

(11) Número de Publicação: **PT 1855677 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 31/473 (2007.10) **A61P 25/18** (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2006.08.04**

(30) Prioridade(s): **2005.08.06 GB 0516167**
2005.08.16 GB 0516790

(43) Data de publicação do pedido: **2007.11.21**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.03**
008/2009

(73) Titular(es):

**CAMBRIDGE LABORATORIES (IRELAND)
LIMITED
ALEXANDER HOUSE THE SWEEPSTAKES
BALLSBRIDGE DUBLIN 4**

IE

(72) Inventor(es):

**ANDREW JOHN DUFFIELD
JEAN ELISABETH YARROW**

**GB
GB**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

PT

(54) Epígrafe: **3-11B-CIS-DI-HIDROTETRABENAZINA PARA O TRATAMENTO DA ESQUIZOFRENIA
E DE OUTRAS PSICOSES**

(57) Resumo:

RESUMO

**"3-11B-CIS-DI-HIDROTETRABENAZINA PARA O TRATAMENTO DA
ESQUIZOFRENIA E DE OUTRAS PSICOSES"**

A invenção fornece o uso de *3,11b-cis-di-hidrotetra-*benazina ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou tratamento da esquizofrenia e de outras psicoses.

DESCRIÇÃO

**"3-11B-CIS-DI-HIDROTETRABENAZINA PARA O TRATAMENTO DA
ESQUIZOFRENIA E DE OUTRAS PSICOSES"**

COMPOSTOS FARMACÊUTICOS

Esta invenção refere-se ao uso de uma dihidrotetrabenazina para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou tratamento de uma psicose.

Antecedentes da Invenção

Psicose é um termo psiquiátrico genérico para estados mentais em que os componentes do pensamento racional e da percepção estão gravemente prejudicados. As pessoas sujeitas a uma psicose podem sofrer alucinações, agarrar-se a crenças paranóicas ou delirantes, demonstrar alterações de personalidade e exibir desorganização na maneira de pensar. Isto é usualmente acompanhado por uma falta de percepção da natureza não usual ou bizarra do seu comportamento, de dificuldades na interacção social e dificuldade em levar a cabo as actividades da sua vida diária. Essencialmente, um episódio psicótico envolve a perda de contacto com a realidade.

A psicose é muitas vezes considerada como sendo

um sintoma de doença mental grave. Embora não esteja exclusivamente ligada a qualquer estado psicológico ou físico particular, está particularmente associada a esquizofrenia, perturbação bipolar (doença maníaco-depressiva) e grave depressão clínica. Há também várias circunstâncias físicas que podem induzir um estado psicótico, incluindo distúrbios electrolíticos, infecções do tracto urinário nos idosos, síndromes de dor, toxicidade medicamentosa e interrupção da toma de drogas (especialmente álcool, barbitúricos e, por vezes, benzodiazepinas), assim como infecções ou danos no cérebro (estas psicoses são agora mais comumente referidas como perturbações mentais orgânicas).

A psicose pode ser provocada por ou seguir-se a danos cerebrais e pode ocorrer depois do uso de drogas, particularmente depois de uma dose excessiva de droga, por utilização crónica e durante a interrupção da toma de drogas.

Também se sabe que o stress psicológico crónico provoca estados psicóticos, embora não se saiba exactamente qual o mecanismo exacto por que estes ocorrem. A psicose de curta duração despoletada pelo stress é conhecida como psicose reactiva breve.

Os episódios psicóticos podem ser significativamente coloridos pelo humor. Por exemplo, as pessoas sujeitas a um episódio psicótico no contexto de depressão

podem sofrer alucinações ou delírios de perseguição ou de auto-culpabilização, ao passo que as pessoas sujeitas a um episódio psicótico no contexto de mania podem dar forma a delírios de grandeza ou passar por uma experiência de significado profundamente religioso.

As alucinações são definidas como percepção sensorial na ausência de estímulos externos. As alucinações psicóticas podem ocorrer em qualquer dos cinco sentidos e assumir quase qualquer forma, podendo ir de simples sensações (tais como luzes, cores, sabores, odores) até experiências mais significativas tais como ver e interagir com pessoas e animais completamente formados, ouvir vozes e ter sensações tátteis complexas.

As alucinações auditivas, particularmente a experiência de ouvir vozes, são uma característica comum e muitas vezes predominante da psicose. As vozes alucinadas podem falar da pessoa, ou com ela, e podem incluir vários oradores com personalidades distintas. As alucinações auditivas tendem a ser particularmente perturbadoras quando são derrogatórias, dominadoras ou preocupantes.

A psicose pode envolver crenças delirantes ou paranóicas. Os delírios psicóticos podem ser classificados como de tipo primário e secundário. Os delírios primários são definidos por surgirem do nada e por não serem compreensíveis, em termos de processos mentais normais, enquanto que os delírios secundários podem ser entendidos

como sendo influenciados pelo passado da pessoa ou pela sua actual situação.

A perturbação de raciocínio descreve um distúrbio subjacente ao raciocínio consciente e, em grande parte, é classificado pelos seus efeitos na fala e na escrita. As pessoas afectadas podem exibir um discurso à pressão (falar incessantemente e depressa), descarrilamento ou colisão de ideias (mudar de tópico a meio de uma frase ou inapropriadamente), bloqueio do raciocínio e fazer rimas ou trocadilhos.

Uma característica importante e pouco compreendida da psicose é usualmente uma concomitante ausência de percepção da natureza não usual, estranha ou bizarra da experiência ou comportamento da pessoa. Até no caso de uma psicose aguda, os pacientes podem parecer não ter qualquer consciência de que as suas vívidas alucinações e delírios impossíveis são, de qualquer maneira, irrealistas. Contudo, a percepção pode variar entre indivíduos e durante toda a duração do episódio psicótico. Em certos casos, particularmente com alucinações auditivas e visuais, o paciente tem uma boa percepção e isto faz com que a experiência psicótica seja ainda mais aterradora pelo facto de o paciente se aperceber de que não deveria estar a ouvir vozes mas que as ouve.

Há um número de causas possíveis para uma psicose. A psicose pode ser o resultado de uma doença

mental subjacente tal como a perturbação bipolar (também conhecida como doença maníaco-depressiva) e a esquizofrenia. A psicose também pode ser despoletada ou exacerbada por stress mental grave e por doses elevadas ou uso crónico de drogas tais como anfetaminas, LSD, PCP, cocaína ou escopolamina. A interrupção repentina de drogas depressoras do SNC, tais como álcool e benzodiazepinas, também pode despoletar episódios psicóticos. Tal como pode ser visto a partir de uma vasta variedade de doenças e condições em que se referiu a ocorrência de psicose (incluindo, por exemplo, SIDA, lepra, malária e até papeira) não existe uma causa singular para um episódio psicótico.

Esquizofrenia é o nome atribuído a um grupo de perturbações psicóticas usualmente caracterizadas por afastamento da realidade, padrões de raciocínio ilógico, delírios e alucinações, e, em vários graus, acompanhadas por outros distúrbios emocionais, comportamentais ou intelectuais. A esquizofrenia está associada a desequilíbrios da dopamina no cérebro e a defeitos do lobo frontal e é provocada por factores genéticos e outros factores biológicos e por factores psico-sociais.

Os medicamentos tradicionalmente usados para tratar psicoses como as que estão associadas à esquizofrenia (os denominados anti-psicóticos "típicos") controlam eficazmente as alucinações, delírios e confusões associadas a estas condições. Esses medicamentos, entre os quais se incluem, como exemplo, o haloperidol, a clorpromazina e a

flufenazina, estão disponíveis desde meados dos anos 50. A acção destes medicamentos é, principalmente, bloquear os receptores da dopamina e são eficazes no tratamento dos sintomas "positivos" da psicose.

Como vias primárias para a dopamina estão envolvidas quatro áreas principais do cérebro. Incluem os sistemas nigroestriatal, mesocortical, mesolímbico e tubero-infundibular. Uma actividade diminuída da dopamina no tracto mesocortical (tal como é verificada no paciente esquizofrénico) faz com que as zonas pré-frontais do cérebro sejam incapazes de se activarem. Sintomas positivos, tais como alucinações e delírios, podem ocorrer quando se dá uma sobreactividade da dopamina no tracto mesolímbico. Há cinco subcategorias de receptores da dopamina no cérebro. O maior impacto dos anti-psicóticos convencionais ocorre no receptor D2. Os denominados agentes anti-psicóticos "atípicos" (ver a seguir) têm, tipicamente, um efeito mais fraco sobre os receptores D2 com um bloqueio mais potente no receptor D4 que se encontra, na sua maior parte, no córtex frontal e no hipocampo.

Os anti-psicóticos convencionais ("típicos") bloqueiam os receptores D2, não selectivamente, em todas as quatro áreas do cérebro. O efeito resultante no tracto mesolímbico reduz as alucinações e os delírios. Contudo, uma redução simultânea da dopamina na via nigroestriatal pode produzir sintomas extra-piramidais. O bloqueio da dopamina também pode piorar os sintomas negativos e o

funcionamento cognitivo ao diminuir ainda mais a quantidade de dopamina no córtex frontal. O tracto tubero-infundibular é afectado por todos os anti-psicóticos convencionais que podem provocar disfunção neuro-endócrina e hipotalâmica. O bloqueio da dopamina no tracto tubero-infundibular é responsável pelos aumentos dos níveis de prolactina.

Assim, o uso de anti-psicóticos "típicos" está associado a um número de efeitos secundários indesejáveis.

O alvo dos anti-psicóticos atípicos é a zona límbica, mais especificamente quando bloqueiam os receptores D2 da dopamina. Consequentemente, têm menos impacto sobre as vias nigroestriatal e mesocortical, resultando num reduzido potencial para efeitos adversos. Como fizemos notar, também tendem a ter maior afinidade com os receptores D4 da dopamina.

Os perfis de ligação ao receptor dos medicamentos anti-psicóticos atípicos estão analisados no artigo de A.E. Hensiek & M.R. Trimble, *J. Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, (2002), 72:281-285.

Os anti-psicóticos "atípicos" mais novos - muitas vezes referidos como antagonistas da serotonina-dopamina (SDAs) - bloqueiam tanto os receptores da serotonina como os da dopamina, tratando por isso tanto os sintomas "positivos" como os "negativos" da esquizofrenia - ver H. Y. Meltzer, *J. Clin. Psychopharmacol.* (1995), Feb;15(1

Suppl 1):2S-3S e M. Huttunen, *J. Clin. Psychopharmacol.* (1995), Feb;15(1 Suppl 1):4S-10S. Estas medicações mais novas são eficazes a tratar uma gama mais vasta de sintomas de psicose e esquizofrenia e têm menos efeitos secundários do que os anti-psicóticos tradicionais. Por exemplo, são menos propensos do que os anti-psicóticos típicos a provocar efeitos secundários extra-piramidais e a subida de prolactina.

Exemplos destes anti-psicóticos atípicos mais novos (os "antagonistas da serotonina-dopamina" incluem clopazina, risperidona, asenapina, olanzapina e iloperidona).

A tetrabenazina (nome químico: 1,3,4,6,7,11b-hexahidro-9,10-dimetoxi-3-(2-metilpropil)-2H-benzo(a)quinolinizin-2-ona) tem sido usada como um medicamento farmacêutico desde fins dos anos 50. Inicialmente desenvolvido como um anti-psicótico, a tetrabenazina é actualmente usada no tratamento sintomático dos distúrbios de movimento hiperkinético tais como a doença de Huntington, hemibalismo, coreia senil, tiques, disquinésia tardia e síndrome de Tourette; ver, por exemplo, Jankovic et al., *Am. J. Psychiatry.* (1999) Ago: 156(8):1279-81 e Jankovic et al., *Neurology* (1997) Feb; 48(2):358-62.

A estrutura química da tetrabenazina é como está indicada na Figura 1 que se segue.

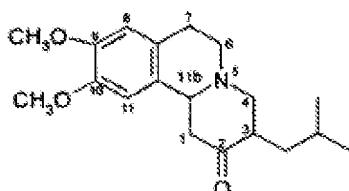


Figura 1 - Estrutura da tetrabenazina

O composto tem centros quirais nos átomos de carbono 3 e 11b e, por isso, em teoria, pode existir num total de quatro formas isoméricas, tal como está indicado na Figura 2.

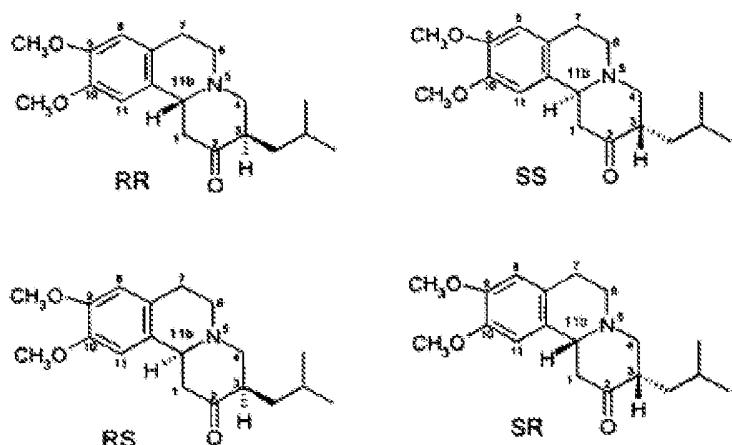


Figura 2 - Isómeros de tetrabenazina possíveis

Na Figura 2, a estereoquímica de cada isómero é definida usando a nomenclatura de "R" e "S" desenvolvida por Cahn, Ingold e Prelog, ver *Advanced Organic Chemistry* por Jerry March, 4^a Edição, John Wiley & Sons, Nova York, 1992, páginas 109-114. Na Figura 2 e outros sitios deste pedido de patente as designações "R" ou "S" estão indicadas na ordem dos números de posição dos átomos de carbono. Assim, por exemplo, RS é uma anotação abreviada de 3R,11bS.

Similarmente, quando estão presentes três centros quirais, tal como nas di-hidrotetrabenazinas a seguir descritas, as designações "R" ou "S" estão indicadas na ordem dos átomos de carbono 2, 3 e 11b. Assim, o isómero 2S,3R,11bR é referido em forma abreviada como SRR, etc.

A tetrabenazina disponível no comércio é uma mistura racémica dos isómeros RR e SS e, segundo parece, os isómeros RR e SS (que a seguir são individual ou colectivamente referidos como *trans*-tetrabenazina porque os átomos de hidrogénio nas posições 3 e 11b têm uma orientação relativa de *trans*) são os isómeros termodinamicamente mais estáveis.

A tetrabenazina tem, de certo modo, uma fraca e variável biodisponibilidade. É extensivamente metabolizada pelo metabolismo na primeira passagem e, tipicamente, pouca ou nenhuma tetrabenazina inalterada é detectada na urina. O principal metabólito é a di-hidrotetrabenazina (nome químico: 2-hidroxi-3-(2-metilpropil)-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-9,10-dimetoxi-benzo(a)quinolizina) que é formada pela redução do grupo 2-ceto na tetrabenazina e crê-se que seja o principal responsável pela actividade do medicamento (ver Mehvar et al., *Drug Metab. Disp.* 15, 250-255 (1987) e *J. Pharm. Sci.*, 76, No. 6, 461-465 (1987)).

Foram anteriormente identificados e caracterizados quatro isómeros de di-hidrotetrabenazina que são derivados dos isómeros mais estáveis RR e SS da

tetrabenazina progenitora e têm uma orientação relativa de *trans* entre os átomos de hidrogénio e as posições 3 e 11b) (ver Kilbourn et al., *Chirality*, 9:59-62 (1977) e Brossi et al., *Helv. Chim. Acta.*, vol. XLI, No. 193, pp. 1793-1806 (1958). Os quatro isómeros são (+)- α -di-hidrotetrabenazina, (-)- α -di-hidrotetrabenazina, (+)- β -di-hidrotetrabenazina, (-)- β -di-hidrotetrabenazina. As estruturas dos quatro isómeros conhecidos de *trans*-di-hidrotetrabenazina são consideradas como sendo as que estão apresentadas na Figura 3.

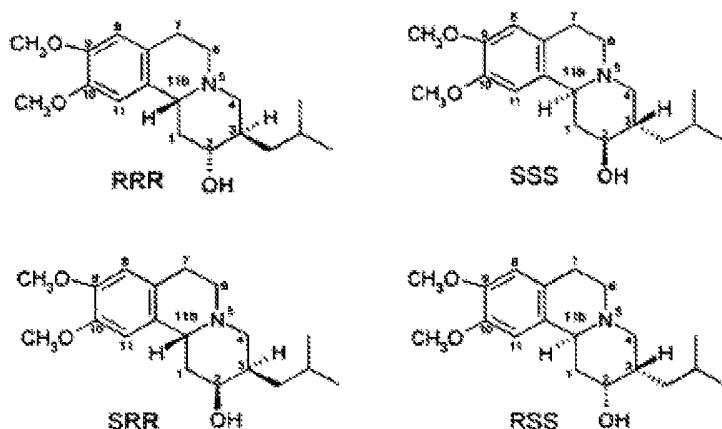


Figura 3 - Estruturas dos isómeros conhecidos de tetrabenazina

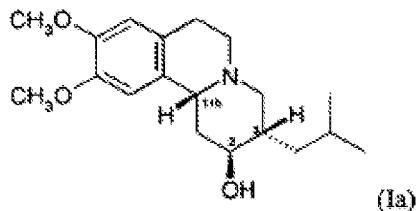
Kilbourn et al., (ver *Eur. J. Pharmacol.* 278:249-252 (1995) e *Med. Chem. Res.*, 5:113-126 (1994)) investigaram a ligação específica dos isómeros individuais de dihidrotetrabenazina rádio-rotulada no cérebro consciente do rato. Descobriram que o isómero de (+)- α -[¹¹C]di-hidrotetrabenazina (2R,3R,11bR) acumulado nas regiões do cérebro se associava a concentrações mais elevadas da membrana neuronal do transportador de dopamina (DAT) e do transportador vesicular de monoamina (VMAT2). Contudo, o isómero

essencialmente inativo de $(-)\alpha-[^{11}\text{C}]\text{di-hidrotetrabenazina}$ estava quase uniformemente distribuído no cérebro, sugerindo que a ligação específica a DAT e a VMAT2 não estava a ocorrer. Os estudos *in vivo* corresponderam aos estudos *in vitro* que demonstraram que o isómero de $(+)\alpha-[^{11}\text{C}]\text{di-hidrotetrabenazina}$ exibia um K_i de $[^3\text{H}]\text{metoxitetrabenazina} >2000$ vezes superior ao K_i do isómero de $(-) \alpha-[^{11}\text{C}]\text{di-hidrotetrabenazina}$.

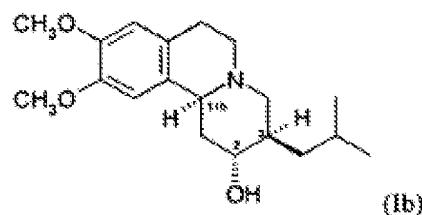
O nosso pedido de patente Internacional anterior No. PCT/GB2005/000464 divulga a preparação e o uso de isómeros farmacêuticos de di-hidrotetrabenazina derivados dos instáveis isómeros *RS* e *SR* (doravante referidos, individual ou colectivamente, como *cis*-tetrabenazina porque os átomos de hidrogénio nas posições 3 e 11b têm uma orientação relativa de *cis*) de tetrabenazina.

