

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 220**

51 Int. Cl.:

**C07D 471/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2007 E 07864160 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2013 EP 2081929**

54 Título: **Compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos y métodos relacionados con los mismos**

30 Prioridad:

**08.11.2006 US 864944 P**

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

**29.04.2013**

73 Titular/es:

**NEUROCRINE BIOSCIENCES, INC. (100.0%)  
12790 EL CAMINO REAL  
SAN DIEGO, CA 92130, US**

72 Inventor/es:

**GANO, KYLE, W.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 402 220 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos y métodos relacionados con los mismos.

## Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere en general a compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos y a su preparación. Se dan a conocer también métodos de tratamiento de trastornos mediante la administración de dichos compuestos a un animal de sangre caliente necesitado de ello.

## Antecedentes de la invención

- 10 La 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ona, también conocida como tetrabenacina (TBZ), se ha usado como fármaco durante décadas. La tetrabenacina es un potente inhibidor reversible de la captación de catecolamina por el transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2) ( $CI_{50}$ = 3,2 nM) (Scherman, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1983) 80: 584-8) y se usa actualmente en el tratamiento de diversos trastornos del movimiento hiperkinéticos. Los efectos secundarios asociados a la TBZ incluyen sedación, depresión, acatisia y parkinsonismo. La inhibición del VMAT2 por TBZ da como resultado el agotamiento de las monoaminas cerebrales *in vivo* (Pettibone, D.J. *et al.*, Eur. J. Pharmacol. (1984) 102: 431-6). La TBZ inhibe también los receptores de dopamina presinápticos y postsinápticos en cerebro de rata (Login, I.S., *et al.*, (1982) Ann. Neurology 12: 257-62; Reches, *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. (1983) 225: 515-521). Esta actividad fuera de objetivo de la TBZ puede ser la responsable de algunos de los efectos secundarios observados.

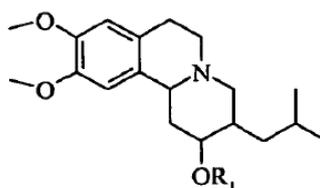
- 20 La TBZ, que contiene dos centros quirales y es una mezcla racémica de dos estereoisómeros, se metaboliza rápida y extensamente *in vivo* a su forma reducida, 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol, también conocida como dihidrotetrabenacina (HTBZ). La HTBZ se cree que existe en forma de cuatro isómeros individuales: ( $\pm$ )  $\alpha$ -HTBZ y ( $\pm$ )  $\beta$ -HTBZ. Se cree que 2R,3R,11bR o (+)  $\alpha$ -HTBZ es la configuración absoluta del metabolito activo (Chirality 1997 9: 59-62). A pesar de su éxito en el tratamiento de trastorno hiperkinéticos, la tetrabenacina tiene una biodisponibilidad bastante baja y variable. La administración de tetrabenacina a seres humanos está complicada por un extenso metabolismo de primer paso y se observa poca o ninguna tetrabenacina en la orina.

- 30 Existe la necesidad en la materia de análogos de tetrabenacina que proporcionen las propiedades ventajosas de la tetrabenacina sin exponer al cuerpo a todos los estereoisómeros de la dihidrotetrabenacina. Existe también la necesidad de análogos de tetrabenacina que exhiban una semivida más larga que la tetrabenacina. Existe igualmente la necesidad en la materia de análogos de tetrabenacina que exhiban una mayor selectividad por VMAT2 que la tetrabenacina. La presente invención proporciona un análogo de tetrabenacina que expone el cuerpo a un único estereoisómero de dihidrotetrabenacina, exhibe una mayor selectividad por VMAT2 que la tetrabenacina, exhibe una semivida más larga que la tetrabenacina y puede exhibir una menor variabilidad en la dosis requerida de paciente a paciente.

- 35 A. Brossi *et al.*, Helvetica Chimica Acta 1958, vol. 41, nº 4, páginas 1793 a 1806, describen la síntesis de 2-hidroxihidrobenzo[a]quinolizinas; M. Kilbourn *et al.*, Chirality 1997, vol. 9, nº 1, páginas 59 a 62, dan a conocer la síntesis de derivados de tetrabenacina y dihidrotetrabenacina y la separación de los enantiómeros mediante cromatografía líquida en columna quiral; G. Aranda *et al.*, European Journal of Medicinal Chemistry, vol. 25, 1990, páginas 369 a 374, describen la síntesis de un derivado yodado de tetrabenacina.

## Breve compendio de la invención

- 40 Brevemente, esta invención está dirigida en general a compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos, a enantiómeros individuales de los mismos, así como a métodos para su preparación y uso, y a composiciones farmacéuticas que contienen los mismos. Más específicamente, los compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos de esta invención tienen la siguiente estructura general (I):



(I)

incluyendo estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y solvatos de los mismos, en la que R<sub>1</sub> es como se define a continuación.

5 Los compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos de esta invención tienen utilidad en un amplio intervalo de aplicaciones terapéuticas, y pueden usarse para tratar una variedad de trastornos incluyendo la familia de trastornos de movimiento hiperkinéticos. Adicionalmente, estos compuestos pueden probarse útiles en el tratamiento de otros estados patológicos o afecciones que están asociados a la inhibición del transportador de monoamina vesicular 2 (VMAT2).

