 (M + H) ;NBI123668

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-3 do ácido (S)-2-amino-4-metil-pentanóico. EM calculado: (433); Encontrado 433,4 (M + H) ;NBI123783

Éster 4-metílico do éster 1-((2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila) 2-4 do ácido (S)-2-amino-succínico. EM calculado: (449); Encontrado 449,3 (M + H); NBI123672

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-5 do ácido 2-amino-2-metil-propiónico. EM calculado: (405); Encontrado 405,3 (M + H); NBI123669

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-6 do ácido (R)-2-amino-propiónico. EM calculado: (391); Encontrado 391,3 (M + H); NBI123674

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-7 do ácido (S)-2-amino-propiónico. EM calculado: (391); Encontrado 391,3 (M + H) .NBI123670

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-8 do ácido (R)-2-amino-3-metil-butírico. EM calculado: (419); Encontrado 419,4 (M + H) NBI123673

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 2-9 do ácido aminoacético. EM calculado: (377); Encontrado 377,3 (M + H) NBI123671

### Exemplo 3

Éster etílico do éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila do ácido carbônico

Etapa 3A: Éster etílico do éter (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 3-1 do ácido carbônico

[00041] (2R,3R,11bR)-3-Isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol 1d.1 (100 mg, 0,31 mmol) foi dissolvido em 3 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anidro e DMAP (1,0 mg, 0,01 mmol) e piridina (51 µL, 0,63 mmol) foram adicionados seguido por adição gota-a-gota de cloroformato de etila (45 µL, 0,47

mmol). A reação foi deixada agitar durante a noite e diluída com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) e extraída de NH<sub>4</sub>Cl saturado (5 mL). A camada orgânica foi seca sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrada. O produto bruto foi purificado através de cromatografia de coluna flash (1:9, acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para fornecer 88 mg (2,25 mmol) de 3-1 como uma espuma amarela pálida com 72% de rendimento. EM calculado: (392); Encontrado 392,3 (M + H). NBI98853

[00042] Também foram preparados pelo procedimento acima:

Éster metílico do éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 3-2 do ácido carbônico com 37% de rendimento. EM calculado: (378); Encontrado 378,1 (M + H) NBI120435

Éster butílico do éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ila 3-3 do ácido carbônico com 46% de rendimento. EM calculado: (420); Encontrado 420,1 (M + H) NBI120756

#### Exemplo 4

Método para Determinar a Estabilidade dos Compostos em Hepatócitos Humanos

[00043] Hepatócitos humanos criopreservados de 12 indivíduos doadores foram descongelados de acordo com as instruções do fabricante e agrupados. A viabilidade da célula foi determinada como sendo superior a 85%. TBZ (1 µM) foi incubado com hepatócitos humanos individuais (1×10<sup>6</sup> células/mL) a 37°C com O<sub>2</sub> a 95% e CO<sub>2</sub> a 5% por 9, 5, 15, 30 e 60 minutos. TBZ em DMSO foi adicionado para obter 1,0 µM (DMSO foi então inferior a 0,5 % volume/volume). Todas concentrações e teor de célula eram em relação ao volume de incubação final de 100 µL. A incubação foi terminada por mistura de 100 µL de acetonitrila resfriada em gelo em ácido fórmico a 1% contendo dextrometorfano (1,0 µM) como padrão interno para análise de LC/EM. As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação (1.500-2.500 × g por 30 minutos a 15 °C).

[00044] Em resumo, as amostras foram separadas com um método de HPLC de gradiente por sistemas Acquity UPLC consistindo em uma bomba, um aquecedor de coluna (40°C) e uma bandeja de degasseificador a vácuo/fase móvel. A fase móvel A era água em ácido fórmico a 0,1% e a fase móvel B era acetonitrila em ácido fórmico a 0,1%. A eluição do gradiente foi como se segue: fase móvel B: 0-10% em 0-0,75 minuto, 40-90% em 1,25-1,5 minuto, 90-0% em 1,75-2,0 minutos e o tempo de operação foi de 3 minutos. A coluna de fase inversa era uma coluna BEH C18 (50×2,1 mm, 1,7 µm). A taxa de circulação foi de 0,8 mL/minuto e o volume de injeção foi de 7,5 µL. As amostras foram monitoradas com espectrômetro de massa API-3000 e fonte de íon ESI no modo positivo, TBZ m/z 318,4 > 220,4, HTBZ m/z 320,3 > 302,3 e dextrometorfano m/z 272,2 > 147,2.