Há quatro isómeros possíveis de di-hidrotetra-benazina tendo a configuração 3,11b-*cis* e estes são o isómero 2*S*,3*S*,11b*R*, o isómero 2*R*,3*R*,11b*S*, o isómero 2*R*,3*S*,11b*R* e o isómero 2*S*,3*R*,11b*S*, que são os seguintes:

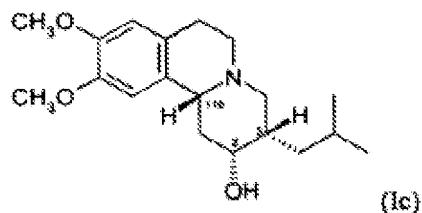
(a) o isómero 2*S*,3*S*,11b*R* de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina tendo a fórmula (Ia):



(b) o isómero $2R,3R,11bS$ de $3,11b$ -*cis*-di-hidrotetabenazina tendo a fórmula (Ib) :

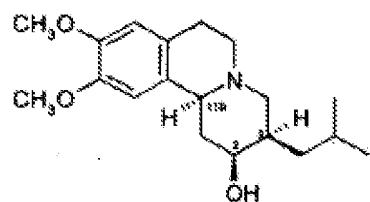


(c) o isómero $2R,3S,11bR$ de $3,11b$ -*cis*-di-hidrotetabenazina tendo a fórmula (Ic) :



e

(d) o isómero $2S,3R,11bS$ de $3,11b$ -*cis*-di-hidrotetabenazina tendo a fórmula (Id) :

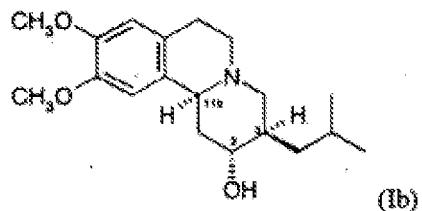


Sumário da Invenção

Descobriu-se agora que o isómero $2R,3R,11bS$ de $3,11b$ -*cis*-di-hidrotetabenazina da fórmula (Ib) descrita no

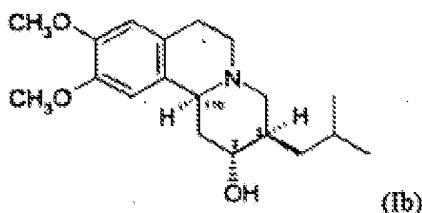
nosso pedido anterior No. PCT/GB2005/000464 demonstra perfis de ligação ao receptor que são largamente similares aos perfis de ligação ao receptor dos agentes antipsicóticos atípicos. Em particular, o isómero 2*R*,3*R*,11*b**S* tanto exibe acções inibidoras dopaminérgicas como serotoninérgicas. O perfil de ligação ao receptor indica que o isómero 2*R*,3*R*,11*b**S* terá utilidade na profilaxia ou tratamento da psicose, por exemplo, da psicose resultante de ou associada a esquizofrenia.

Em conformidade, num primeiro aspecto, a invenção fornece uma 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina da fórmula (Ib) :



ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma para uso na profilaxia ou tratamento da psicose.

Noutro aspecto, a invenção fornece uma 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina da fórmula (Ib) :



ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma para uso na profilaxia ou tratamento da esquizofrenia.

O composto de fórmula (Ib), o isómero 2*R*,3*R*,11*bS* de 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina, também é aqui referido como Isómero A.

A invenção também fornece:

- O uso do Isómero A de 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina para o fabrico de um medicamento para (i) a profilaxia ou tratamento da psicose; ou (ii) a profilaxia ou tratamento da esquizofrenia.
- O uso do Isómero A de 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina para o fabrico de um medicamento para prevenir ou aliviar um episódio psicótico.
- Uma utilização ou composto para uso como atrás definido onde a psicose ou episódio psicótico resulta de ou está associada a esquizofrenia.
- O uso do Isómero A de 3,11*b*-*cis*-di-hidrotetrabenazina para o fabrico de um medicamento para prevenir, aliviar ou reduzir um ou mais sintomas da esquizofrenia.

Os episódios psicóticos, psicoses ou sintomas prevenidos, aliviados ou reduzidos de acordo com a invenção

podem ser qualquer um dos sintomas, ou mais, seleccionados a partir de:

- delírios;
- alucinações;
- alucinações visuais;
- alucinações auditivas;
- alucinações envolvendo sensações tácteis, sabores ou odores;
- confusão;
- distúrbios emocionais, comportamentais ou intelectuais;
- perda de contacto com a realidade;
- padrões de raciocínio ilógico e/ou desorganizado;
- crenças paranóicas ou delirantes;
- paranóia
- delírios de grandeza;

- delírios persecutórios ou de auto-culpabilização;
- e
- alterações da personalidade.

Os episódios psicóticos, psicoses ou sintomas prevenidos, aliviados ou reduzidos de acordo com a invenção podem ser qualquer um dos seleccionados ou mais, resultantes de ou associados a:

- psicose provocada por ou associada a esquizofrenia;
- psicose provocada por ou associada a perturbação bipolar (doença maníaco-depressiva);
- psicose provocada por ou associada a depressão clínica grave;
- psicose induzida por perturbações e condições tais como:
 - distúrbios electrolíticos;
 - infecções do tracto urinário nos idosos;
 - síndromes de dor;
 - toxicidade medicamentosa;

- interrupção da toma de drogas; e
- infecções ou danos no cérebro;
- psicose provocada por stress psicológico crónico (psicose reactiva breve);
- psicose despoletada ou exacerbada por stress mental grave; e
- psicose despoletada por, ou resultante de, ou no seguimento de doença e de condições tais como SIDA, lepra, malária e papeira.

Num modelo de realização, os sintomas ou psicoses resultam de ou estão associados a esquizofrenia e podem ser qualquer um dos sintomas, ou mais, seleccionados a partir de:

- delírios;
- alucinações;
- confusão;
- distúrbios emocionais, comportamentais ou intelectuais;

- perda de contacto com a realidade; e
- padrões de raciocínio ilógico.

O Isómero A de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina utilizado na invenção pode estar em forma substancialmente pura, por exemplo a uma pureza isomérica superior a 90%, tipicamente superior a 95% e, mais preferivelmente, superior a 98%.

O termo "pureza isomérica" no presente contexto refere-se à quantidade de Isómero A de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina presente, relativamente à quantidade total ou concentração de di-hidrotetrabenazina de todas as formas isoméricas. Por exemplo, se 90% do total de di-hidrotetrabenazina presente na composição for Isómero A de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina, então a pureza isomérica é de 90%.

O Isómero A de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina usado na invenção pode estar na forma de uma composição que esteja substancialmente isenta de 3,11b-*trans*-di-hidrotetrabenazina, preferivelmente contendo menos de 5% de 3,11b-*trans*-di-hidrotetrabenazina e, o mais preferivelmente, menos de 3% de 3,11b-*trans*-di-hidrotetrabenazina e, o mais preferivelmente, menos de 1% de 3,11b-*trans*-di-hidrotetrabenazina.

O Isómero A pode ser caracterizado pelas suas propriedades espectroscópicas, ópticas e cromatográficas,

tal como descritas nos Exemplos que se seguem, e também pelas suas configurações estereoquímicas absolutas tal como determinadas por cristalografia aos raios X.

O Isómero A pode ser apresentado numa forma substancialmente enantiomericamente pura ou como uma mistura com outros enantiómeros de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina tais como aqui descritos.

Os termos "pureza enantiomérica" e "enantiometricamente puro" referem-se, no presente contexto, à quantidade de Isómero A de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina presente em relação à quantidade total ou concentração de di-hidrotetrabenazina de todas as formas enantioméricas e isoméricas. Por exemplo, se 90% da di-hidrotetrabenazina total presente na composição estiver na forma de um simples enantiómero, então, a pureza enantiomérica é de 90%.

A título de exemplo, em cada aspecto e modelo de realização da invenção, o Isómero A pode estar presente numa pureza enantiomérica de pelo menos 55% (por exemplo, pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99,5% ou 100%).

O Isómero A também pode ser apresentado na forma de misturas com um ou mais dos Isómeros B, C e D. Essas misturas podem ser misturas racémicas ou misturas não racémicas. Exemplos de misturas racémicas incluem a mistura racémica de Isómero A e Isómero B.

Sais Farmaceuticamente Aceitáveis

A menos que o contexto exija outra coisa, uma referência neste pedido ao Isómero A inclui, no seu âmbito, não só a base livre da di-hidrotetrabenazina mas também os seus sais e, em particular, os sais de adição de ácido.

Ácidos particulares a partir dos quais se formam sais de adição de ácido incluem ácidos tendo um valor de pKa inferior a 3,5 e, mais usualmente, menos de 3. Por exemplo, os sais de adição de ácido podem ser formados a partir de um ácido com um pKa na gama de +3,5 até -3,5.

Os sais de adição de ácido preferidos incluem os que são formados com ácidos sulfónicos tais como ácido metano-sulfónico, ácido etano-sulfónico, ácido benzeno-sulfónico, ácido tolueno-sulfónico, ácido canfor-sulfónico e ácido naftaleno-sulfónico.

Um ácido particular a partir do qual podem ser formados sais de adição de ácido é o ácido metano-sulfónico.

Os sais de adição de ácido podem ser preparados por métodos aqui descritos ou por métodos químicos convencionais tais como os métodos descritos em *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN:3-90639-026-8, capa dura, 388 páginas, Agosto de 2002. Geralmente, esses sais podem ser preparados fazendo reagir

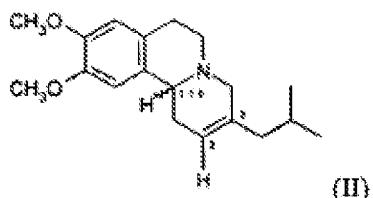
a forma de base livre do composto com a base ou ácido apropriados, em água ou num solvente orgânico, ou numa mistura de ambos; geralmente são usados meios não aquosos tais como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol ou acetonitrilo.

Os sais são, tipicamente, sais farmaceuticamente aceitáveis. Contudo, os sais que não são farmaceuticamente aceitáveis também podem ser preparados como formas intermediárias que podem então ser convertidas em sais farmaceuticamente aceitáveis. Essas formas de sal não-farmaceuticamente aceitáveis também fazem parte da invenção.

Métodos para a Preparação de Isómeros de
Di-hidrotetrabenazina

Neste capítulo estão descritos os métodos para preparar todos os quatro isómeros de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina embora a invenção se refira apenas aos usos terapêuticos do composto de fórmula (Ib) (Isómero A).

As di-hidrotetrabenazinas podem ser preparadas por um processo que comprehende a reacção de um composto da fórmula (II):



com um reagente ou reagentes adequados à hidratação da ligação dupla 2,3 no composto de fórmula (II) e, seguidamente, quando for necessário, separando e isolando uma pretendida forma de isómero de di-hidrotetrabenazina.

A hidratação da ligação dupla 2,3 pode ser efectuada por hidroboração usando um reagente de borano tal como diborano ou um borano-éter (por exemplo, borano-tetrahidrofurano (THF)) para produzir um aducto de alquil-borano intermediário seguido pela oxidação do aducto de alquil-borano e hidrólise na presença de uma base. A hidroboração é tipicamente efectuada num solvente polar não prótico seco, tal como um éter (por exemplo, THF), usualmente a uma temperatura não elevada, por exemplo, a temperatura ambiente. O aducto de borano-alceno é tipicamente oxidado com um agente de oxidação tal como peróxido de hidrogénio na presença de uma base fornecendo uma fonte de iões de hidróxido, tal como hidróxido de amónio ou um hidróxido de metal alcalino, por exemplo, hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio. A sequência hidroboração-oxidação-hidrólise das reacções do Processo A fornece, tipicamente, isómeros de di-hidrotetrabenazina em que os átomos de hidrogénio nas posições 2 e 3 têm uma orientação relativa de *trans*.

Compostos da fórmula (II) podem ser preparados por redução de tetrabenazina para produzirem uma di-hidrotetrabenazina seguida por desidratação da di-

hidrotetrabenazina. A redução da tetrabenazina pode ser conseguida usando um reagente de hidreto de alumínio tal como alumino-hidreto de lítio, ou um reagente de boro-hidreto tal como boro-hidreto de sódio, boro-hidreto de potássio ou um derivado de boro-hidreto, por exemplo, um boro-hidreto de alquilo tal como boro-hidreto de tri-sec-butil-lítio. Alternativamente, o passo de redução pode ser efectuado usando hidrogenação catalítica, por exemplo, sobre um catalizador de níquel Raney ou de óxido de platina. Condições adequadas para efectuar o passo de redução estão a seguir descritas em mais pormenor ou podem ser encontradas em US 2 843 591 (Hoffmann-La Roche) e Brossi et al., *Helv. Chim. Acta.*, vol. XLI, No. 193, pp. 1793-1806.

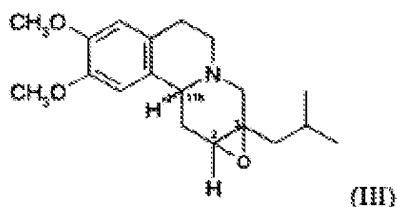
Como a tetrabenazina usada como material de partida para a reacção de redução é tipicamente uma mistura dos isómeros RR e SS (isto é, tetrabenazina *trans*), a di-hidrotetrabenazina formada pelo passo de redução terá a mesma configuração *trans* próximo das posições 3- e 11b e assumirá a forma de um ou mais dos isómeros conhecidos de di-hidrotetrabenazina, desidratando-os para formar o alceno (II) e, então, "re-hidratando" o alceno (II) usando condições que produzam os necessários novos isómeros de di-hidrotetrabenazina *cis* da invenção.

A desidratação da di-hidrotetrabenazina até ao alceno (II) pode ser efectuada usando uma variedade de condições standard para desidratar álcoois para formar

alcenos; ver, por exemplo, J. March (*idem*) páginas 389-390 e referências aí contidas. Exemplos dessas condições incluem o uso de agentes de desidratação à base de fósforo tais como haletos fosforosos ou oxi-haletos fosforosos, por exemplo, POCl_3 e PCl_5 . Como alternativa para dirigir a desidratação, o grupo hidroxilo da di-hidrotetrabenazina pode ser convertido até um grupo de partida L tal como halogéneo (por exemplo, cloro ou bromo) e, então, ser submetido a condições (por exemplo, a presença de uma base) para eliminar H-L. A conversão do grupo hidroxilo até um haleto pode ser conseguida usando métodos bem conhecidos do químico especializado, por exemplo, por reacção com tetracloreto de carbono ou tetrabrometo de carbono na presença de uma trialquil- ou triaril-fosfina tal como trifenil-fosfina ou tributil-fosfina.

A tetrabenazina usada como material de partida para a redução produzir a di-hidrotetrabenazina pode ser obtida no comércio ou pode ser sintetizada pelo método descrito em US 2 830 993 (Hoffmann-La Roche).

Outro processo (Processo B) para preparar uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina compreende submeter um composto da fórmula (III):



a condições para abertura do anel no grupo 2,3-epóxido no composto da fórmula (III) e, seguidamente, se necessário, separar e isolar uma pretendida forma de isómero de dihidrotetrabenazina.

A abertura do anel pode ser efectuada de acordo com métodos conhecidos para aberturas do anel de epóxido. Contudo, um método actualmente preferido para abrir o anel de epóxido é a abertura redutiva do anel que pode ser conseguida usando um agente de redução tal como borano-THF. A reacção com o borano-THF pode ser efectuada num solvente polar não prótico tal como éter (por exemplo, tetra-hidrofurano) usualmente a temperatura ambiente, sendo o complexo de borano assim formado subsequentemente hidrolisado por aquecimento na presença de água e de uma base à temperatura de refluxo do solvente. Tipicamente, o processo B dá origem a isómeros de di-hidrotetrabenazina em que os átomos de hidrogénio nas posições 2 e 3 têm uma orientação relativa de *cis*.

Os compostos de epóxido da fórmula (III) podem ser preparados por epoxidação de um alceno da fórmula (II) atrás referida. A reacção de epoxidação pode ser efectuada usando condições e reagentes bem conhecidos do químico especializado; ver, por exemplo, J. March (*idem*), páginas 826-829 e as referências aí contidas. Tipicamente, pode ser usado um perácido como o ácido *meta*-cloroperbenzóico (MCPBA), ou uma mistura de um perácido e de um outro agente

de oxidação, tal como ácido perclórico, para provocar a epoxidação.

Quando os materiais de partida para os processos A e B atrás referidos forem misturas de enantiómeros, então os produtos dos processos serão tipicamente pares de enantiómeros, por exemplo, misturas racémicas, possivelmente em conjunto com impurezas diastereo-isoméricas. Os diastereo-isómeros indesejados podem ser removidos por técnicas tais como cromatografia (por exemplo, HPLC) e os enantiómeros individuais podem ser separados por uma variedade de métodos conhecidos do químico especializado. Por exemplo, podem ser separados por meio de:

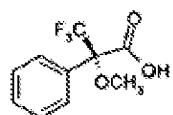
(i) cromatografia quiral (cromatografia sobre um suporte quiral); ou

(ii) formar um sal com um ácido quiral opticamente puro, separando os sais dos dois diastereo-isómeros por cristalização fraccional e libertando então a dihidrotetrabenazina do sal; ou

(iii) formar um derivado (tal como um éster) com um agente de derivação (por exemplo, agente de esterificação), separando os epímeros resultantes (por exemplo, por cromatografia) e, então, converter o derivado até à dihidrotetrabenazina.

Um método de separar pares de enantiómeros obti-

dos a partir de cada um dos Processos A e B, e que se descobriu ser particularmente eficaz, é esterificar o grupo hidroxilo da di-hidrotetrabenazina com uma forma opticamente activa de ácido de Mosher, tal como o isómero R(+) a seguir indicado, ou uma forma activa do mesmo:



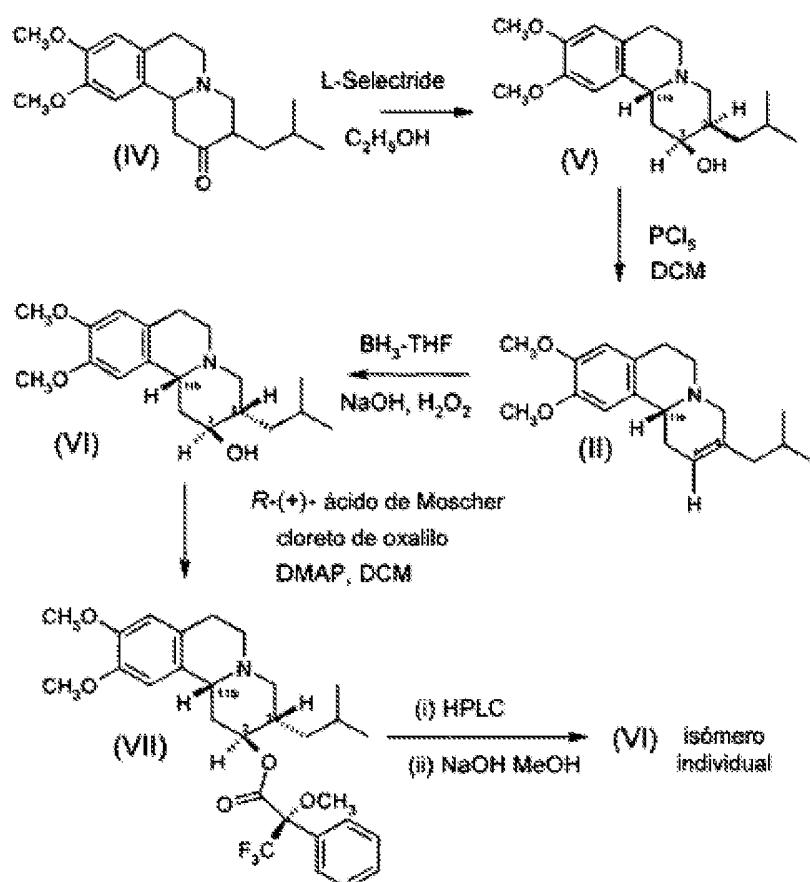
Os ésteres resultantes dos dois enantiómeros da di-hidrobenazina podem, então, ser separados por cromatografia (por exemplo, HPLC) e os ésteres separados ser hidrolisados para produzirem os isómeros individuais de di-hidrobenazina usando uma base tal como um hidróxido de metal alcalino (por exemplo, NaOH) num solvente polar tal como metanol.

Como alternativa a usar misturas de enantiómeros como materiais de partida nos processos A e B e efectuar então a separação dos enantiómeros subsequentemente, os processos A e B podem, cada, ser efectuados sobre materiais de partida de enantiómero simples, resultando em produtos em que predomina um enantiómero simples. Os enantiómeros simples do alceno (II) podem ser preparados sujeitando a tetrabenazina RR/SS a uma redução estereo-selectiva usando boro-hidreto de tri-sec-butil-lítio para produzir uma mistura de enantiómeros SRR e RSS de di-hidrotetrabenazina, separando os enantiómeros (por exemplo, por cristalização fraccionada) e desidratando então um enantiómero simples de

di-hidrotetrabenazina, separado, para produzir, predominantemente ou exclusivamente um enantiómero simples do composto de fórmula (II).

Os processos A e B estão a seguir ilustrados em mais pormenor nos Esquemas 1 e 2 respectivamente.

Esquema 1



O Esquema 1 ilustra a preparação de isómeros individuais de di-hidrotetrabenazina tendo as configurações $2S,3S,11bR$ e $2R,3R,11bS$ em que os átomos de hidrogénio

ligados às posições 2 e 3 estão dispostos numa orientação relativa de *trans*. Este esquema de reacção inclui o Processo A atrás definido.

O ponto de partida da sequência de reacções no Esquema 1 é a tetrabenazina (IV) disponível no comércio que é uma mistura racémica dos isómeros ópticos RR e SS de tetrabenazina. Em cada um dos isómeros RR e SS, os átomos de hidrogénio nas posições 3 e 11b estão dispostos numa orientação relativa de *trans*. Como alternativa ao uso do composto disponível no comércio, a tetrabenazina pode ser sintetizada de acordo com o processo descrito na patente US número 2 830 993 (ver, em particular, o exemplo 11).

A mistura racémica de tetrabenazina RR e SS é reduzida usando o agente de redução de boro-hidreto, boro-hidreto de tri-sec-butil-lítio ("L-Selectride"), para produzir uma mistura dos conhecidos isómeros (V) 2*S*,3*R*,11*bR* e 2*R*,3*S*,11*bS* de di-hidrotetrabenazina, dos quais, para simplificar, apenas se apresenta o isómero 2*S*,3*R*,11*bR*. Ao usar o L-Selectride mais esteticamente exigente como agente de redução de boro-hidreto em vez de boro-hidreto de sódio, a formação dos isómeros RRR e SSS de di-hidrotetrabenazina é minimizada ou suprimida.

Os isómeros (V) de di-hidrotetrabenazina são reagidos com um agente de desidratação tal como pentacloreto de fósforo num solvente não prótico tal como um hidrocarboneto clorado (por exemplo, clorofórmio ou dicloro-

metano, preferivelmente diclorometano) para formar o composto insaturado (II) como um par de enantiómeros, sendo que, no Esquema, apenas está apresentado o seu enantiómero *R*. A reacção de desidratação é tipicamente efectuada a uma temperatura inferior a temperatura ambiente, por exemplo, a cerca de 0-5°C.

O composto insaturado (II) é então submetido a uma re-hidratação estereo-selectiva para gerar a dihidrotetrabenazina (VI) e a sua imagem espelho ou antípoda (não apresentada) em que os átomos de hidrogénio nas posições 3 e 11b estão dispostos numa orientação relativa de *cis* e os átomos de hidrogénio nas posições 2 e 3 estão dispostos numa orientação relativa de *trans*. A rehidratação estereo-selectiva é conseguida por um processo de hidroboração usando borano-THF em tetra-hidrofurano (THF) para formar um complexo de borano intermediário (não apresentado) que é então oxidado com peróxido de hidrogénio na presença de uma base tal como hidróxido de sódio.

Um passo inicial de purificação pode então ser efectuado (por exemplo, por HPLC) para produzir o produto (V) da sequência de reacção de re-hidratação como uma mistura dos isómeros *2S,3S,11bR* e *2R,3R,11bS*, dos quais apenas o isómero *2S,3S,11bR* está apresentado no Esquema. Para separar os isómeros, a mistura é tratada com ácido de Mosher *R(+)*, na presença de cloreto de oxalilo e dimetilaminopiridina (DMAP) em diclorometano para produzir um par de ésteres diastereo-isoméricos (VII) (dos quais

apenas um diastereo-isómero está apresentado) que pode então ser separado usando HPLC. Os ésteres individuais podem então ser hidrolisados usando um hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de sódio para produzir um único isómero (VI).

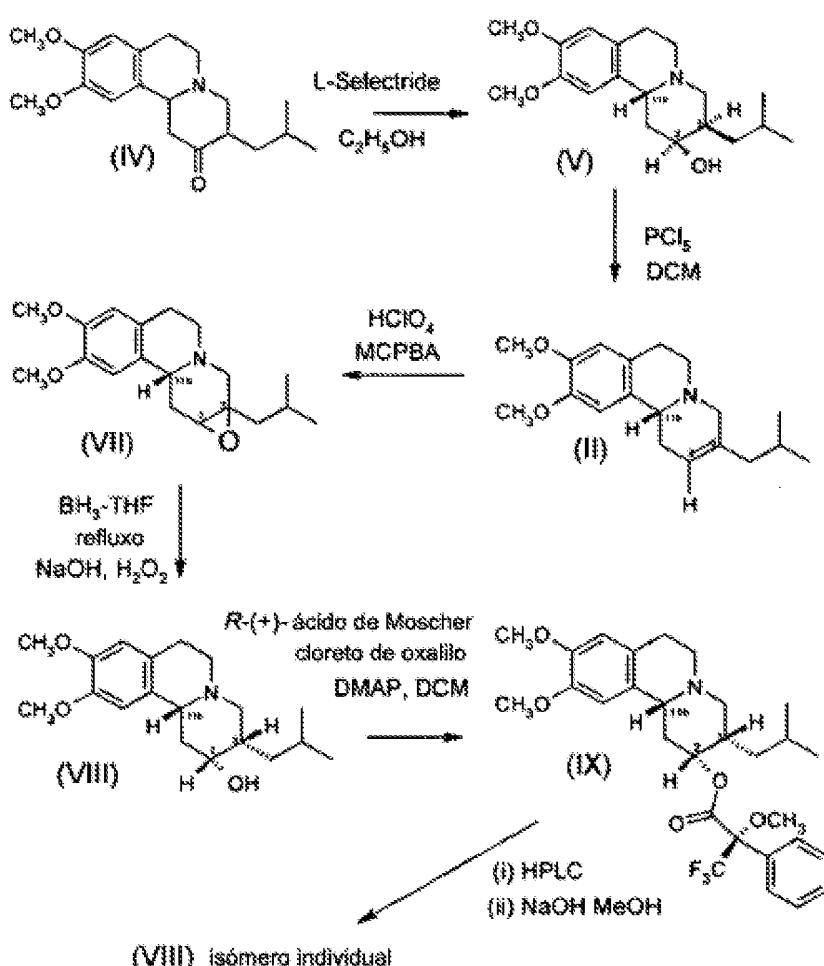
Numa variação da sequência de passos apresentada no Esquema 1, a seguir à redução da tetrabenazina RR/SS, a resultante mistura de enantiómeros da di-hidrotetrabenazina (V) pode ser separada para produzir os enantiómeros individuais. A separação pode ser efectuada formando um sal com um ácido quiral tal como ácido canforossulfónico (+) ou (-), separando os diastereo-isómeros resultantes por cristalização fraccional para produzir um sal de um enantiómero simples e, então, libertar a base livre a partir do sal.

O enantiómero de di-hidrotetrabenazina pode ser desidratado para produzir um enantiómero simples do alceno (II). A re-hidratação subsequente do alceno (II) dará então, predominantemente ou exclusivamente, um enantiómero simples da cis-di-hidrotetrabenazina (VI). Uma vantagem desta variação é a de que não envolve a formação de ésteres de ácido de Mosher e, portanto, evita a separação cromatográfica tipicamente usada para separar os ésteres de ácido de Mosher.

O esquema 2 ilustra a preparação de isómeros individuais de di-hidrotetrabenazina tendo as configurações

2R,3S,11bR e *2S,3R,11bS* em que os átomos de hidrogénio ligados às posições 2 e 3 estão dispostos numa orientação relativa de *cis*. Este esquema de reacção inclui o Processo B atrás definido.

Esquema 2



No Esquema 2, o composto insaturado (II) é produzido pela redução de tetrabenazina para produzir os isómeros (V) *2S,3R,11bR* e *2R,3S,22bS* de di-hidrotetra-

benazina e desidratar com PCl_5 na maneira atrás descrita no Esquema 1. Contudo, em vez de submeter o composto (II) a hidroboração, a ligação dupla 2,3 é convertida até um epóxido por reacção com ácido *meta*-cloroperbenzóico (MCPBA) e ácido perclórico. A reacção de epoxidação é convenientemente efectuada num solvente de álcool tal como metanol, tipicamente a cerca de temperatura ambiente.

O epóxido (VII) é então submetido a uma abertura de anel redutiva usando borano-THF como um agente de redução electrofílico para produzir um complexo de borano intermediário (não apresentado) que é então oxidado e clivado com peróxido de hidrogénio na presença de um alcáli tal como hidróxido de sódio para produzir uma dihidrotetrabenazina (VIII) como uma mistura dos isómeros 2*R*,3*S*,11*bR* e 2*S*,3*R*,11*bS*, dos quais, para simplificar, apenas está apresentado o 2*R*,3*S*,11*bR*. O tratamento da mistura de isómeros (VIII) com ácido de Mosher *R*(+) na presença de cloreto de oxalilo e dimetilaminopiridina (DMAP) em diclorometano produz um par de ésteres epiméricos (IX) (dos quais apenas está apresentado um epímero) que pode então ser separado por cromatografia e hidrolisado com hidróxido de sódio em metanol da maneira atrás descrita em relação ao Esquema 1.

Formulações Farmacêuticas

O composto de *cis*-di-hidrotetrabenazina da invenção é tipicamente administrado na forma de uma composição farmacêutica.

As composições farmacêuticas podem estar em qualquer forma adequada a administração oral, parentérica, tópica, intranasal, intrabronquial, oftálmica, ótica, rectal, intra-vaginal ou transdérmica. Quando as composições se destinarem a administração parentérica, podem ser formuladas para administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal e subcutânea ou para entrega directa a um órgão ou tecido alvo por injecção, infusão ou outro meio de entrega.

Formas farmacêuticas de doseamento adequadas para administração oral incluem comprimidos, cápsulas, caplets, pílulas, drageias, xaropes, soluções, vaporizações, pós, grânulos, elixires e suspensões, comprimidos sublinguais, vaporizações, hóstias ou pensos e pensos bucais.

As composições farmacêuticas contendo o composto de di-hidrotetraabenazina da invenção podem ser formuladas de acordo com técnicas conhecidas; ver, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA.

Assim, as composições para comprimidos podem conter uma dose unitária de composto activo juntamente com um diluente inerte ou veículo tal como um açúcar ou álcool de açúcar, por exemplo: lactose, sacarose, sorbitol ou manitol; e/ou um diluente não derivado de açúcar tal como carbonato de sódio, fosfato de cálcio, talco, carbonato de

cálcio ou uma celulose ou seu derivado tal como metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilmetylcelulose e amidos tal como amido de milho. Os comprimidos também podem conter ingredientes standard como agentes de ligação e de granulação tais como polivinilpirrolidona, desintegrantes (por exemplo, polímeros de ligação cruzada que aumentem de volume tais como a carboximetilcelulose de ligação cruzada), agentes de lubrificação (por exemplo, estearatos), preservativos (por exemplo, parabenos), antioxidantes (por exemplo, BHT), agentes de tamponamento (por exemplo tampões de fosfato ou de citrato), e agentes efervescentes tais como misturas de citrato/bicarbonato. Esses excipientes são bem conhecidos e não é necessário referi-los aqui em pormenor.

As formulações para cápsulas podem ser da variedade de gelatina dura ou de gelatina mole e podem conter o componente activo em forma sólida, semi-sólida ou líquida. As cápsulas de gelatina podem ser formadas a partir de gelatina animal ou sintética ou de seus equivalentes derivados de plantas.

As formas de doseamento sólido (por exemplo: comprimidos, cápsulas, etc.) podem ser revestidas ou não revestidas mas, tipicamente, têm um revestimento, por exemplo, uma película de revestimento protectora (por exemplo, uma cera ou verniz) ou um revestimento para o controlo da libertação. O revestimento (por exemplo, um polímero do tipo EudragitTM) pode ser designado para

libertar o componente activo numa localização pretendida no tracto gastrintestinal. Assim, o revestimento pode ser seleccionado de maneira a degradar-se sob certas condições de pH dentro do tracto gastrintestinal, de maneira a libertar o composto selectivamente, no estômago, ou no ílio ou duodeno.

Em vez de, ou além de, um revestimento, o medicamento pode ser apresentado numa matriz sólida compreendendo um agente de controlo da libertação, por exemplo, um agente retardador da libertação que pode ser adaptado para libertar selectivamente o composto sob condições de acidez ou alcalinidade variável no tracto gastrintestinal. Alternativamente, o material de matriz ou revestimento retardador de libertação pode assumir a forma de um polímero que se desgaste (por exemplo, um polímero de anidrido maleico) que, substancialmente, se desgaste continuamente à medida que a forma de doseamento passa através do tracto gastrintestinal.

Composições para uso tópico incluem ungamentos, cremes, vaporizações, pensos, geles, gotas líquidas e inserções (por exemplo, inserções intra-oculares). Essas composições podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos.

Composições para administração parentérica são tipicamente apresentadas como soluções aquosas ou oleosas

estéreis ou suspensões finas, ou podem ser produzidas em forma de pó estéril finamente dividido para ser extemporaneamente misturado com água estéril para injecção.

Exemplos de formulações para administração rectal ou intra-vaginal incluem pessários e supositórios que podem, por exemplo, ser formados a partir de um material moldável ou ceroso a que se possa dar forma, contendo o composto activo.

Composições para administração por inalação podem assumir a forma de composições de pó inalável ou vaporizações líquidas ou em pó e podem ser administradas em forma standard usando dispositivos inaladores de pó ou dispositivos nebulizadores. Esses dispositivos são bem conhecidos. Para administração por inalação, as formulações em pó compreendem, tipicamente, o composto activo juntamente com um diluente em pó sólido inerte tal como lactose.

O composto da invenção será geralmente apresentado em forma de doseamento unitário e, como tal, conterá, tipicamente, composto suficiente para produzir um nível desejado de actividade biológica. Por exemplo, uma formulação destinada a administração oral pode conter desde 2 miligramas até 200 miligramas de ingrediente activo, mais usualmente desde 10 miligramas até 100 miligramas, por exemplo, 12,5 miligramas, 25 miligramas e 50 miligramas.

Métodos de Tratamento

O composto activo será administrado a um paciente que dele necessite (por exemplo, um paciente humano ou animal) numa quantidade suficiente para se conseguir o efeito terapêutico pretendido.

O paciente que necessite dessa administração é um paciente que padeça de ou exiba, ou esteja em risco de padecer ou exibir, uma ou mais psicoses, por exemplo uma psicose característica da esquizofrenia.

O efeito desejado pode ser a prevenção, alívio ou redução da gravidade da psicose ou de um ou mais sintomas da mesma. Esses sintomas são bem conhecidos da pessoa especializada (por exemplo, um médico especializado) que seja capaz de julgar por meio de avaliação clínica e de testes efectuados de maneira convencional, se a administração de um composto da invenção resultou ou não numa alteração dos sintomas exibidos pelo paciente.

Tipicamente, o composto será administrado em quantidades que sejam terapêutica ou profilacticamente úteis e que geralmente não sejam tóxicas. Contudo, em certas situações, os benefícios de administrar o composto de di-hidrotetabenazina da invenção podem sobrepor-se às desvantagens de quaisquer efeitos tóxicos ou efeitos secundários, em cujo caso pode ser considerado desejável

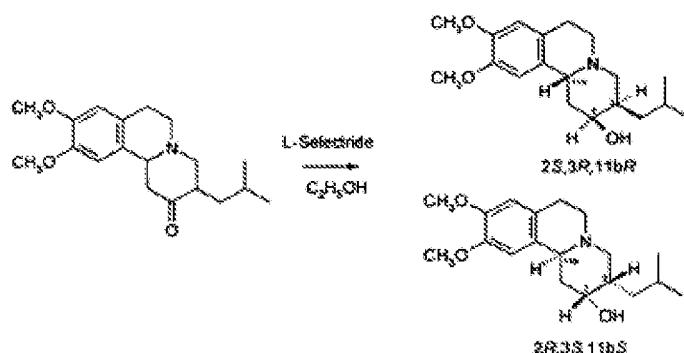
administrar compostos em quantidades que estejam associadas a um grau de toxicidade.

Uma dose diária típica do composto pode ir até 1000 mg por dia, por exemplo, na gama de 0,01 miligramas até 10 miligramas por quilograma de peso corporal, mais usualmente desde 0,025 miligramas até 5 miligramas por quilograma de peso corporal, por exemplo até 3 miligramas por quilograma de peso corporal e, mais tipicamente, 0,15 miligramas até 5 miligramas por quilograma de peso corporal embora, se necessário, possam ser administradas doses mais elevadas ou mais reduzidas.

Contudo, a quantidade de composto administrado acabará por ser comensurada com a natureza da doença ou condição física a ser tratada e com os benefícios terapêuticos e a presença ou ausência de efeitos secundários produzidos por um determinado regime de doseamento que ficará ao critério do médico.

EXEMPLOS

Os exemplos não limitativos que se seguem ilustram a síntese e as propriedades dos isómeros de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina. Os exemplos descrevem todos os quatro isómeros de 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina embora a invenção se limite aos usos terapêuticos do Isómero A (o composto de fórmula (Ib)). Os exemplos relativos aos outros isómeros são considerados como exemplos comparativos.