[00045] As figuras 1a, 1b, e 1c mostram a conversão de tetrabenazina, composto 2-1 e composto 3-1 em hepatócitos humanos para HTBZ no caso da tetrabenazina e a 1d.1 no caso dos compostos 2-1 e 3-1. A tetrabenazina e o composto 3-1 mostraram esta conversão como sendo rápida enquanto a do composto 2-1 foi comparativamente lenta.

#### Exemplo 5

Método para Determinar a Estabilidade dos Compostos nos Microsossomos do Fígado de Mamíferos

[00046] Em resumo, os microsossomos do fígado de seres humanos agrupados (0,1 ou 0,5 mg/mL; n>10; gênero misto) foram incubados a 37°C com o composto de teste na presença de um sistema de geração de NADPH contendo **50 mM, pH 7,4** de tampão fosfato de potássio, 3 mM de cloreto de magnésio, 1 mM de EDTA, 1 mM de NADP, 5 mM de G-6-P, e 1 unidade/mL de G-6-PD.

[00047] As incubações foram conduzidas em seis placas de 96 poços fundos modificadas de 2,0-mL em 1 µM de cada composto (0,01% DMSO) com um volume total de 250 µl. Cada placa, representando um ponto de tempo simples,

continha 96 Microtubos Titertube® permitindo duplicatas dos 48 compostos em cada ponto de tempo (0, 5, 10, 20, 40 e 60 minutos). A reação foi parada por adição de um reagente de parada apropriado (0,3 mL de acetonitrila contendo um padrão interno de propriedade). As proteínas precipitadas foram removidas por centrifugação por 15 minutos em 3.000 rpm e o fluido sobrenadante (~0, mL) foi analisado por LC/EM quanto a porcentagem do composto de origem remanescente.

[00048] As amostras foram separadas com um método de HPLC de gradiente por sistemas Acquity LC consistindo em uma bomba, um aquecedor de coluna (40°C) e uma bandeja de degasseificador a vácuo/fase móvel. A fase móvel A era água em ácido fórmico a 0,1% e a fase móvel B era acetonitrila em ácido fórmico a 0,1%. A eluição do gradiente foi como se segue: fase móvel B: 0-30% em 0-0,30 minuto, 30-98% em 0,7-1,1 minuto, 98% a 1,50-1,51 minuto, e o tempo de operação foi de 3 minutos para 3-1; fase móvel B: 5-98 % a 0,5-2,5 minuto, 98-5 % a 4,0-4,1 minuto e o tempo de operação foi de 6 minutos e meio para 2-1. A coluna de fase inversa era uma coluna Luna C18 (20×2 mm, 5 µm) para 3-1 e uma coluna Synergi C18 (150×2 mm, 5 µm) para 2-1. A taxa de circulação foi de 0,55 mL/minuto para 3-1 e 0,4 mL/minuto para 2-1 e o volume de injeção foi de 20 µL. As amostras foram monitoradas com espectrômetro de massa API-3000 e fonte de íon ESI no modo positivo, TBZ m/z 318,4 > 220,4, HTBZ m/z 320,3 > 302,3 e dextrometorfano m/z 272,2 > 147,2.

[00049] As figuras 2a a 2f mostram a conversão de composto 2-1 e composto 3-1 nos microssomas do fígado de ratos, cães e seres humanos em 1d.1. Em cada uma das espécies, a conversão do composto 2-1 em 1d.1 foi mais lenta que a conversão vista no caso do composto 3-1 ao composto 1d.1.

#### Exemplo 6

##### Avaliação Farmacocinética (PK)

##### Método em Animais:

## 1. Rato

[00050] Em resumo, uma dose simples oral (10 mg/kg) de 2-1 e 3-1 em PEG a 10% em metilcelulose a 0,25% em água milli Q foi administrada aos ratos (3 ratos/dose) para uma avaliação farmacocinética. Amostragem em série foi usada para coletar amostras de sangue, que foram tomadas de cada animal tratado em nove pontos de tempo, variando da pré-dose até 24 horas após a dose (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas) para administração oral. As amostras de sangue foram armazenadas a -80 °C ou abaixo até análise.

## 2. Cão

[00051] Em resumo, uma dose simples oral (6,1 mg/kg para 3-1 e 10 mg/kg para 2-1) em PEG a 10% em metilcelulose em água milli Q foi administrada aos cães (3 cães/dose) para uma avaliação farmacocinética. Amostragem em série foi usada para coletar amostras de sangue que foram tomadas de cada animal tratado em nove pontos de tempo variando da pré-dose até 24 horas após a dose (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 e 48 horas) para administração oral. As amostras de plasma foram armazenadas a -80°C ou abaixo até análise.

### Método Bioanalítico Geral:

[00052] Amostras de sangue foram descongeladas sobre gelo e 50 µL de plasma foram transferidos para uma placa de 96 poços. As proteínas do plasma foram precipitadas por adição de 150 µL de acetonitrila pré-resfriada (ACN) contendo 75 ng/mL de padrão interno. 50 µL adicionais de ACN/água (60:40) foram acrescentados em cada amostra. Amostras de curva de calibração foram preparadas por uma diluição em série em ACN/água (60:40). Cinquenta µL de cada amostra padrão foram transferidos para uma placa de 96 poços seguido por adição de 150 µL de acetonitrila (ACN) contendo 75 ng/mL de padrão interno e 50 µL de plasma de rato inativo. As placas foram tampadas, misturadas e centrifugadas a 3.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e injetado em um sistema LC-EM/EM para quantificação. O



método de ensaio não validado mostrou boa linearidade, especificidade e exatidão para 3-1, 2-1 e 1d.1 em uma faixa de concentração de 1 a 1.000 ng/mL e o limite baixo de quantificação de 3-1, 2-1 e 1d.1 estavam todas em 1 ng/mL. Três conjuntos de amostras de QC (4, 40, 400, 800 ng/ml) para 3-1, 2-1 e 1d.1 foram usadas como controle de qualidade para os estudos necessários e preparadas da mesma forma que o padrão. A quantificação foi realizada por ajuste das razões de área máxima para uma curva de calibração linear pesada ( $1/x^2$ ).

Método Farmacocinético:

[00053] Farmacocinéticas descritivas foram derivadas e avaliadas com base nas concentrações plasmáticas de 3-1, 2-1 e 1d.1 de cada rato. Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados usando Análise Não Comportamental da concentração de plasma-perfil de tempo de 3-1, 2-1 e 1d.1 no programa de software de modelagem farmacocinética WinNonlin Versão Profissional 5.0.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

[00054] A figura 3a mostra que o perfil de tempo de concentração plasmática do rato do composto 1d.1 a partir de 3-1 e 1d.1 administrados oralmente não é distinguível. Nenhum 3-1 foi detectado no plasma do rato após administração oral de 3-1.

[00055] A figura 3b mostra o perfil de tempo de concentração plasmática do rato do composto 1d.1 e 2-1 após administração oral de 2-1.

[00056] A figura 3c mostra o perfil de tempo de concentração plasmática do cão do composto 1d.1 e 3-1 após administração oral de 3-1.

[00057] A figura 3d mostra o perfil de tempo de concentração plasmática do cão do composto 1d.1 e 2-1 após administração oral de 2-1.

[00058] Estas figuras mostram que a meia vida plasmática de 1d.1 quando da administração oral do composto 2-1 é 2-3 vezes maior em relação à administração oral do composto 3-1.