EXEMPLO 1Preparação dos Isómeros 2S,3S,11bR e 2R,3R,11bS de Di-hidrotetraabenazina1.A. Redução de RR/SS Tetrabenazina

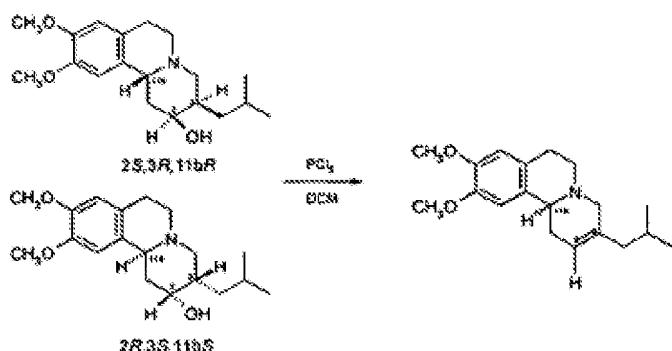
L-Selectride® 1M em tetra-hidrofuranô (135 ml, 135 mmol, 2,87 eq.) foi lentamente adicionado durante 30 minutos a uma solução agitada de racemato *RR/SS* de tetraabenazina (15 g, 47 mmol) em etanol (75 ml) e tetra-hidrofuranô (75 ml) a 0°C. Depois de a adição se completar, a mistura foi agitada a 0°C durante 30 minutos e, então, permitiu-se que aquecesse até temperatura ambiente.

A mistura foi vertida sobre gelo moído (300 g) e adicionou-se água (100 ml). A solução foi extraída com éter dietílico (2 x 200 ml) e os extractos etéreos combinados foram lavados com água (100 ml) e parcialmente secos sobre carbonato de potássio anidro. A secagem foi completada usando-se sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o

solvente foi removido a pressão reduzida (protegido da luz, temperatura do banho <20°C) para produzir um sólido amarelo pálido.

O sólido foi transformado em lama com éter de petróleo (30-40°C) e foi filtrado para produzir um sólido pulverulento branco (12 g, 80%).

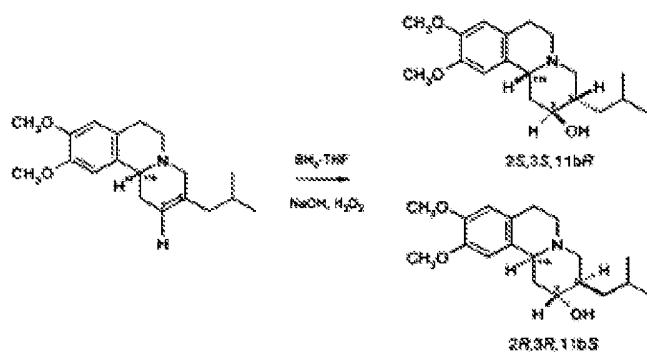
1B. Desidratação da Tetrabenazina reduzida



Adicionou-se pentacloreto de fósforo (32,8 g, 157,5 mmol, 2,5 eq) em porções durante 30 minutos a uma solução agitada do produto de tetrabenazina reduzido do Exemplo 1A (20 g, 62,7 mmol) em diclorometano (200 ml) a 0°C. Depois de a adição se completar, a mistura de reacção foi agitada a 0°C durante mais 30 minutos e a solução foi lentamente vertida numa solução de carbonato de sódio aquoso de 2M contendo gelo moído (0°C). Depois de a evolução inicial de gás de ácido ter terminado, a mistura foi basificada (ca. pH 12) usando-se carbonato de sódio sólido.

A solução alcalina foi extraída com acetato de etilo (800 ml) e os extractos orgânicos combinados foram secos sobre sulfato de magnésio anidro. Depois da filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir um óleo castanho que foi purificado por cromatografia em coluna (silíca, acetato de etilo) para produzir o alceno semi-puro como um sólido amarelo (10,87 g, 58%).

1C. Hidratação do Alceno em Bruto do Exemplo 1B



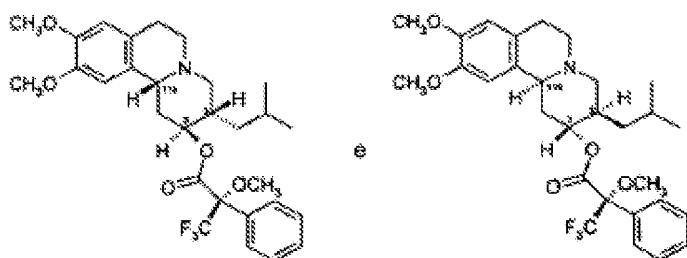
Uma solução do alceno em bruto (10,87 g, 36,11 mmol) do Exemplo 1B em THF seco (52 ml), a temperatura ambiente, foi tratada com borano-THF 1M (155,6 ml, 155,6 mmol, 4,30 eq) adicionado gota a gota. A reacção foi agitada durante 2 horas, adicionou-se água (20 ml) e a solução foi basificada até pH 12 com uma solução de hidróxido de sódio aquoso a 30%.

Uma solução de peróxido de hidrogénio aquoso a 30% (30 ml) foi adicionada à mistura de reacção alcalina e

a solução foi aquecida até refluxo durante 1 hora antes de se deixar arrefecer. Adicionou-se água (100 ml) e a mistura foi extraída com acetato de etilo (3 x 250 ml). Os extractos orgânicos foram combinados e secos sobre sulfato de magnésio anidro e, depois da filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir um óleo amarelo (9 g).

O óleo foi purificado usando HPLC preparativa (Coluna: Lichrospher Si60, 5 µm, 250 x 21,20 mm, fase móvel: hexano:etanol:diclorometano (85:15:5); UV 254 nm, fluxo: 10 ml min⁻¹) a 350 mg por injeção seguida por concentração das fracções de interesse sob vácuo. O óleo do produto foi então dissolvido em éter e, mais uma vez, concentrado sob vácuo para produzir o racemato de dihidrotetrabenazina atrás apresentado como uma espuma amarela (5,76 g, 50%).

1D. Preparação de derivados do éster de Mosher



Adicionou-se ácido acético de R-(+)-α-metoxi-α-trifluorometilfenilo (5 g, 21,35 mmol), cloreto de oxalilo (2,02 ml) e DMF (0,16 ml) a diclorometano anidro (50 ml) e

a solução foi agitada a temperatura ambiente durante 45 minutos. A solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi mais uma vez absorvido em diclorometano anidro (50 ml). A resultante solução foi arrefecida usando-se um banho de água gelada e adicionou-se dimetilaminopiridina (3,83 g, 31,4 mmol) seguida por uma solução previamente seca (crivos de mais de 4 Å) em diclorometano anidro do produto sólido do Exemplo 1C (5 g, 15,6 mmol). Depois de se agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos, adicionou-se água (234 ml) e a mistura foi extraída com éter (2 x 200 ml). O extracto de éter foi seco sobre sulfato de magnésio anidro, foi passado por uma almofada de sílica e o produto foi eluído usando-se éter.

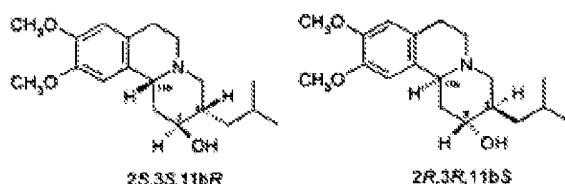
O eluado de éter recolhido foi concentrado sob pressão reduzida para produzir um óleo que foi purificado usando cromatografia em coluna (sílica, hexano:éter(10:1)). A evaporação das fracções de interesse recolhidas da coluna e a remoção do solvente a pressão reduzida produziram um sólido que foi mais purificado usando cromatografia em coluna (sílica, hexano: acetato de etilo (1:1)) para produzir três componentes principais que foram parcialmente resolvidos em picos de éster de Mosher 1 e 2.

A HPLC preparativa dos três componentes (Coluna: 2 x Lichrospher Si60, 5 µm, 250 x 21,20 mm, fase móvel: hexano:isopropanol (97:3), UV 254 nm; fluxo: 10 ml min⁻¹) a 300 mg de carga seguida pela concentração das fracções de interesse sob vácuo produziu os derivados de éster de Mosher puros

Pico 1 (3,89 g, 46,5%)

Pico 2 (2,78 g, 33%)

As fracções correspondentes aos dois picos foram submetidas a hidrólise para libertar os isómeros de dihidrotetraabenazina individual identificados e caracterizados como Isómeros A e B. Crê-se que os Isómeros A e B têm uma das seguintes estruturas:



Mais especificamente, crê-se que o Isómero B tenha a configuração absoluta 2*S*, 3*S*, 11*bR* na base das experiências de cristalografia aos raios X descritas no Exemplo 4 que se segue.

1E. Hidrólise do Pico 1 para produzir Isómero A

Uma solução de hidróxido de sódio aquosa a 20% (87,5 ml) foi adicionada a uma solução de pico 1 de éster de Mosher (3,89 g, 7,27 mmol) em metanol (260 ml) e a mistura foi agitada e aquecida até refluxo durante 150 minutos. Depois de arrefecer até temperatura ambiente adicionou-se água (200 ml) e a solução foi extraída com éter (600 ml), seca sobre sulfato de magnésio anidro e,

após filtração, foi concentrada sob pressão reduzida.

O resíduo foi dissolvido usando-se acetato de etilo (200 ml), a solução foi lavada com água (2 x 50 ml), a fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, foi concentrada sob pressão reduzida para produzir uma espuma amarela. Este material foi purificado por cromatografia de coluna (sílica, eluição gradiente de acetato de etilo:hexano (1:1) até acetato de etilo). As fracções de interesse foram combinadas e o solvente foi removido a pressão reduzida. O resíduo foi absorvido em éter e o solvente foi, mais uma vez, removido a pressão reduzida para produzir o Isómero A como uma espuma esbranquiçada (1,1 g, 47%).

O Isómero A, que se crê ter a configuração 2*R*,3*R*,11*bS* (a estequiometria absoluta não foi determinada), foi caracterizado por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV, espectrometria de massa, HPLC quiral e ORD. Os dados de IV, RMN e EM para o Isómero A estão indicados na Tabela 1 e os dados de HPLC Quiral e ORD estão indicados na Tabela 3.

1F. Hidrólise do Pico 2 para produzir o Isómero B

Adicionou-se solução de hidróxido de sódio aquosa a 20% (62,5 ml) a uma solução de pico 2 de éster de Mosher (2,78 g, 5,19 mmol) em metanol (185 ml) e a mistura foi agitada e aquecida até refluxo durante 150 minutos. Depois de arrefecer até temperatura ambiente adicionou-se água

(142 ml) e a solução foi extraída com éter (440 ml), seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, foi concentrada sob pressão reduzida.

O resíduo foi dissolvido usando acetato de etilo (200 ml), a solução foi lavada com água (2 x 50 ml), a fase orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, foi concentrada sob pressão reduzida. Adicionou-se éter de petróleo (30-40°C) ao resíduo e a solução foi mais uma vez concentrada sob vácuo para produzir o Isómero B como uma espuma branca (1,34 g, 81%).

O Isómero B, que se crê ter a configuração $2S,3S,11bR$, foi caracterizado por RMN de 1H , RMN de ^{13}C , IV, espectrometria de massa, HPLC quiral, ORD e cristalografia por raios X. Os dados de IV, RMN e EM para o Isómero B estão indicados na Tabela 1 e os dados de HPLC Quiral e ORD estão indicados na Tabela 3. Os dados de cristalografia aos raios X estão indicados no Exemplo 4.

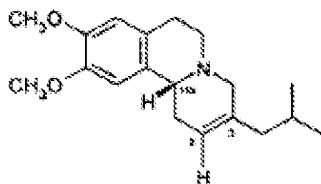
EXEMPLO 2

Preparação dos Isómeros $2R,3S,11bR$ e $2S,3R,11bS$ de Di-hidrotetrabenazina

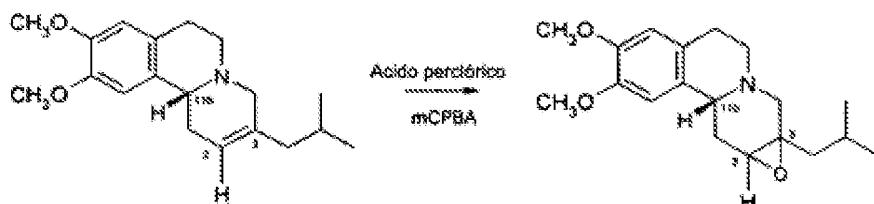
2A. Preparação de 2,3-Desidrotetrabenazina

Uma solução contendo uma mistura racémica (15 g, 47 mmol) de enantiómeros de tetrabenazina *RR* e *SS* em tetra-

hidrofuranô foi submetida a redução com L-Selectride® pelo método do Exemplo 1A para produzir uma mistura dos enantiômeros 2*S*,3*R*,11*bR* e 2*R*,3*S*,11*bS* de di-hidrotetraabenazina como um sólido pulverulento branco (12 g, 80%). A di-hidrotetraabenazina parcialmente purificada foi então desidratada usando PCl₅ de acordo com o método do Exemplo 1B para produzir uma mistura semi-pura dos isómeros 11*bR* e 11*bS* de 2,3-desidrotetraabenazina (cujo enantiômero 11*bR* está apresentado a seguir) como um sólido amarelo (19,92 g, 68%).



2B. Epoxidação do Alceno em Bruto do Exemplo 2A

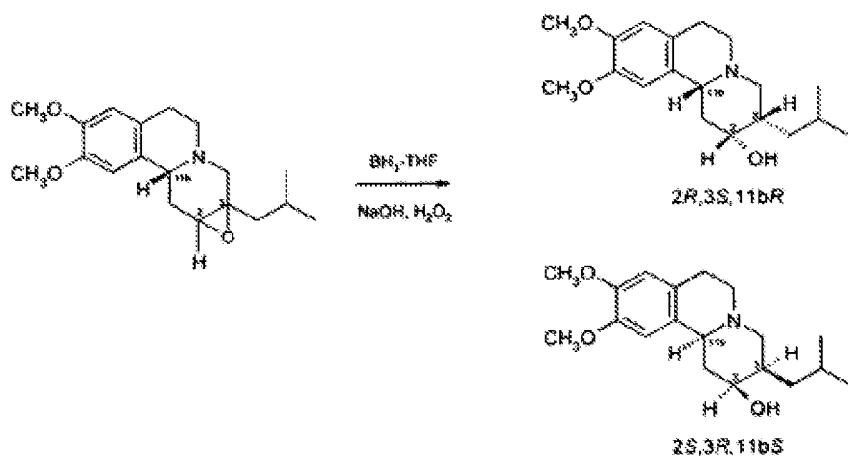


A uma solução agitada do alceno em bruto do Exemplo 2A (12,92 g, 42,9 mmol) em metanol (215 ml) foi adicionada uma solução de ácido perclórico a 70% (3,70 ml, 43 mmol) em metanol (215 ml). Adicionou-se ácido 3-cloroperroxibenzóico a 77% à reacção e a mistura resultante foi agitada durante 18 horas, a temperatura ambiente, protegida da luz.

A mistura de reacção foi vertida em solução de sulfito de sódio aquoso saturado (200 ml) e adicionou-se água (200 ml). Adicionou-se clorofórmio (300 ml) à emulsão resultante e a mistura foi basificada com bicarbonato de sódio aquoso saturado (400 ml).

A camada orgânica foi recolhida e a fase aquosa foi lavada com clorofórmio adicional (2 x 150 ml). As camadas combinadas de clorofórmio foram secas sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir um óleo castanho (14,35 g, rendimento > 100% - prováveis restos de solvente no produto). Este material foi usado sem mais purificação.

2C. Abertura de anel redutiva do Epóxido de 2B



Uma solução agitada do epóxido em bruto do Exemplo 2B (14,35 g, 42,9 mmol, assumindo um rendimento de

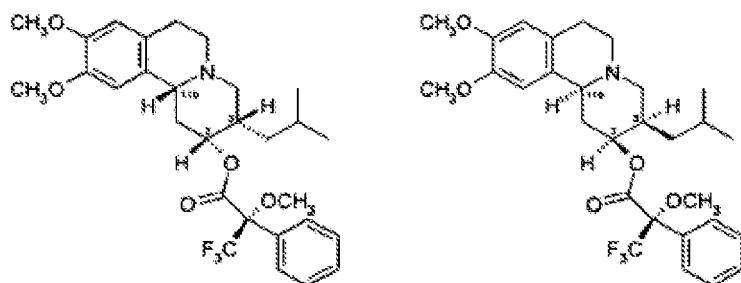
100%) em THF seco (80 ml) foi lentamente tratado com borano 1M/THF (184,6 ml, 184,6 mmol) durante 15 minutos. A reacção foi agitada durante duas horas, adicionou-se água (65 ml) e a solução foi aquecida com agitação até refluxo durante 30 minutos.

Depois de arrefecer, adicionou-se à mistura de reacção uma solução de hidróxido de sódio a 30% (97 ml) seguida por uma solução de peróxido de hidrogénio a 30% (48,6 ml) e a reacção foi agitada e aquecida até refluxo durante mais 1 hora.

A mistura de reacção arrefecida foi extraída com acetato de etilo (500 ml) seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida para produzir um óleo. Adicionou-se hexano (230 ml) ao óleo e a solução foi re-concentrada sob pressão reduzida.

O resíduo oleoso foi purificado por cromatografia de coluna (sílica, acetato de etilo). As fracções de interesse foram combinadas e o solvente foi removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado mais uma vez usando-se cromatografia de coluna (sílica, gradiente, hexano até éter). As fracções de interesse foram combinadas e os solventes evaporados a pressão reduzida para se produzir um sólido amarelo pálido (5,18 g, 38%).

2.D. Preparação de derivados de éster de Mosher
dos Isómeros 2R,3S,11bR e 2S,3R,11bS de Di-hidro-tetra-
benazina



Adicionou-se ácido acético de R-(+)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilo (4,68 g, 19,98 mmol), cloreto de oxalilo (1,90 ml) e DMF (0,13 ml) a diclorometano anidro (46 ml) e a solução foi agitada a temperatura ambiente durante 45 minutos. A solução foi concentrada sob pressão reduzida e o resíduo foi mais uma vez absorvido em diclorometano anidro (40 ml). A solução resultante foi arrefecida usando-se um banho de água gelada e adicionou-se dimetilamino-piridina (3,65 g, 29,87 mmol) seguida por uma solução previamente seca (sobre crivos de 4 \AA) em diclorometano anidro (20 ml) do produto sólido do Exemplo 2C (4,68 g, 14,6 mmol). Depois de se agitar a temperatura ambiente durante 45 minutos, adicionou-se água (234 ml) e a mistura foi extraída com éter (2 x 200 ml). O extracto de éter foi seco sobre sulfato de magnésio anidro, passado através de uma almofada de sílica e o produto foi eluído usando-se éter.

O eluado de éter recolhido foi concentrado sob pressão reduzida para produzir um óleo que foi purificado usando-se cromatografia de coluna (sílica, hexano:éter (1:1)).

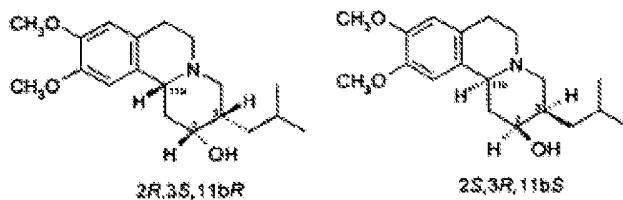
A evaporação das fracções de interesse recolhidas da coluna e a remoção do solvente a pressão reduzida produziram um sólido cor-de-rosa (6,53 g).

A HPLC preparativa do sólido (Coluna: 2 x Lichrospher Si60, 5 µm, 250 x 21,20 mm; hexano de fase móvel:isopropanol (97:3); UV 254 nm; fluxo: 10 ml min⁻¹) a 100 mg de carga seguida por concentração das fracções de interesse sob vácuo produziram um sólido que foi transformado em lama com éter de petróleo (30-40°C) e recolhido por filtração para produzir os derivados de éster de Mosher puros.

Pico 1 (2,37 g, 30%)

Pico 2 (2,42 g, 30%)

As fracções correspondentes aos dois picos foram submetidas a hidrólise para libertar os isómeros individuais de di-hidrotetrabenazina identificados e caracterizados como Isómeros C e D. Crê-se que os isómeros C e D têm, cada, uma das seguintes estruturas:



2F. Hidrólise do Pico 1 para produzir Isómero C

Adicionou-se 20% de solução de hidróxido de sódio aquoso (53 ml) a uma solução agitada de pico 1 de éster de Mosher (2,37 g, 4,43 mmol) em metanol (158 ml) e a mistura foi agitada a refluxo durante 150 minutos. Depois do arrefecimento adicionou-se água (88 ml) à mistura de reacção e a solução resultante foi extraída com éter (576 ml). O extracto orgânico foi seco sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida. Adicionou-se acetato de etilo (200 ml) ao resíduo e a solução foi lavada com água (2 x 50 ml). A solução orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida.

Este resíduo foi tratado com éter de petróleo (30-40°C) e o resultante sólido suspenso foi recolhido por filtração. O filtrado foi concentrado a pressão reduzida e o segundo lote de sólido suspenso foi recolhido por filtração. Ambos os sólidos recolhidos foram combinados e secos sob pressão reduzida para produzir Isómero C (1,0 g, 70%).

O Isómero C, que se crê ter a configuração quer

2R,3S,11bR quer *2S,3R,11bS* (a estereoquímica absoluta não foi determinada), foi caracterizado por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , IV, espectrometria de massa, HPLC quiral e ORD. Os dados de IV, RMN e EM para o Isómero C estão indicados na Tabela 2 e os dados de HPLC Quiral e dados de ORD estão indicados na Tabela 4.

2G. Hidrólise do Pico 2 para produzir Isómero D

Adicionou-se solução de hidróxido de sódio aquoso a 20% (53 ml) a uma solução agitada de pico 2 de éster de Mosher (2,42 g, 4,52 mmol) em metanol (158 ml) e a mistura foi agitada a refluxo durante 150 minutos. Depois do arrefecimento adicionou-se água (88 ml) à mistura de reacção e a solução resultante foi extraída com éter (576 ml). O extracto orgânico foi seco sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida. Adicionou-se acetato de etilo (200 ml) ao resíduo e a solução foi lavada com água (2 x 50 ml). A solução orgânica foi seca sobre sulfato de magnésio anidro e, após filtração, o solvente foi removido a pressão reduzida.

Este resíduo foi tratado com éter de petróleo (30-40°C) e o resultante sólido laranja suspenso foi recolhido por filtração. O sólido foi dissolvido em acetato de etilo:hexano (15:85) e foi purificado por cromatografia de coluna (sílica, gradiente acetato de etilo:hexano (15:85) até acetato de etilo). As fracções de interesse foram combinadas e o solvente foi removido a pressão

reduzida. O resíduo foi transformado em lama com éter de petróleo (30-40°C) e a suspensão resultante foi recolhida por filtração. O sólido recolhido foi seco sob pressão reduzida para produzir o Isómero D como um sólido branco (0,93 g, 64%).

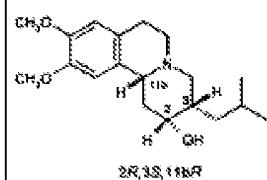
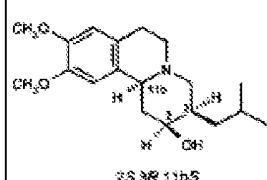
O Isómero D, que se crê ter a configuração quer $2R,3S,11bR$ quer $2S,3R,11bS$ (a estereoquímica absoluta não foi determinada), foi caracterizado por RMN de 1H , RMN de ^{13}C , IV, espectrometria de massa, HPLC quiral e ORD. Os dados de IV, RMN e EM para o Isómero D estão indicados na Tabela 2 e os dados de HPLC Quiral e de ORD estão indicados na Tabela 4.

Nas Tabelas 1 e 2, os espectros de infravermelhos foram determinados usando-se o método de disco de KBr. Os espectros de RMN de 1H foram efectuados sobre soluções em clorofórmio deuterado usando um espectrómetro de RMN Varian Gemini (200 MHz). Os espectros de RMN de ^{13}C foram efectuados sobre soluções em clorofórmio deuterado usando um espectrómetro de RMN Varian Gemini (50 MHz). Os espectros de massa foram obtidos usando-se um espectrómetro Micromass Platform II (condições de ES^+). Nas Tabelas 3 e 4, as figuras de Dispersão Óptica Rotativa foram obtidas usando-se um instrumento Optical Activity PolAAR 2001 em solução de metanol a 24°C. As medições do tempo de retenção de HPLC foram efectuadas usando-se um cromatógrafo de HPLC HP1050 com detecção de UV.

Tabelas 1 e 2

Dados Espectroscópicos

Tabela 2

Isómero de Di-hidrotetraabenazina	Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3)	Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3)	Espectro de IV (KBr sólido)	Espectro de massa (ES $^+$)
Isómeros C e D  OU 	6,68 δ 1H (s); 6,58 δ 1H (s); 3,92 δ 1H (m); 3,84 δ 6H (s); 3,15 δ 1H (m); 2,87 δ 3H (m); 2,43 δ 4H (m); 1,81 δ 1H (m); 1,64 δ 4H (m); 1,21 δ 1H (m); 0,94 δ 3H (d); 0,89 δ 3H (d);	147,8δ; 147,7δ; 130,4δ; 127,2δ; 112,0δ; 108,3δ; 72,4 δ; 61,2 δ; 58,3 δ; 56,5 δ; 56,3 δ; 52,7 δ; 38,6 δ; 36,7 δ; 34,4 δ; 29,6 δ; 26,5 δ; 24,4 δ; 22,5 δ;	147,8δ; 147,7δ; 130,4δ; 127,2δ; 112,0δ; 108,3δ; 72,4 δ; 61,2 δ; 58,3 δ; 56,5 δ; 56,3 δ; 52,7 δ; 38,6 δ; 36,7 δ; 34,4 δ;	MH^+ 320

Tabelas 3 e 4
Dados de Cromatografia e de ORD

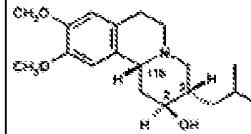
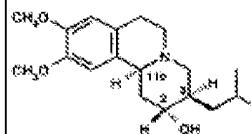
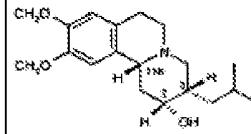
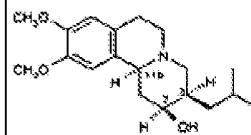
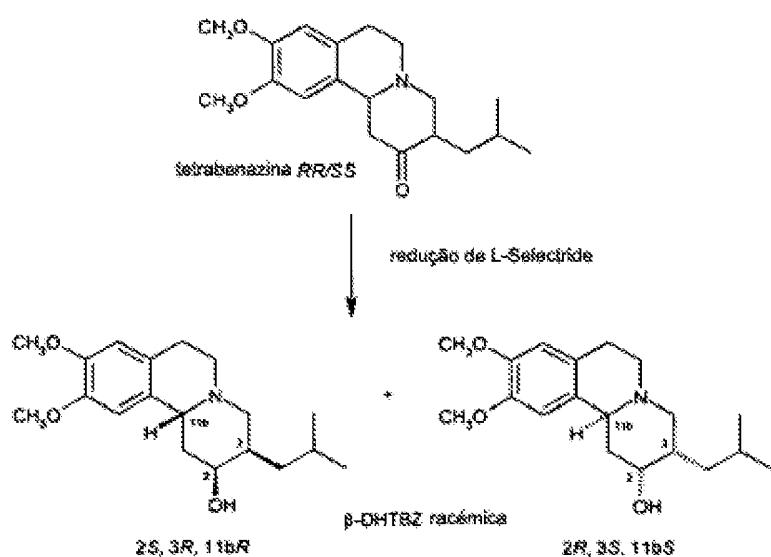
Tabela 3		
Isómero de dihidrotetraabenazina	Métodos de HPLC Quiral e Tempos de Retenção	ORD (MeOH, 21°C)
Isómeros A e B  	Coluna: Chirex (S)-VAL, (R)-NEA, 250 x 4,6 mm Fase móvel: Hexano:1,2-dicloroetano: etanol (36:62:2) Fluxo: 1,0 ml min ⁻¹ UV: 254 nm Tempos de retenção: Isómero A 16,6 min Isómero B 15,3 min	Isómero A $[\alpha_D] -114,6^\circ$ Isómero B $[\alpha_D] +123^\circ$

Tabela 4		
Isómeros C e D	Métodos de HPLC Quiral e Tempos de Retenção	ORD (MeOH, 21°C)
 	Coluna: Chirex (S)-VAL, (R)-NEA, 250 x 4,6 mm Fase móvel: Hexano:etanol (92:8) Fluxo: 1,0 ml min ⁻¹ UV: 254 nm Tempos de retenção: Isómero C 20,3 min Isómero D 19,4 min	Isómero C $[\alpha_D] +150,9^\circ$ Isómero D $[\alpha_D] -145,7^\circ$

EXEMPLO 3

Método Alternativo para a Preparação de Isómero B e
Preparação do Sal de Mesilato

3A. Redução de Tetrabenazina RR/SS

Lentamente, adicionou-se L-Selectride® de 1M em tetra-hidrofuran (52 ml, 52 mmol, 1,1 eq) durante 30 minutos a uma solução agitada e arrefecida (banho de gelo) de racemato de tetrabenazina (15 g, 47 mmol) em tetra-hidrofuran (56 ml). Depois de a adição se completar, deixou-se a mistura aquecer até temperatura ambiente e foi agitada durante mais seis horas. A análise de TLC (sílica, acetato de etilo) mostrou que apenas restavam quantidades muito pequenas do material de partida.

A mistura foi vertida sobre uma mistura agitada de gelo moído (112 g), água (56 ml) e ácido acético glacial

(12,2 g). A resultante solução amarela foi lavada com éter (2 x 50 ml) e foi basificada pela lenta adição de carbonato de sódio sólido (ca. 13 g). Adicionou-se éter de pet (30-40°C) (56 ml) à mistura com agitação e a β -DHTBZ em bruto foi recolhida como um sólido branco, por filtração.

O sólido em bruto foi dissolvido em diclorometano (ca. 150 ml) e a solução resultante foi lavada com água (40 ml), seca usando sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida até cerca de 40 ml. Formou-se uma suspensão espessa de sólido branco. Adicionou-se éter de pet (30-40°C) (56 ml) e a suspensão foi agitada durante quinze minutos a temperatura de laboratório. O produto foi recolhido por filtração e lavado no filtro até ficar branco de neve usando-se éter de pet (30-40°C) (40 a 60 ml) antes de secar ao ar a temperatura ambiente para produzir β -DHTBZ (10,1 g, 67%) como um sólido branco. A análise de TLC (silica, acetato de etilo) mostrou apenas um componente.

3B. Preparação e Cristalização Fraccional do Sal de ácido Canforossulfónico da β -DHTBZ Racémica

O produto do Exemplo 3A e 1 equivalente do ácido (*S*)-(+)-Canforo-10-sulfônico foram dissolvidos com aquecimento na quantidade mínima de metanol. Deixou-se que a solução resultante arrefecesse e, então, foi lentamente diluída com éter até se completar a formação de precipitação do sólido resultante. O sólido cristalino branco

resultante foi recolhido por filtração e foi lavado com éter antes de secar.

O sal de ácido canforossulfônico de (10 g) foi dissolvido numa mistura de etanol absoluto quente (170 ml) e metanol (30 ml). A solução resultante foi agitada e deixou-se arrefecer. Passadas duas horas, o precipitado formado foi recolhido por filtração como um sólido cristalino branco (2,9 g). Uma amostra do material cristalino foi batido num funil de separação com carbonato de sódio aquoso saturado em excesso e diclorometano. A fase orgânica foi separada, seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida. O resíduo foi triturado usando éter de pet (30-40°C) e a solução orgânica foi concentrada mais uma vez. A análise do sal por HPLC quirral, usando uma coluna Chirex (S)-VAL e (R)-NEA 250 x 4,6 mm e um eluente de hexano:etanol (98:2) a um fluxo de 1 ml/minuto, mostrou que a β -DHTBZ isolada foi enriquecida num enantiómero (e.e. cerca de 80%).

O sal de ácido canforossulfônico enriquecido (14 g) foi dissolvido em etanol absoluto quente (140 ml) e adicionou-se propan-2-ol (420 ml). A solução resultante foi agitada e um precipitado começou a formar-se no espaço de um minuto. Deixou-se que a mistura arrefecesse até temperatura ambiente e fosse agitada durante uma hora. O precipitado que se formou foi recolhido por filtração, lavado com éter e seco para produzir um sólido cristalino branco (12 g).

O material cristalino foi batido num funil de separação com carbonato de sódio aquoso saturado e diclorometano em excesso. A fase orgânica foi separada, seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida. O resíduo foi triturado usando éter de pet (30-40°C) e a solução orgânica foi concentrada mais uma vez para produzir (depois da secagem em vácuo) (+)- β -DHTBZ (6,6 g, ORD + 107,8°). O enantiómero isolado tem e.e.>97%.

3C. Preparação do Isómero B

Durante dez minutos, efectuou-se a adição constante de uma solução de pentacloreto fosforoso (4,5 g, 21,6 mmol, 1,05 eq) em diclorometano a uma solução agitada e arrefecida (banho de gelo-água) do produto do Exemplo 3B (6,6 g, 20,6 mmol) em diclorometano (90 ml). Quando a adição se completou, a resultante solução amarela foi agitada durante mais dez minutos antes de ser vertida sobre uma mistura rapidamente agitada de carbonato de sódio (15 g) em água (90 ml) e gelo moído (90 g). A mistura foi agitada durante mais 10 minutos e foi transferida para um funil de separação.

Uma vez separadas as fases, a camada castanha de diclorometano foi removida, seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada a pressão reduzida para produzir o intermediário de alceno em bruto como óleo

castanho (cerca de 6,7 g). A análise de TLC (sílica, acetato de etilo) mostrou que não restava nenhum (+)- β -DHTBZ no produto em bruto.

O alceno em bruto foi absorvido (atmosfera de azoto seco) em tetra-hidrofurano anidro (40 ml) e adicionou-se uma solução de borano em THF (solução de 1M, 2,5 eq, 52 ml) com agitação durante quinze minutos. A mistura de reacção foi então agitada a temperatura ambiente durante duas horas. A análise de TLC (sílica, acetato de etilo) mostrou que não restava nenhum intermediário de alceno na mistura de reacção.

Adicionou-se uma solução de hidróxido de sódio (3,7 g) em água (10 ml) à mistura de reacção em agitação, seguida por uma solução aquosa de peróxido de hidrogénio (50%, cerca de 7 ml) e a mistura de duas fases que se formou foi agitada a refluxo durante uma hora. A análise de TLC (sílica, acetato de etilo) mostrou o aparecimento de um produto com Rf como esperado para o Isómero B. Também se observou um componente não polar característico.

Deixou-se que a mistura de reacção arrefecesse a temperatura ambiente e foi vertida num funil de separação. A camada orgânica superior foi removida e concentrada sob pressão reduzida para remover a maioria do THF. O resíduo foi absorvido em éter (estabilizado (BHT), 75 ml), lavado com água (40 ml), seco sobre sulfato de magnésio anidro,

filtrado e concentrado sob pressão reduzida para produzir um óleo amarelo pálido (8,1 g).

O óleo amarelo foi purificado usando cromatografia de coluna (sílica, acetato de etilo:hexano (80:20), aumentando até 100% de acetato de etilo) e as pretendidas fracções da coluna foram recolhidas, combinadas e concentradas a pressão reduzida para produzir um óleo pálido que foi tratado com éter (estabilizado, 18 ml) e concentrado a pressão reduzida para produzir o Isómero B como uma espuma sólida amarelo pálido (2,2 g).

A HPLC quiral, usando as condições indicadas no Exemplo 3B, confirmou que o Isómero B tinha sido produzido num excesso enantiomérico (e.e.) superior a 97%.

A rotação óptica foi medida usando um polarímetro Bellingham Stanley ADP220 e resultou num $[\alpha_D]$ de +123,5°.

3D. Preparação do sal de Mesilato do Isómero B

O sal metanossulfonato do Isómero B foi preparado dissolvendo-se uma mistura de 1 equivalente de Isómero B do Exemplo 3C e 1 equivalente de ácido metano-sulfónico na quantidade mínima de etanol e, então, adicionando éter dietílico. O resultante precipitado branco que se formou foi recolhido por filtração e seco *in vacuo* para produzir o sal de mesilato num rendimento de cerca de 85% e uma pureza (por HPLC) de cerca de 96%.

EXEMPLO 4

Estudos Cristalográficos aos Raios X sobre o Isómero B

O sal do ácido (S)-(+) -Canforo-10-sulfónico do Isómero B foi preparado e submeteu-se um cristal simples a estudos cristalográficos sob as seguintes condições:

Difractómetro: detector de área Nonius KappaCCD (varrimentos de t/i e varrimentos de OJ para preencher a unidade assimétrica).

Determinação celular: DirAx (Duisenberg, A.J.M. (1992). *J. Appl. Cryst.* 25, 92-96).

Recolha de dados: Colheita (Colheita: Software de recolha de dados, R. Hooft, Nonius B.V., 1998).

Redução de dados e refinamento celular: Demo (Z. Otwinowski & W. Minor, *Methods in Enzymology* (1997) Vol. 276: *Macromolecular Crystallography*, parte A, pp. 307-326; C.W. Carter, Jr & R.M. Sweet, Eds., Academic Press).

Correcção da absorção: Sheldrick, G.M. SADABS - escalonamento e correcção de absorção por detector de área Bruker Nonius - B2.\0

Solução da Estrutura: SHELXS97 (G.M. Sheldrick, *Acta Cryst.* (1990) A46 467-473).

Refinamento da Estrutura: SHELXL97 (G.M. Sheldrick (1997), Universidade de Göttingen, Alemanha).