## EXEMPLO 7

Ensaio de Ligação de Isoforma 2 (VMAT2) da Monoamina Vesicular  
(adaptado de Teng, e outros, J. Neurochem. 71, 258-65, 1998)

### Procedimento A:

Preparação de vesículas de estrias de rato

[00059] Estrias de três ratos são agrupadas e homogeneizadas em 0,32 M de sacarose. O homogeneizado é então centrifugado a 2.000xg por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante resultante é centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4°C. A microesfera resultante contendo a fração sinaptossômica enriquecida (2 mL) é submetida ao choque osmótico por adição de 7 mL de H<sub>2</sub>O destilada e subseqüentemente a suspensão é homogeneizada. A osmolaridade é restaurada por adição de 0,9 mL de 0,25 M HEPES e 0,9 mL de tampão de sal dipotássio do ácido L-(+)-tartárico neutro (pH 7,5), seguido por 20 minutos de centrifugação (20.000xg a 4°C). O sobrenadante é então centrifugado por 60 minutos (55.000xg a 4°C) e o sobrenadante resultante é centrifugado por 45 minutos (100.000xg a 4°C). A microesfera resultante é ressuspensa em 25 mM HEPES, 100 mM de sal dipotássio do ácido L-(+)-tartárico, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de NaCl, 0,05 mM de EGTA, pH 7,5 para uma concentração de proteína de 1-2 mg/mL e armazenada a -80°C por até 3 semanas, sem perda apreciável da atividade de ligação. Imediatamente antes do uso, a microesfera final é ressuspensa no tampão de ligação (25 mM de HEPES, 100mM de sal dipotássio do ácido L-(+)-tartárico, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de NaCl, 0,05 mM de EGTA, 0,1 mM de EDTA, 1,7 mM de ácido ascórbico, pH 7,4).

Ligação de [<sup>3</sup>H]-diidrotetrabenazina (DHTBZ)

[00060] Alíquotas da suspensão de vesícula (0,16 mL, 15 µg de proteína/mL) são incubadas com compostos competidores (variando de 1E-6M a 1E-12M) e 2 nM de [<sup>3</sup>H]-diidrotetrabenazina (HTBZ; atividade específica: 20 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals, Inc) por 1 hora a temperatura ambiente em um

volume total de 0,5 mL. A reação é terminada por filtração rápida das amostras em filtros Whatman GF/F usando um colhedor de célula Brandel. Ligação não específica é determinada usando 20  $\mu$ M de tetrabenazina (TBZ). Os filtros são previamente encharcados por 2 horas com polietilenoimina resfriada em gelo (0,5%). Após os filtros serem lavados três vezes com tampão resfriado em gelo, eles são colocados nos frascos de cintilação com 10 mL de coquetel de cintilação. A radioatividade de ligação é determinada por espectroscopia de cintilação.

#### Procedimento B:

[00061] O procedimento foi adaptado daquele descrito anteriormente (Near, (1986), Mol. Pharmacol. 30:252-7). Homogeneizados do prosencéfalo de rato Sprague-Dawley foram preparados por homogeneização e lavagem por centrifugação conforme descrito anteriormente (Hoare e outros, (2003) Peptides 24:1881-97). Em um volume total de 0,2 mL em placas de 96 poços de ligação baixa (Corning #3605), doze concentrações de isômero HTBZ ou análogo competiram contra 6 nM  $^3$ H-diidrotetrabenezina (American Radiolabeled Chemicals, Kd 2,6 nM) no homogeneizado de prosencéfalo de rato (100  $\mu$ g de proteína de membrana por poço), em um tampão de ligação VMAT2 (salmoura tamponada de fosfato da Dulbecco, 1mM EDTA, pH 7,4). Seguindo-se a incubação a 25°C por duas horas, o radioligante de ligação foi coletado por filtração rápida sobre filtros de fibra de vidro GF/B usando um Colhedor Unifilter-96 (PerkinElmer). Placas de filtro foram pré-tratadas por 10 minutos com polietilenimina a 0,1% e seguindo-se a colheita lavadas com 800  $\mu$ l de tampão de ligação VMAT2. O radioligante de ligação foi quantificado por contagem em cintilação usando um Contador de Bancada NXT (PerkinElmer).