Gráficos: Cameron - *A Molecular Graphics Package*
(D.M. Watkin, L. Pearce e C.K. Prout, Laboratório de Cristalografia Química, Universidade de Oxford, 1993)

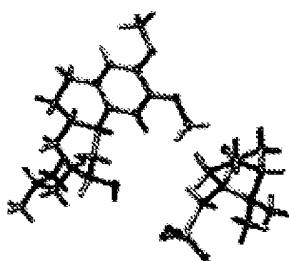
Pormenores especiais: Todos os átomos de hidrogénio foram colocados em posições idealizadas e refinados usando um modelo restringido ("riding model"), excepto os de NH e de OH que foram localizados no mapa de diferenças e refinados usando restrições. Quiralidade: NI=R, CI2=S, CI3=S, CI5=R, C21=S, C24=R.

Os resultados dos estudos estão a seguir indicados nas Tabelas A, B, C, D e E.

Nas Tabelas, o rótulo RUS0350 refere-se ao Isómero B.

TABELA A

Código de Identificação	2005bdy0585 (RUS0350)
Fórmula empírica	C ₂₉ H ₄₅ NO ₇ S
Peso da fórmula	551,72
Temperatura	120(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	Ortorrombico
Grupo espacial	P ₂ 12 ₁ 2 ₁
Dimensões da célula unitária	a = 7,1732(9) Å b = 12,941(2) Å c = 31,025(4) Å
Volume	2880,1(7) Å ³



Z	4
Densidade (calculada)	1,272 Mg/m ³
Coeficiente de absorção	0,158 mm ⁻¹
F(000)	1192
Cristal	Placa incolor
Tamanho do cristal	0,2 x 0,2 x 0,04 mm ³
Gama θ para recolha de dados	3,06 - 27,37°
Gamas de índice	-8 \leq h \leq 9, -16 \leq k \leq 16, -36 \leq l \leq 39
Reflexos reunidos	36802
Reflexos independentes	6326 [R _{int} = 0,0863]
Completo até $\theta = 27,37^\circ$	97,1%
Correcção de absorção	Semi-empírica a partir de equivalentes
Transmissão máx. e mín.	0,9937 e 0,9690
Método de refinamento	Mínimos-quadrados de matriz completa em F ²
Dados/restricções/parâmetros	6326/1/357
Bondade de ajustamento em F ²	1,042
Índices R finais [F ² >2σ(F ²)]	R1 = 0,0498, wR2 = 0,0967
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,0901, wR2 = 0,1108
Parâmetro de estrutura absoluta	0,04(8)
Coeficiente de extinção	0,0059(7)
Maior dif. pico e depressão	0,236 e -0,336 e Å ⁻³

TABELA B. Coordenadas atómicas [x 10⁴], parâmetros de deslocação isotrópica equivalentes [Å² x 10³] e coeficientes de ocupação de sítio. U_{eq} é definido como sendo um terço do traço do tensor U^{ij} ortogonalizado.

Atomo	x	y	z	U _{eq}	δαβ
N1	4839(3)	11118(3)	2180(1)	24(1)	1
O1	2515(3)	13171(1)	348(1)	31(1)	1
O2	5584(3)	14038(1)	598(1)	32(1)	1
O3	9229(3)	12834(2)	2388(1)	38(1)	1
C1	8704(1)	12674(2)	190(1)	58(1)	1
C2	3178(3)	12838(2)	738(1)	25(1)	1
C3	2348(4)	12109(2)	997(1)	25(1)	1

(continuação)

Atom	x	y	z	Ueq	S.e.t
C4	3124(3)	11821(2)	1335(1)	24(1)	1
C5	4773(3)	12278(2)	1527(1)	29(1)	1
C8	5829(4)	13024(2)	1282(1)	24(1)	1
C7	4851(4)	12208(2)	875(1)	25(1)	1
C9	7189(4)	14582(2)	747(1)	28(1)	1
C8	2188(3)	11023(2)	1673(1)	28(1)	1
C10	2759(3)	11118(2)	2127(1)	26(1)	1
C11	5386(3)	11088(2)	2038(1)	26(1)	1
C12	7292(4)	11538(2)	2747(1)	25(1)	1
C13	7488(4)	12683(2)	2380(1)	25(1)	1
C14	5988(4)	12811(2)	2282(1)	25(1)	1
C15	5773(4)	12010(2)	1943(1)	24(1)	1
C16	7704(4)	11477(2)	2222(1)	28(1)	1
C17	7752(4)	10418(2)	3449(1)	34(1)	1
C18	8198(3)	9880(2)	3388(1)	38(1)	1
C19	8114(4)	10592(2)	9999(1)	41(1)	1
C20	7509(4)	8131(2)	1250(1)	31(1)	1
S1	7408(1)	8792(1)	1784(1)	27(1)	1
O4	7758(3)	7985(1)	2054(1)	30(1)	1
O5	8831(3)	9682(2)	1789(1)	48(1)	1
O6	9324(3)	8221(1)	1798(1)	32(1)	1
O7	7408(3)	6932(1)	498(1)	48(1)	1
C21	6858(3)	8882(2)	830(1)	29(1)	1
C22	7154(4)	7851(2)	459(1)	30(1)	1
C23	7372(4)	8480(2)	461(1)	32(1)	1
C24	6848(3)	9544(2)	203(1)	28(1)	1
C25	4742(3)	8877(2)	787(1)	29(1)	1
C26	4742(3)	8877(2)	787(1)	29(1)	1
C27	7773(4)	9810(2)	820(1)	25(1)	1
C28	7431(4)	10628(2)	888(1)	29(1)	1
C29	9895(4)	9489(2)	589(1)	36(1)	1

TABELA C. Comprimentos da ligação [Å] e ângulos [°]

Ni-O1	1.498(3)	C14-C15	1.518(3)
Ni-O15	1.522(3)	C16-C17	1.526(3)
Ni-O1	1.524(3)	C17-C18	1.527(4)
O1-C2	1.368(3)	C17-C19	1.527(4)
O1-C3	1.420(3)	C20-S1	1.525(3)
O2-C7	1.369(3)	C20-S1	1.784(2)
O2-C8	1.433(3)	S1-O5	1.4442(18)
O3-C13	1.425(3)	S1-O4	1.4607(17)
C2-C3	1.372(3)	S1-O8	1.4676(18)
C2-C7	1.417(3)	O7-C22	1.208(3)
C3-C4	1.407(3)	C21-C22	1.537(4)
C4-C5	1.384(3)	C21-C26	1.569(3)
C4-C9	1.506(3)	C21-C27	1.585(3)
C5-C6	1.411(3)	C22-C23	1.517(4)
C5-C15	1.516(3)	C23-C24	1.535(4)

(continuação)

C6-C7	1.372(3)	C24-C25	1.548(4)
C9-C10	1.504(3)	C24-C27	1.554(4)
C11-C12	1.521(2)	C25-C26	1.557(4)
C12-C16	1.540(3)	C27-C28	1.528(3)
C12-C13	1.544(3)	C27-C29	1.542(4)
C13-C14	1.524(3)		
C10-Ni-C15	113.33(19)	C12-C13-Ni	113.43(19)
C10-Ni-C11	109.46(18)	C11-C12-C16	110.5(2)
C15-Ni-C11	111.96(19)	C11-C12-C13	111.7(2)
C2-C1-C1	116.8(2)	C18-C22-C19	109.84(19)
C7-C2-C8	110.27(19)	C3-C10-C14	106.0(2)
C1-C2-C3	125.5(2)	C3-C13-C12	111.1(2)
C1-C2-C7	115.0(2)	C14-C13-C12	111.0(2)
C3-C2-C7	119.5(2)	C15-C24-C18	110.1(2)
C2-C3-C4	121.5(2)	C5-C15-C14	114.3(2)
C5-C4-C3	119.2(2)	C5-C15-Ni	112.0(2)
C5-C4-C9	120.3(2)	C14-C15-Ni	108.7(2)
C3-C4-C9	120.5(2)	C17-C26-C12	118.4(2)
C4-C5-C6	119.4(2)	C18-C17-C16	112.2(2)
C4-C5-C5	124.1(2)	C18-C17-C19	108.7(2)
C8-C5-C15	116.8(2)	C18-C17-C19	110.8(3)
C7-C8-C5	121.3(2)	C21-C20-C11	122.51(18)
C8-C7-C8	125.4(2)	C5-C11-C14	112.89(11)
C2-C7-C2	115.4(2)	C5-C11-C16	112.47(12)
C6-C7-C2	119.2(2)	C4-C11-C16	111.93(11)
C10-C9-C4	111.7(2)	C5-C11-C20	108.81(13)
Ni-C12-C9	111.0(2)	C4-C11-C20	102.80(11)
O8-C1-C20	107.44(12)	C23-C24-C25	106.4(2)
C20-C21-C22	109.0(2)	C23-C24-C27	103.3(2)
C20-C21-C28	117.3(2)	C25-C24-C27	102.3(2)
C22-C21-C26	102.1(2)	C24-C25-C26	102.9(2)
C20-C21-C27	123.4(2)	C25-C26-C21	104.2(2)
C22-C21-C27	100.21(19)	C28-C27-C29	107.8(2)
C28-C21-C27	101.7(2)	C28-C27-C24	112.0(2)
O7-C22-C23	126.4(2)	C29-C27-C24	113.7(2)
O7-C22-C21	125.9(2)	C28-C27-C21	116.5(2)
C23-C22-C21	107.7(2)	C29-C27-C21	112.3(2)
C22-C23-C24	101.3(2)	C24-C27-C21	94.27(19)

TABELA D. Parâmetros de deslocação anisotrópica [$\text{Å}^2 \times 10^3$].

O expoente do coeficiente de deslocação anisotrópica assume a forma: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2hka^* b^* U^{12}]$.

Atomo	U_{\parallel}	$U_{\perp\perp}$	$U_{\perp\parallel}$	$U_{\parallel\perp}$	$U_{\parallel\parallel}$	$U_{\perp\perp\perp}$
Si	26(1)	24(1)	23(1)	2(1)	-1(1)	-3(1)
O1	37(1)	36(1)	24(1)	3(1)	-7(1)	-4(1)
O2	41(1)	31(1)	29(1)	6(1)	-2(1)	-10(1)
O3	26(1)	48(1)	32(1)	7(1)	-3(1)	-3(1)
O4	41(2)	38(2)	32(2)	9(1)	-9(1)	-9(2)
C2	39(2)	24(2)	22(1)	1(1)	-1(1)	2(1)

(continuação)

Atom	U_{\parallel}	U_{xx}	U_{yy}	U_{zz}	U_{xy}	U_{xz}
C3	25(1)	28(1)	24(1)	-3(1)	-2(1)	2(1)
C4	25(2)	22(1)	23(1)	-1(1)	2(1)	-1(1)
C5	24(1)	22(1)	23(1)	-2(1)	1(1)	0(1)
O8	26(1)	22(1)	24(1)	-3(1)	2(1)	-5(1)
O7	26(2)	22(1)	23(1)	2(1)	4(1)	-4(1)
C8	45(2)	24(2)	36(2)	5(1)	-2(3)	-20(2)
C9	23(1)	22(1)	29(2)	3(1)	-1(1)	-4(1)
O10	26(1)	22(1)	25(1)	2(1)	0(1)	-5(1)
C11	31(1)	25(1)	29(1)	2(1)	0(1)	-2(1)
C12	26(1)	28(1)	23(1)	-1(1)	1(1)	-1(1)
C13	26(1)	28(1)	23(1)	-1(1)	-1(1)	-2(1)
C14	35(2)	22(2)	24(1)	-1(1)	1(1)	-1(1)
C15	22(1)	22(1)	28(1)	2(1)	0(1)	-4(1)
C16	21(1)	28(1)	24(1)	-1(1)	-2(1)	3(1)
O7	46(2)	31(2)	25(1)	1(1)	-7(1)	6(2)
C18	106(2)	48(2)	41(2)	8(2)	-1(2)	31(2)
C19	61(2)	41(2)	31(2)	9(2)	-7(1)	-4(2)
C20	59(2)	24(2)	29(1)	2(1)	3(1)	9(2)
S1	27(1)	38(1)	24(1)	4(1)	-2(1)	-5(1)
S4	91(1)	38(1)	23(1)	9(1)	-1(1)	0(1)
S6	53(1)	53(1)	37(1)	15(1)	-11(1)	-35(1)
S8	24(1)	35(1)	28(1)	-3(1)	-2(1)	16(1)
S7	81(2)	25(1)	40(1)	-1(1)	12(1)	8(1)
C21	26(1)	39(2)	24(1)	-1(1)	3(1)	2(1)
C22	35(2)	25(2)	31(2)	8(1)	1(1)	-1(1)
C23	40(2)	39(2)	25(1)	-2(1)	1(1)	-2(1)
C24	28(1)	28(2)	28(2)	2(1)	3(1)	2(1)
C25	33(2)	34(2)	29(2)	-1(1)	-2(1)	8(1)
C26	26(1)	34(2)	28(2)	8(1)	1(1)	-5(1)
C27	33(1)	28(1)	28(1)	8(1)	2(1)	0(1)
C28	21(1)	28(1)	30(1)	8(1)	-2(1)	-6(1)
C29	25(2)	41(2)	40(2)	8(2)	2(1)	-2(1)

TABELA E. Coordenadas de hidrogénio [$\times 10^4$] e parâmetros de deslocação isotrópica [$\text{\AA}^2 \times 10^3$].

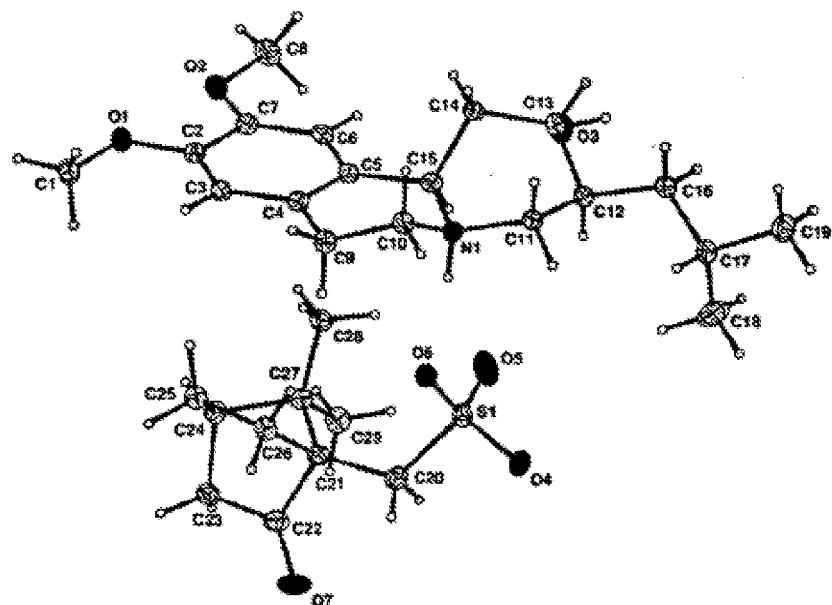
Atom	x	y	z	U_{eq}	S.o.f
H96	5130(40)	10528(15)	2062(10)	70(8)	1
H98	10030(50)	12850(30)	2575(12)	70(8)	1
H1A	1107	11933	156	64	1
H1B	529	12973	-69	64	1
H1C	-154	12777	395	54	1
H3	1220	11793	804	30	1
H6	6780	13337	1353	29	1
H8A	6872	14988	1009	58	1
H8B	7800	15086	529	58	1
H8C	6193	14091	610	58	1
H8A	814	11108	1651	32	1
H9S	2505	10324	1587	33	1
H10A	2250	11767	2259	32	1
H10B	2235	10534	2304	32	1

Atomo	x	y	z	U_{eq}	S.o.f
H11A	4431	11494	2822	30	1
H11B	5322	10372	2759	30	1
H12	6230	11108	2586	30	1
H13	7334	13145	2840	30	1
H14A	4783	13050	2397	30	1
H14B	6354	13538	2090	30	1
H15	7056	11776	1864	29	1
H16A	8973	11796	3278	32	1
H16B	6613	11911	3386	33	1
H17	6493	10036	3412	41	1
H18A	8906	9588	2944	97	1
H18B	9176	9031	3400	97	1
H18C	10446	10005	3278	97	1
H19A	9329	10894	3971	62	1
H19B	8110	9887	4073	62	1
H19C	7135	10899	4054	62	1
H20A	8824	7924	1207	37	1
H20B	6787	7434	1286	37	1
H23A	6670	8130	-151	38	1
H23B	8277	8423	-116	38	1
H24	6928	10107	-8	33	1
H25A	3773	9195	153	37	1
H25B	4152	10235	426	37	1
H26A	3994	8237	764	35	1
H26B	4300	9279	1039	35	1
H26A	8160	10638	1136	44	1
H26B	6103	10692	936	44	1
H28C	7811	11207	684	44	1
H29A	10368	10042	381	54	1
H29B	10159	8817	436	54	1
H29C	10517	9531	849	54	1

Tabela 6. Ligações de hidrogénio [Å e °].

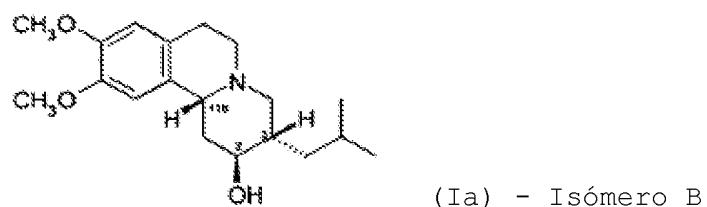
D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	$\angle(DHA)$	
N1-H98...O6	0.885(10)	1.895(12)	2.773(3)	171(3)
N1-H98...S1	0.885(10)	2.914(14)	3.771(2)	153(3)
O3-H98...O4 ⁱ	0.84(4)	1.94(4)	2.766(3)	165(3)
O3-H98...S1 ⁱ	0.84(4)	2.96(4)	3.811(2)	189(3)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms: (i) -x+2,y+1/2,-z+1/2



**Elipsóides térmicos desenhados ao nível
da probabilidade de 30%**

Com base nos dados atrais indicados, crê-se que o Isómero B tenha a configuração 2S, 3S, 11bR, que corresponde à Fórmula (Ia) :



EXEMPLO 5

Estudos sobre a Ligação das Proteínas Receptoras e
Transportadoras

Os quatro isómeros A, B, C e D foram submetidos a

ensaios específicos de ligação para se testar a capacidade de se ligarem às proteínas receptoras e transportadoras a seguir descritas. Os resultados estão indicados na Tabela 5.

(a) Receptor Adrenérgico α_{2A} :

Referência:	S. Uhlen et al. <i>J. Pharmacol. Exp. Ther.</i> , 271:1558-1565 (1994)
Fonte:	Células SF9 do inseto de recombinante humano
Ligando:	[³ H]MK-912 1 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	60 minutos @ 25°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 75 mM, pH 7,4, MgCl ₂ 12,5 mM, EDTA 2mM
Ligando não específico:	WB-4101 10 µM
K _d :	0,6 nM
B _{max} :	4,6 pmole/mg de proteína
Ligação específica:	95%
Método de quantificação:	Ligação por radioligando
Critérios de significância:	<u>></u> 50% de estimulação ou inibição máximas

(b) Receptor Adrenérgico α_{2B} :

Referência:	S. Uhlen et al. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> , 33(1):93-1-1 (1998)
Fonte:	Células CHO-K1 de recombinante

	humano
Ligando:	[³ H]Rauwolscina 2,5 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	60 minutos @ 25°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, EDTA 1mM, MgCl ₂ 12,5 mM, pH 7,4, BSA a 0,2% a 25°C
Ligando não específico:	Prazosina 10 µM
K _d :	2,1 nM
B _{max} :	2,1 pmole/mg de proteína
Ligaçao específica:	90%
Método de quantificação:	Ligaçao por radioligando
Critérios de significância:	<u>></u> 50% de estimulação ou inibição máximas

(c) Receptor de dopamina D₁:

Referência:	Dearry et al., <i>Nature</i> , 347:72-76 (1990)
Fonte:	Células CHO de recombinante humano
Ligando:	[³ H]SCH-23390 1,4 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	2 horas @ 37°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 nM, ácido ascórbico 1,4 nM, BSA a 0,001%
Ligando não específico:	(+)-butaclamol 10 µM
K _d :	1,4 nM

B _{max} :	0,63 pmole/mg de proteína
Ligaçao específica:	90%
Método de quantificação:	Ligaçao por radioligando
Critérios de significância:	<u>>50%</u> de estimulação ou inibição máximas

(d) Receptor de dopamina D_{2L}:

Referência:	Bunzo et al., <i>Nature</i> , 336:783-787 (1988)
Fonte:	Células CHO de recombinante humano
Ligando:	[³ H]Espiperona 0,16 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	2 horas @ 25°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, ácido ascórbico 1,4 nM, BSA a 0,001%
Ligando não específico:	Haloperidol 10 µM
K _d :	0,08 nM
B _{max} :	0,48 pmole/mg de proteína
Ligaçao específica:	85%
Método de quantificação:	Ligaçao por radioligando
Critérios de significância:	<u>>50%</u> de estimulação ou inibição máximas

(e) Receptor de dopamina D₃:

Referência:	Sokoloff et al., <i>Nature</i> ,
-------------	----------------------------------

347:146-151 (1990)

Fonte:	Células CHO de recombinante humano
Ligando:	[³ H]Espiperona 0,7 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	2 horas @ 37°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, ácido ascórbico 1,4 nM, BSA a 0,001%
Ligando não específico:	S(-)-Sulpiride 25 µM
K _d :	0,36 nM
B _{max} :	1,1 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	85%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	<u>></u> 50% de estimulação ou inibição máximas

(f) Receptor de imidazolina I₂ (Central) :

Referência:	Brown et al., <i>Brit. J. Pharmacol.</i> , 99:803-809 (1990)
Fonte:	Córtex cerebral de rato Wistar
Ligando:	[³ H]Idazoxana 2 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	30 minutos @ 25°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,4 a 25°C
Ligando não específico:	Idazoxano 1 µM
K _d :	4 nM

B _{max} :	0,14 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	85%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	<u>>50%</u> de estimulação ou inibição máximas

(g) Receptor de Sigma σ₁:

Referência:	Ganapathy et al., <i>Pharmacol. Exp. Ther.</i> , 289:251-260 (1999)
Fonte:	Células jurkat humanas
Ligando:	[³ H]Haloperidol 8 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	4 horas @ 25°C
Tampão de incubação:	Tampão de K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ 5mM pH 7,5
Ligando não específico:	Haloperidol 10 μM
K _d :	5,8 nM
B _{max} :	0,71 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	80%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	<u>>50%</u> de estimulação ou inibição máximas

(h) Receptor de Sigma σ₂:

Referência:	Hashimoto et al., <i>Eur. J. Pharmacol.</i> , 236:159-163, (1993)
Fonte:	Cérebro de rato Wistar
Ligando:	[³ H]Ifenprodil 3 nM

Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	60 minutos @ 37°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4
Ligando não específico:	Ifenprodil 10 µM
K _d :	4,8 nM
B _{max} :	1,3 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	85%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	>50% de estimulação ou inibição máximas

(i) Transportador de Serotonina (SERT):

Referência:	Gu et al., <i>J. Biol. Chem.</i> , 269(10):7124-7130 (1994)
Fonte:	Células HEK-293 de recombinante humano
Ligando:	[125I]RTI-55 0,15 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	3 horas @ 4°C
Tampão de incubação:	NaCl 100 mM, Tris HCl 50 mM, Leu-peptina 1 µM, PMSF 10 µM, pH 7,4
Ligando não específico:	Imipramina 10 µM
K _d :	0,17 nM
B _{max} :	0,41 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	95%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	>50% de estimulação ou inibição máximas

(j) Transportador de Dopamina (DAT):

Referência:	Giros <i>et al.</i> , <i>Trends Pharmacol. Sci.</i> , 14, 43-49 (1993)
	Gu <i>et al.</i> , <i>J. Biol. Chem.</i> , 269(10):7124-7130 (1994)
Fonte:	Células CHO de recombinante humano
Ligando:	[¹²⁵ I]RTI-55 0,15 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	3 horas @ 4°C
Tampão de incubação:	NaCl 100 mM, Tris HCl 50 mM, Leupeptina 1 µM, PMSF 10 µM, pH 7,4
Ligando não específico:	Nomifensina 10 µM
K _d :	0,58 nM
B _{max} :	0,047 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	90%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	<u>></u> 50% de estimulação ou inibição máximas

(k) Receptor adrenérgico α_{2c}

A actividade de ligação do receptor adrenérgico α_{2c} foi determinada usando o método de Uhlen *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* (1994), 271:1558-1565, e as seguintes condições:

Fonte:	Células Sf9 de insecto de recombinante humano
Ligando:	[³ H]MK-912 1 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	60 minutos @ 25°C
Tampão de incubação:	Tris HCl 75 mM, pH 7,4, MgCl ₂ 12,5 mM, EDTA 2mM
Ligando não específico:	WB-4101 10 µM
K _d :	0,17 nM
B _{max} :	6,8 pmole/mg de proteína
Ligaçao específica:	95%
Método de quantificação:	Ligaçao por radioligando
Critérios de significância:	<u>></u> 50% de estimulação ou inibição máximas

(1) Receptor de serotonina (5-hidroxitriptamina)**5-HT_{2b}**

A actividade de ligação do receptor 5-HT_{2b} foi determinada usando o método de Bonhaus *et al.*, *Br. J. Pharmacol.*, (1995), 115:622-628, e as seguintes condições:

Fonte:	Células CHO-K1 de recombinante humano
Ligando:	[³ H]dietilamida do ácido lisérgico (LSD) 1,2 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	60 minutos @ 37°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, CaCl ₂ 4

	mM, ácido ascórbico a 0,1%
Ligando não específico:	Serotonina 10 µM
K _d :	2,1 nM
B _{max} :	1,1 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	80%
Método de quantificação:	Ligaçāo por radioligando
Critérios de significância:	>50% de estimulação ou inibição máximas

(m) Receptor de serotonina (5-hidroxitriptamina)**5-HT₆**

A actividade de ligação do receptor 5-HT₆ foi determinada usando o método de Monsma et al., Mol. Pharmacol., (1993), 43:320-327, e as seguintes condições:

Fonte:	Células HeLa de recombinante humano
Ligando:	[³ H]dietilamida do ácido lisérgico (LSD) 1,5 nM
Veículo:	1% DMSO
Tempo de incubação/Temp:	2 horas @ 37°C
Tampão de incubação:	Tris-HCl 0 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, ácido ascórbico 2mM, BSA a 0,001%
Ligando não específico:	Serotonina 5 µM
K _d :	1,3 nM
B _{max} :	1,7 pmole/mg de proteína
Ligaçāo específica:	90%

Método de quantificação: Ligação por radioligando
 Critérios de significância: $\geq 50\%$ de estimulação ou inibição máximas

Tabela 5

Inibição percentual por Soluções de 10 μM de isómeros de Dihidrotetrabenazina de Ligação Específica às Proteínas Receptoras e Transportadoras (O valor de IC_{50} , quando medido, está entre parêntesis)				
Receptor/Proteína	Isómero A	Isómero B	Isómero C	Isómero D
(a) Receptor α_{2A}	86	12	13	87
(b) Receptor α_{2B}	44	14	-7	50
(c) Receptor D_1	78	1	6	38
(d) Receptor D_{2L}	87	16	-14	58
(e) Receptor D_3	69	7	9	63
(f) Receptor I_2	74	8	0	55
(g) Receptor σ_1	48	82	59	82
(h) Receptor σ_2	64	64	61	69
(i) SERT	19	86(0,35)	77(2,75)	8
(j) DAT	3	4	-2	2
(k) Receptor α_{2C}	56	-6	3	74
(l) Receptor 5-HT _{2b}	74	10	14	43
(m) Receptor 5-HT ₆	51	10	10	41

Com base nos dados de ligação para os Isómeros A e D para os receptores de dopamina e serotonina, e por analogia com os perfis de ligação a dopamina-serotonina dos

agentes antipsicóticos conhecidos, prevê-se que os Isómeros A e D sejam úteis no tratamento da psicose, por exemplo, da psicose resultante de ou associada a esquizofrenia.

EXEMPLO 6

Função cognitiva e antipsicóticos: Uma investigação sobre a eficácia do Isómero A para melhorar um défice cognitivo induzido por PCP sub-crónico na tarefa de reconhecimento de um objecto novo

Cognição na Esquizofrenia:

Na esquizofrenia a maior necessidade clínica ainda não satisfeita é o tratamento dos sintomas negativos e cognitivos porque até mesmo a última geração de medicamentos anti-psicóticos atípicos poucas melhorias oferece. Notavelmente, um défice cognitivo em pacientes com esquizofrenia é agora reconhecido como uma porção nuclear da perturbação e crê-se que tem um impacto significativo na recuperação do paciente e na sua reintegração na sociedade.

Houve algumas tentativas para modelar os distúrbios cognitivos na esquizofrenia, embora alguns dos mais recentes, e discutivelmente mais válidos, modelos animais exibam défices cognitivos. As abordagens clássicas usadas na produção de modelos animais para testar anti-psicóticos potenciais basearam-se no uso de medicamentos dopaminérgicos cujas limitações são cada vez mais reconhecidas. A

administração do antagonista de glutamato/NMDA fenilciclidina (PCP) tem sido considerado como fornecendo um melhor modelo de esquizofrenia pelo facto de poder induzir tanto os sintomas negativos como também os sintomas positivos associados à psicose das anfetaminas (J.D. Jentsch e R.H. Roth, *Neuropsychopharmacology* (1999) 20(3):201-225). Esta abordagem pode ter alguma validade patológica pelo facto de haver provas de anormalidades dos sistemas glutamatérgicos no cérebro na esquizofrenia; essas alterações incluem défices na inervação córtico-estriatal que podem contribuir para, se não estiverem subjacentes, a disfunção cognitiva na doença (Aparicio-Legarza et al., *Neurosci. Lett.* (1997) 232, 13-16). Além disso, alguns comportamentos induzidos por PCP são revertidos por certos anti-psicóticos atípicos, mas não típicos (Geyer et al., *Brain Res. Bull.* (1990) 25:485-498). Isto sugere uma potencial correlação com os efeitos sobre sintomas negativos ou outros que respondam menos bem aos medicamentos típicos.

O paradigma de reconhecimento de um novo objecto:

Certos testes pré-clínicos permitem a observação de défices cognitivos relativamente subtils no rato que se assemelham a sintomas cognitivos em sujeitos com esquizofrenia. Os défices cognitivos observados verificam-se em comportamentos tais como défices de memória de trabalho que podem ser medidos por tarefas de reconhecimento tais como o paradigma do reconhecimento de um novo objecto (NOR). Uma tarefa de reconhecimento por memória

permite a comparação entre o estímulo apresentado e a informação anteriormente armazenada. Ennaceur & Delacour, *Behav. Brain Res.* 31:47-59 (1988) descreveram o teste NOR em ratos que se baseava na exploração diferencial de objectos familiares e novos. O teste NOR é um paradigma etologicamente relevante, não recompensado, baseado no comportamento exploratório espontâneo de ratos que mede a memória de trabalho. Cada sessão consiste em dois ensaios. No primeiro ensaio, os ratos são expostos a dois objectos idênticos num campo aberto. Durante o segundo ensaio, os ratos são expostos a dois objectos dissimilares, um objecto familiar do primeiro ensaio e um novo objecto. O reconhecimento do objecto nos ratos pode ser medido como sendo a diferença do tempo que dispensam a explorar o objecto familiar e o novo objecto. Os ratos mostraram passar mais tempo a explorar o novo objecto. Descobriu-se que os ratos são capazes de discriminar entre o objecto familiar e o novo quando o intervalo entre ensaios está entre 1 minuto e 1-5 horas, mas não quando é superior a 24 horas. Embora este efeito possa depender do sexo no rato (Sutcliffe et al, *A preliminary investigation into the effects of gender on cognition in male and female rats using the novel object recognition paradigm*. Apresentado na 96^a Conferência da Society for Endocrinology, 7-9 de Novembro de 2005). A duração de cada ensaio também é importante porque a preferência pelo novo objecto só dura o(s) primeiro(s) 1 ou 2 minutos. Passado esse tempo, a preferência diminui porque ambos os objectos se tornam familiares e são explorados igualmente.

(Grayson e Neill, *J. Psychopharmacology* 18:A55, 2004; e *Proceedings of the BPS* em <http://www.pubs.bps.org.uk/journals/abstract/146407277.html>. 2005) demonstraram um défice selectivo nesta tarefa induzida pelo tratamento agudo e sub-crónico com PCP. O défice apenas é observado na fase de retenção da tarefa, sugerindo uma deficiência cognitiva específica e relativamente subtil. Assim, o comportamento na fase de aquisição do teste (e a actividade locomotora) não é afectado pelo tratamento com PCP. Os efeitos do PCP neste paradigma podem representar um défice selectivo na memória de trabalho que se sabe ser deficiente na esquizofrenia. O grupo de J.C. Neill na Universidade de Bradford, Reino Unido, descobriu que o medicamento anti-psicótico atípico clozapina, mas não o anti-psicótico clássico haloperidol, pode melhorar (e prevenir, Idris et al. *Soc. Neurosci. resumo* 67.15.2005) o défice cognitivo induzido por PCP sub-crónico (2 mg/kg ip duas vezes por dia durante 7 dias, seguindo-se um período de 7 dias sem medicamento) neste paradigma. Sabe-se que o haloperidol é ineficaz no tratamento dos sintomas de défice cognitivo na esquizofrenia e, em realidade, pode piorá-los enquanto que os anti-psicóticos atípicos podem melhorar certos aspectos de cognição na esquizofrenia. Além disso, Grayson et al., demonstraram recentemente a eficácia da risperidona para atenuar o défice sub-crónico induzido por PCP neste paradigma. Assim, este teste tem uma certa validade preditiva para o tratamento dos sintomas cognitivos da esquizofrenia. Demonstrou-se que o défice sub-crónico induzido por PCP era

robusto e duradouro em ratas, isto é, até 5 meses pós-tratamento.

Objecto da Experiência

O modelo de roedor atrás referido foi usado para avaliar os efeitos do Isómero A sobre os défices sub-crónicos induzidos por PCP na memória de trabalho usando o paradigma de reconhecimento de um novo objecto. A hipótese de trabalho era a de que o tratamento com Isómero A, tanto em fase aguda como sub-crónica, iria atenuar o défice da memória de trabalho selectiva induzido por PCP sub-crónico tal como é medido no paradigma do teste NOR. Neste paradigma usaram-se ratas porque anteriormente se descobrira que os machos eram menos sensíveis ao défice induzido por PCP (Grayson e Neill, *idem*) e que as fêmeas exibiam um desempenho mais robusto a seguir aos intervalos cada vez maiores entre ensaios, comparado com os ratos (Sutcliffe *et al.*, *idem*).

Métodos

O Paradigma de Reconhecimento de um Novo Objecto

Habituação

Permite-se que os ratos se habituem à caixa de teste vazia e ao ambiente comportamental da sala de teste durante 1 hora no dia 1. Antes do teste comportamental no dia 2 concede-se aos ratos mais 3 minutos de habituação.

Teste comportamental

A seguir ao período de habituação de 3 minutos os ratos são submetidos a dois ensaios de 3 minutos (T1 e T2), separados por um intervalo de 1 minuto entre ensaios, na gaiola de residência, durante o qual se trocam os objectos.

T1=Ensaio 1, o ensaio de aquisição

Neste ensaio, permite-se que os animais explorem dois objectos idênticos (A1 e A2) durante 3 minutos.

T2=Ensaio 2, o ensaio de retenção

Neste ensaio os animais exploram um objecto familiar (A), de T1, e um novo objecto (B), durante 3 minutos. O objecto familiar apresentado durante T2 é um duplicado do objecto apresentado em T1 para prevenir quaisquer rastos olfactivos.

Exploração do objecto

A exploração do objecto é definida pelo facto de os animais lamberem, cheirarem ou tocarem no objecto com as patas dianteiras enquanto cheiram, mas sem se encostarem, rodearem, se levantarem ou sentarem sobre o objecto. O(s) tempo(s) de exploração de cada objecto (A1, A2, A e B) em cada ensaio é/são registado(s) usando dois cronómetros e calculam-se os seguintes coeficientes:

- Tempo de exploração total de ambos os objectos no(s) ensaio(s) de aquisição.
- Tempo de exploração total de ambos os objectos no(s) ensaio(s) de retenção.
- Habituação da actividade exploratória. O LMA inclui o tempo de exploração, tal como é medido pelo número de linhas cruzadas, em ambos os ensaios.
- Índice de discriminação, que é calculado como a seguir indicado: (tempo dispendido a explorar o novo objecto - tempo dispendido a explorar o objecto familiar) ÷ tempo total dispendido na exploração dos objectos

O comportamento em todos os ensaios foi registado em vídeo para posterior classificação às cegas.

Sujeitos

Para estes estudos foram usadas, como sujeitos, 50 ratas de capuz Lister (Harlan, UK). As ratas foram alojadas em grupos de 5 sob condições laboratoriais standard sob um ciclo de 12 horas de luz:escuro, luzes acesas às 07.00 h. Todos os testes foram efectuados na fase de luz. Alimento e água foram fornecidos à vontade. Todas as experiências foram conduzidas de acordo com a Lei dos Processos Científicos com Animais, U.K., 1986, e foram

aprovados pelo painel de revisão de ética da Universidade de Bradford.

Medicamentos

As ratas foram aleatoriamente atribuídas a dois grupos de tratamento e foram tratadas com veículo, n=10 (água destilada, ip) ou PCP, n=40 (2 mg/kg, ip) duas vezes ao dia durante 7 dias. O hidrocloreto de fenilciclidina (PCP, Sigma, UK) foi dissolvido em água destilada. A isto seguiu-se um período de desintoxicação de 7 dias antes de se testarem as ratas. O Isómero A foi dissolvido em água destilada e administrado por via oral a doses de 3, 10 e 30 mg/kg, 30 minutos antes dos testes. A risperidona (0,2 mg/kg) foi preparada em água destilada e foi injectada i.p. 30 minutos antes dos testes. Todos os medicamentos foram administrados num volume de 1 ml/kg. Todas as doses de medicamento foram calculadas com base no peso equivalente.

Análise Estatística

Todos os dados estão expressos como média \pm d.m.p. (n=7-10 por grupo) e foram analisados por um ANOVA de dois sentidos (os factores são: medicamento e tempo de exploração dos dois objectos) com outra análise por meio de um teste t de estudante *post-hoc* (tempo dispendido a explorar os objectos) ou teste t de Dunnett (LMA e DI).