Tabela 1. Afinidade de VMAT2 a partir de estudos de ligação competitiva

Composto	pKi (n)	Ki (nM)
----------	---------	---------

2R, 3R, 11bR-HTBZ	8,7 ± 0,2 (6)	1,9
2S, 3R, 11bR –HTBZ	7,9 ± 0,1 (5)	13
2S, 3S, 11bS-HTBZ	6,7 ± 0,1 (3)	202
2R, 3S, 11bS-HTBZ	6,1 ± 0,1 (4)	714
Composto 3-1	7,9 ± 0,1 (2)	14
Composto 2-1	6,7 ± 0,2 (2)	187

[00062] Os dados são uma média ± SD para pelo menos dois experimentos independentes. Os valores de  $K_i$  foram determinados usando um valor de  $K_d$  de 1,2 nM para as membranas de estrias de rato (Roland e outros, 2000).

#### EXEMPLO 8

##### Ensaio de Ligação de Seletividade de Receptor

[00063] Os quatro estereoisômeros HTBZ e os compostos da presente invenção foram testados quanto a especificidade do receptor contra um painel de 80 receptores, canais de íon de transportadores (Perfil de alto rendimento, Cerep, S.A.). Subsequentemente, os compostos foram testados nos ensaios de ligação de competição selecionados em uma ampla variedade de concentrações para determinar sua afinidade com relação aos receptores descritos a seguir.

##### (a) Receptor Dopamina D2S:

Referência: Grandy e outros, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9762-6

Fonte: Recombinante humano (células CHO)

Ligante: [3H]espiperona, 1,0 nM

Tempo de incubação/temperatura: 90 min / 25°C

Tampão de incubação: 50 mM de HEPES, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 3 mM de  $MgCl_2$ , pH 7,4

Ligante não específico: clozapina (10  $\mu$ M)

Kd: 27 pM

Bmax: 6,9 pmol/mg

Ligação específica: 600 cpm

Método de quantificação: Contagem em cintilação

(b) Receptor de Dopamina D4.4:

Referência: Van Tol e outros (1992) Nature, 358: 149-152.

Fonte: Recombinante humano (células CHO)

Ligante: [3H]espiperona, 0,3 nM

Tempo de incubação/temperatura: 60 min./22°C

Ligante não específico: (+)butaclamol (10  $\mu$ M)

Kd: 0,19 nM

Método de Quantificação: Contagem em cintilação

Tabela 2. Dados de ligação de seletividade do Receptor						
	2R, 3R, 11bR- HTBZ	2S, 3R, 11bR- HTBZ	2S, 3S, 11bS- HTBZ	2R, 3S, 11bS- HTBZ	3-1	2-1
D2S (h)	-6% de inibição a 10 $\mu$ M	17% de inibição a 30 $\mu$ M	192	57	15% de inibição a 10 $\mu$ M	2% de inibição a 10 $\mu$ M
D4.4 (h)	0% de inibição a 1 $\mu$ M	30% de inibição a 10 $\mu$ M	9% de inibição a 1 $\mu$ M	67	15% de inibição a 10 $\mu$ =M	13% de inibição a 10 $\mu$ M

Os valores mostrados são tanto  $K_i$  (nM) quanto % de inibição na concentração testada

[00064] 2*R*, 3*R*, 11*bR*-HTBZ e os dos análogos estruturais de 2*R*, 3*R*, 11*bR*-HTBZ, compostos 2-1 e 3-1, demonstraram seletividade para VMAT2. Em contraste, os estereoisômeros 2*S*, 3*S*, 11*bS* e 2*R*, 3*S*, 11*bS* HTBZ exibiram afinidade de ligação alta para D2(S). Os 2*S*, 3*R*, 11*bR* HTBZ mostraram alguma inibição menor nos receptores de dopamina testados. Esta atividade fora do alvo de determinados isômeros HTBZ pode contribuir para alguns dos efeitos colaterais observados com TBZ.

#### EXEMPLO 9

Reduções induzidas pelo inibidor VMAT2 na atividade locomotora

[00065] Ratos (Sprague-Dawley, 100-300 g) são adaptados a um alojamento individual por pelo menos 3 dias antes do teste. Os ratos recebem substâncias de teste por via oral, intraperitoneal, subcutânea ou intravenosa (entre 1-100 mg/kg) ou controles de veículo. Seguindo-se um tempo de pré-tratamento de 15-60 minutos, os ratos são colocados em uma gaiola limpa circundada por detectores de fotocélula (San Diego Instruments). A atividade locomotora do rato é detectada por rupturas nos feixes da fotocélula e a atividade é definida como o número de rupturas de feixe por seção. Os períodos de observação variaram de 15 minutos a 2 horas. Novos efeitos de composto são comparados aos efeitos do veículo e controle positivo (diazepam em 3 mg/kg) como ANOVA de uma via, seguido por análise *post hoc* de Neuman-Keul e de Student. Oito a dez ratos foram usados para condição de teste.

#### EXEMPLO 10

Ptose induzida por inibidor VMAT2

[00066] Ratos (Sprague-Dawley, 100-300 g) são adaptados a um alojamento individual por pelo menos 3 dias antes do teste. Os ratos recebem substâncias de teste por via oral, intraperitoneal, subcutânea ou intravenosa (entre 1-

100 mg/kg) ou controles de veículo. Seguindo-se um tempo de pré-tratamento de 15 minutos, os ratos são colocados em uma gaiola limpa para observação da ptose. A ptose é avaliada em uma escala de quatro pontos: olhos completamente abertos = 0, olhos  $\frac{1}{4}$  fechados = 1, olhos  $\frac{1}{2}$  fechados = 2, olhos  $\frac{3}{4}$  fechados = 3 e olhos completamente fechados = 4. As medições foram realizadas em intervalos de 15 minutos até 3 horas após administração dos compostos. Novos efeitos do composto são comparados com os efeitos do veículo com ANOVA uma via, seguido por análise *post hoc* de Neuman-Keul e de Student. Oito a dez ratos foram usados para condição de teste.

[00067] Será apreciado que, embora as concretizações específicas da invenção tenham sido descritas aqui para fins de ilustração, várias modificações podem ser feitas sem fugir do espírito e escopo da invenção. Conseqüentemente, a invenção não está limitada exceto pelas reivindicações apensas.

### REIVINDICAÇÕES

1. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de que o composto é éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetóxi-1,3,4,6,7,11b-hexaidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-il do ácido (S)-2-amino-3-metil-butírico ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um composto, como definido na reivindicação 1, e um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável.

3. Uso de uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que é na preparação de um medicamento para o tratamento de transtornos hipercinéticos.

4. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o transtorno hipercinético é doença de Huntington.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o transtorno hipercinético é discinésia tardia.



Figura 1a

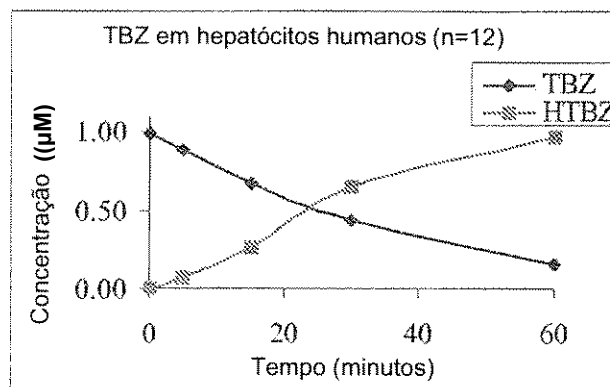


Figura 1b

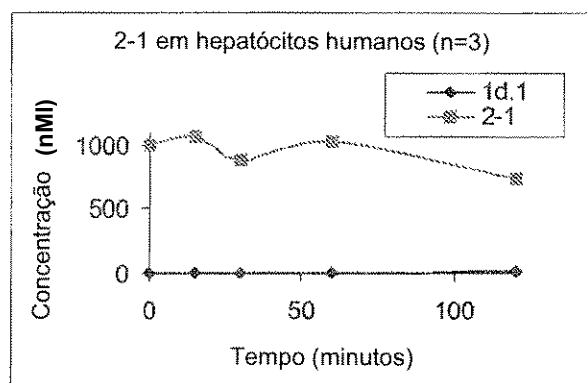


Figura 1c