Tratamento com o medicamento

Os grupos de ratas (n=7-10) foram testados no paradigma de NOR como atrás descrito. As ratas foram testadas pela forma como desempenharam a tarefa a seguir ao tratamento sub-crónico com PCP (2 mg/kg, i.p. duas vezes por dia durante 7 dias, seguido por um período de 7 dias sem medicamento) ou veículo seguido por um tratamento agudo com Isómero A, risperidona ou veículo. As ratas foram aleatoriamente atribuídas aos grupos de tratamento com o medicamento e receberam veículo ou Isómero A (3,0, 10 e 30 mg/kg) p.o. 30 minutos antes dos testes comportamentais.

Resultados

Os resultados estão apresentados nas Figuras 1 a 4.

A Figura 1 ilustra o tempo de exploração médio de objectos idênticos na fase de aquisição T1, a seguir à administração aguda de Isómero A (3,0-30 mg/kg, p.o) e risperidona (Risp 0,2 mg/kg, i.p) em ratas tratadas com PCP sub-crónico (2 mg/kg, i.p duas vezes ao dia durante sete dias) e com veículo.

A Figura 2 ilustra a capacidade do Isómero A agudo (3-30 mg/kg, p.o.) e da risperidona (Risp 0,2 mg/kg, i.p.) para atenuar o efeito do PCP sub-crónico sobre o(s) tempo(s) de exploração de um objecto familiar e de um novo

objecto num ensaio de retenção de 3 minutos, em ratas hL. Diferença significativa entre o tempo dispendido a explorar o objecto familiar e o novo *P<0,05-***P<0,001.

A Figura 3 ilustra o efeito do Isómero A (3-30 mg/kg, p.o.) e da risperidona (Risp 0,2 mg/kg, i.p.) sobre o efeito do tratamento com PCP sub-crónico (2 mg/kg, i.p. dias vezes ao dia durante sete dias) no índice de discriminação (DI).

A Figura 4 ilustra o efeito da administração aguda (3-30 mg/kg, p.o.) do Isómero A e da risperidona (Risp 0,2 mg/kg, i.p.) em ratas tratadas sub-crónicamente com PCP, no número total de cruzamentos de linha na tarefa de reconhecimento do novo objecto (T1+T2). **p<0,01; redução significativa no número de cruzamentos de linha comparado com o grupo de controlo de veículo.

O PCP agudo (0,5 - 2,0 mg/kg i.p.) e o PCP sub-crónico (2 mg/kg i.p. duas vezes ao dia durante 7 dias seguido por um período de 7 dias sem medicamento) produzem um défice cognitivo selectivo na fase de retenção da tarefa NOR em ratas (Grayson e Neill, 2004; 2005a). O agente anti-psicótico atípico clozapina (1-5 mg/kg), mas não o haloperidol (0,05-0,075 mg/kg), melhorou significativamente (e preveniu, Idris et al, 2005) o défice induzido pelo PCP sub-crónico neste paradigma (Grayson e Neill, 2005a). Os presentes resultados adicionam-se a estes dados existentes e mostram que o Isómero A também tem eficácia a atenuar o

défice induzido por PCP sub-crónico de maneira similar ao anti-psicótico atípico, risperidona.

Os efeitos do tratamento agudo com Isómero A foram selectivos para a fase de retenção da tarefa NOR (Figura 2). Os seus efeitos são consistentes com a melhoria dos défices da memória de trabalho induzida por PCP num paradigma com alguma validade para a patologia da esquizofrenia. Este efeito foi significativo à dose mais elevada de Isómero (30 mg/kg). Por contraste, o Isómero A não teve efeito na exploração de dois objectos idênticos na fase de aquisição da tarefa, Figura 1. 30 mg/kg de Isómero A também tiveram um efeito significativo para reduzir a actividade locomotora na arena de teste, Figura 4. Isto foi demonstrado como uma redução no número de linhas cruzadas na arena do novo objecto em T1 e T2. A observação do comportamento das ratas sugeriu que passaram mais tempo a explorar o objecto do que o meio ambiente o que reduziu a pontuação da actividade total na caixa. Não pareciam estar sedadas. Os dados apresentados na Figura 3 mostram que o tratamento com PCP sub-crónico induziu uma redução do índice de discriminação e que este foi melhorado a seguir a 30 mg/kg de Isómero A e 0,2 mg/kg de risperidona: contudo, nenhum destes efeitos atingiu significância estatística.

Os resultados aqui indicados sugerem que o Isómero A pode ter certo valor terapêutico na melhoria dos sintomas do défice cognitivo da esquizofrenia.

EXEMPLO 7Composições Farmacêuticas(i) Formulação para Comprimidos - I

Uma composição para comprimidos contendo a dihidrotetrabenazina da invenção é preparada misturando 50 mg da di-hidrotetrabenazina com 197 mg de lactose (BP) como diluente e 3 mg de estearato de magnésio como lubrificante e prensada para formar um comprimido de maneira conhecida.

(ii) Formulação para Comprimidos - II

Uma composição para comprimidos contendo a dihidrotetrabenazina da invenção é preparada misturando o composto (25 mg) com óxido de ferro, lactose, estearato de magnésio, amido de milho branco e talco e prensada para formar um comprimido de maneira conhecida.

(iii) Formulação para Cápsulas

Uma composição para cápsulas é preparada misturando 100 mg da di-hidrotetrabenazina da invenção com 100 mg de lactose e enchendo cápsulas de gelatina dura opacas, standard, com a mistura resultante.

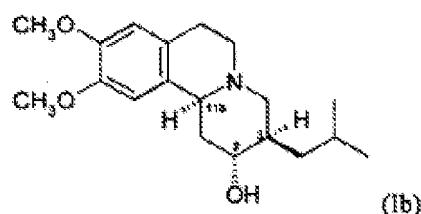
Equivalentes

É fácil verificar que podem ser efectuadas numerosas modificações e alterações aos modelos de realização específicos da invenção atrás descrita sem que se afastem dos princípios subjacentes à invenção. Pretende-se que todas essas modificações e alterações se enquadrem no âmbito deste pedido.

Lisboa, 31 de Dezembro de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina da fórmula (Ib) :



ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma para uso na profilaxia ou tratamento da psicose.

2. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o uso é a prevenção ou alívio de um episódio psicótico.

3. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que a psicose ou episódio psicótico resulta de ou está associado a esquizofrenia.

4. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina ou um sal farmaceuticamente aceitável da mesma, tal como está definida na reivindicação 1, para uso na profilaxia ou tratamento da esquizofrenia.

5. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que

os episódios psicóticos, psicoses ou sintomas prevenidos ou aliviados são seleccionados a partir de:

- delírios;
- alucinações;
- alucinações visuais;
- alucinações auditivas;
- alucinações envolvendo sensações tácteis, sabores ou odores;
- confusão;
- distúrbios emocionais, comportamentais ou intelectuais;
- perda de contacto com a realidade;
- padrões de raciocínio ilógico e/ou desorganizado;
- crenças paranóicas ou delirantes;
- paranóia;
- delírios de grandeza;

- delírios persecutórios ou de auto-culpabilização;

e

- alterações da personalidade.

6. Uma 3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que os episódios psicóticos, psicoses ou sintomas prevenidos ou aliviados são seleccionados a partir dos que resultam de ou estão associados a:

- psicose provocada por ou associada a esquizofrenia;

- psicose provocada por ou associada a perturbação bipolar (doença maníaco-depressiva);

- psicose provocada por ou associada a depressão clínica grave;

- psicose induzida por perturbações e condições tais como:

- distúrbios electrolíticos;

- infecções do tracto urinário nos idosos;

- síndromes de dor;

- toxicidade medicamentosa;

- interrupção da toma de drogas; e
- infecções ou danos no cérebro;
- psicose provocada por stress psicológico crónico (psicose reactiva breve);
- psicose despoletada ou exacerbada por stress mental grave; e
- psicose despoletada por, ou resultante de, ou no seguimento de doença e de condições tais como SIDA, lepra, malária e papeira.

7. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com a reivindicação 4, em que o uso é o alívio ou redução de um ou mais sintomas de esquizofrenia.

8. Uma 3,11b-*cis*-di-hidrotetrabenazina para uso de acordo com a reivindicação 4, em que o uso é a prevenção, alívio ou redução de um ou mais sintomas seleccionados a partir de:

- delírios;
- alucinações;
- confusão;

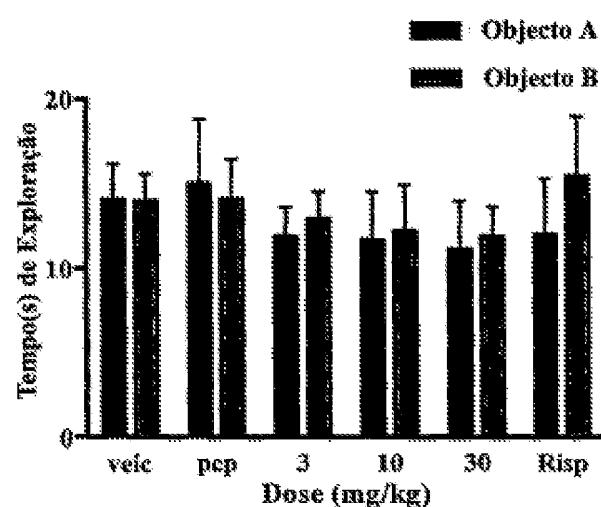
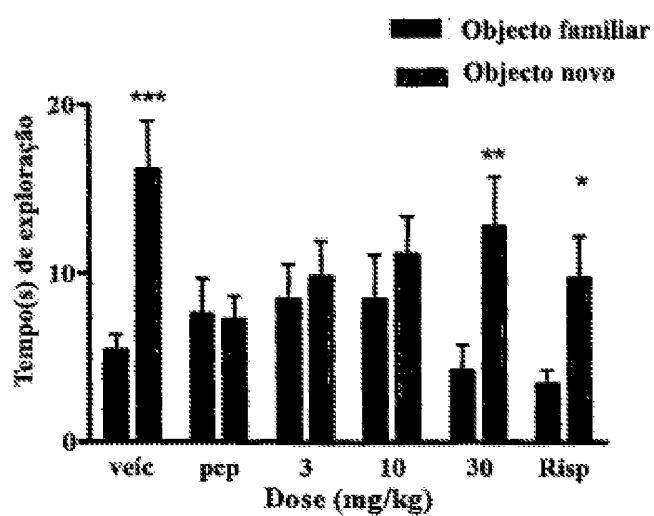
- distúrbios emocionais, comportamentais ou intelectuais;
- perda de contacto com a realidade; e
- padrões de raciocínio ilógico.

9. A *3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina* para uso de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a *3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina* está na forma de um sal de adição de ácido.

10. A *3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina* para uso de acordo com a reivindicação 9, em que o sal é um sal metanossulfonato.

11. A *3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina* para uso de acordo com a reivindicação 1, em que o uso é a melhoria dos sintomas de défice cognitivo da esquizofrenia.

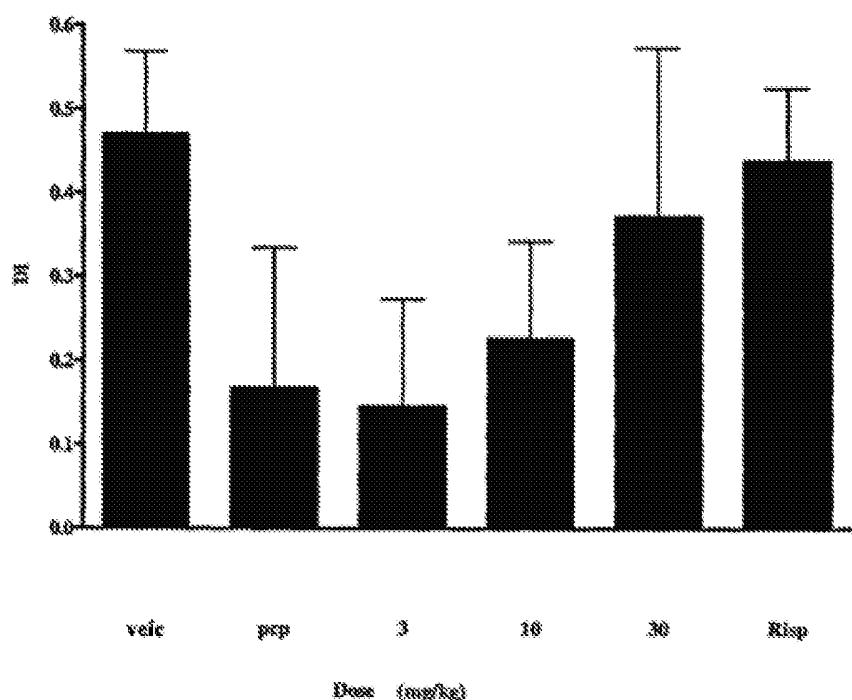
12. O uso de uma *3,11b-cis-di-hidrotetrabenazina* da fórmula (Ib), tal como está definida em qualquer uma das reivindicações 1, 9 e 10, para o fabrico de um medicamento para um uso terapêutico tal como está definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 8 e 11.

FIGURA 1**FIGURA 2**

PE1855677

2/3

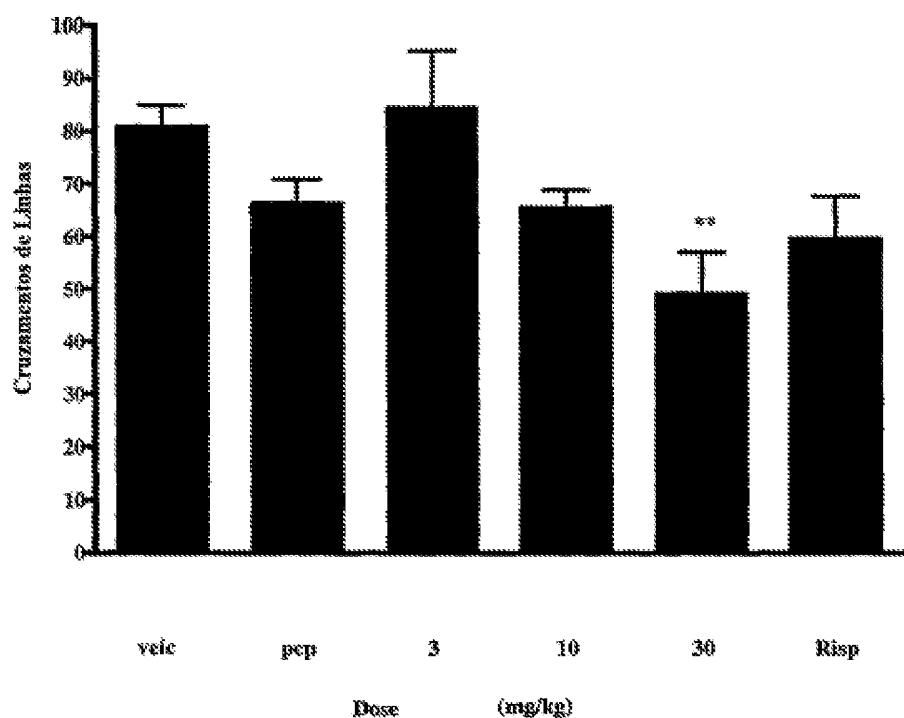
FIGURA 3



PE1855677

3/3

FIGURA 4



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- GB 200500464 W
- US 2843591 A, Hoffmann-La Roche
- US 2830893 A, Hoffmann-La Roche

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- A. E. HENSIER ; M. R. TRIMBLE. *J Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2002, vol. 72, 281-286
- H. Y. MELTZER. *J. Clin. Psychopharmacol.*, February 1995, vol. 15 (1 Suppl 1), 2S-3S
- M. HUTTUNEN. *J. Clin. Psychopharmacol.*, February 1995, vol. 15 (1 Suppl 1), 4S-10S
- * JANKOVIC et al. *Am. J Psychiatry*, August 1999, vol. 156 (8), 1279-81
- * JANKOVIC et al. *Neurology*, February 1997, vol. 48 (2), 558-62
- * JERRY MARCH. *Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, 1982, 109-114
- * MEHVAR et al. *Drug Metab Disp*, 1987, vol. 15, 250-255 [8927]
- * *J Pharm. Sci.* 1987, vol. 76 (6), 461-465
- * KILBOURN et al. *Chirality*, 1997, vol. 9, 59-62
- * BROSSI et al. *Helv. Chim. Acta*, 1958, vol. XLI (1958), 1793-1806
- * KILBOURN et al. *Eur. J Pharmacol.*, 1995, vol. 278, 249-252
- * *Med. Chem. Res.*, 1994, vol. 5, 113-126
- * *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*. August 2002, 288
- * Remington's *Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Company
- * DUISenberg, A.J.M. *J Appl. Cryst.*, 1992, vol. 25, 92-96
- * Z. OTWINOWSKI ; W. MINOR. *Methods in Enzymology. Macromolecular Crystallography part A*, 1997, vol. 278, 307-325
- * G. M. SHELDICK. *Acta Cryst.*, 1990, vol. A46, 467-473
- * D. M. WATKIN ; L. PEARCE ; C. K. PROUT. *Chemical Crystallography Laboratory*, 1993
- * S. UHLEN et al. *J Pharmacol Exp Ther.*, 1994, vol. 271, 1558-1565
- * S. UHLEN et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 1998, vol. 33 (1), 93-11
- * DEARRY et al. *Nature*, 1993, vol. 347, 72-73
- * BUNZO et al. *Nature*, 1993, vol. 368, 783-787 [9171]
- * SOKOLOFF et al. *Nature*, 1990, vol. 347, 148-151
- * BROWN et al. *Br. J Pharmacol.*, 1990, vol. 99, 803-809
- * GANAPATHY et al. *Pharmacol. Exp. Ther.*, 1999, vol. 289, 251-260
- * HASHIMOTO et al. *Eur. J Pharmacol.*, 1993, vol. 236, 159-163
- * GU et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269 (10), 7124-7130
- * GIROS et al. *Trends Pharmacol. Sci.*, 1993, vol. 14, 43-48
- * GU et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 7124-7130
- * UHLEN et al. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1994, vol. 271, 1558-1565
- * SONHAUS et al. *Br. J Pharmacol.*, 1995, vol. 115, 622-626
- * MONSMA et al. *Mol. Pharmacol.*, 1993, vol. 43, 320-327
- * J. D. JENTSCH ; R. H. ROTH. *Neuropharmacology*, 1999, vol. 20 (3), 201-225
- * APARICIO-LEGARZA et al. *Neurosci Lett.*, 1997, vol. 232, 13-16
- * GEYER et al. *Brain Res. Bull.*, 1990, vol. 25, 485-498
- * ENNACEUR ; DELACOUR. *Behav. Brain Res.*, 1988, vol. 31, 47-59
- * SUTCLIFFE et al. A preliminary investigation into the effects of gender on cognition in male and female rats using the novel object recognition paradigm. Presented at the 36th meeting of the Society for Endocrinology, 07 November 2005
- * GRAYSON ; NEILL. *J. Psychopharmacology*, 2004, vol. 18, A55. <http://www.wiley.com/online/olm/12issues4-abs077F.html>
- * IDRIS et al. *Soc. Neurosci. abstr.*, 2005, vol. 31, 15