10 Los métodos dados a conocer incluyen administrar una cantidad eficaz de un 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituido, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica, a un mamífero necesitado de ello. Por tanto, en otra realización preferida, se dan a conocer composiciones farmacéuticas que contienen uno o más compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos de esta invención en combinación con un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 Estos y otros aspectos de la invención resultarán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada. Con este fin, se exponen diversas referencias en la presente memoria que describen con más detalle cierta información, procedimientos, compuestos y/o composiciones de los antecedentes.

El problema de la presente invención se resuelve basándose en las reivindicaciones 1 a 12.

### Breve descripción de las figuras

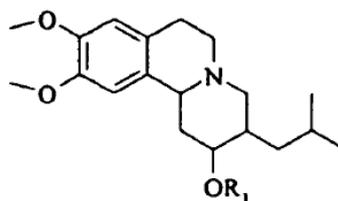
20 Las Figuras 1a, 1b y 1c comprenden tres gráficas que muestran la conversión de tetrabenacina, compuesto 2-1 y compuesto 3-1 en sus metabolitos respectivos en hepatocitos humanos.

Las Figuras 2a-2f comprenden seis gráficas que muestran el perfil de estabilidad de los compuestos 3-1 y 2-1 en microsomas hepáticos de rata, perro y ser humano.

Las Figuras 3a-3d comprenden cuatro gráficas que muestran las propiedades farmacocinéticas de los compuestos 2-1 y 3-1 en perros y ratas y de 1d.1 en rata.

### 25 Descripción detallada de la invención

Como se menciona anteriormente, la presente invención está dirigida en general a compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos. Los compuestos de esta invención tienen la siguiente estructura (I):



(I)

30 y los estereoisómeros, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos de los mismos,

en la que R<sub>1</sub> es -C(=O)-O-alquilo; o

35 en la que R<sub>1</sub> es -C(=O)-alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub>, y en la que dicho alcanodiilo C<sub>1-6</sub> es -CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-, -CHCH<sub>2</sub>[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]- o -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- y está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de -NH-C(=NH)NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>Me, -SH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SCH<sub>3</sub>, fenilo, -OH, 4-hidroxifenilo, imidazolilo e indolilo.

Como se usa en la presente memoria, los términos anteriores tienen el siguiente significado:

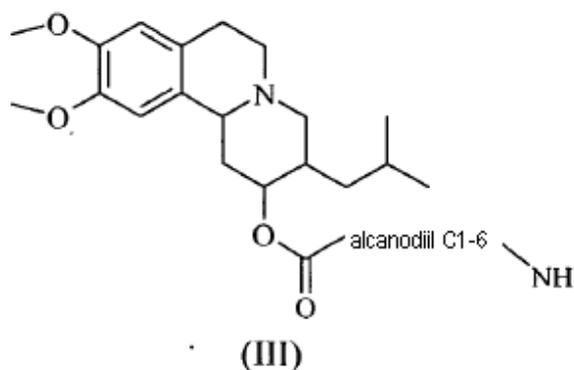
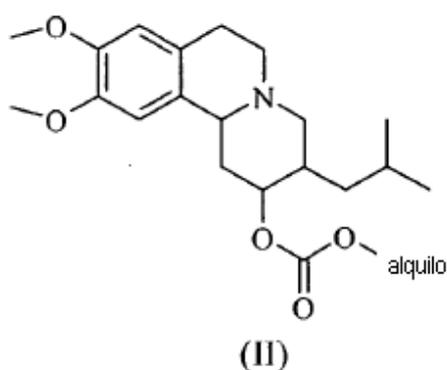
40 "Alquilo" significa un hidrocarburo alifático de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, insaturado o saturado que contiene de 1 a 10 átomos de carbono, mientras que el término "alquilo C<sub>1-4</sub>" tiene el mismo significado que alquilo pero contiene de 1 a 4 átomos de carbono. "Alquilo C<sub>1-6</sub>" tiene el mismo significado que alquilo pero contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, *tert*-butilo, isopentilo y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, -CH<sub>2</sub>-ciclopropilo, -CH<sub>2</sub>-ciclobutilo, -CH<sub>2</sub>-ciclopentilo, -CH<sub>2</sub>-ciclohexilo; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo. Los alquilos cíclicos

- 5 incluyen anillos di- y polihomocíclicos tales como decalina y adamantilo. Los alquilo insaturados contienen al menos un doble o triple enlace entre átomos de carbono adyacentes (referidos como "alqueno" o "alquino", respectivamente). Los alquenos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen etileno, propileno, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo; mientras que los alquinos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen acetileno, propino, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo y 3-metil-1-butenilo.

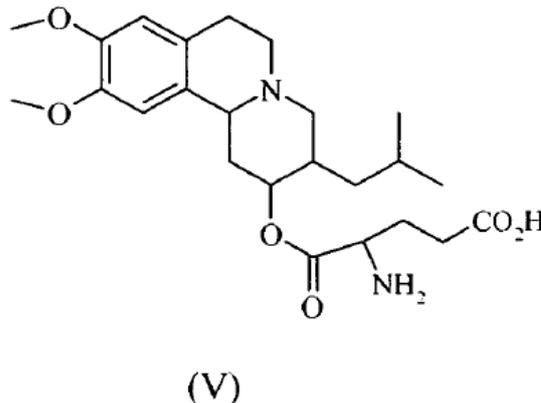
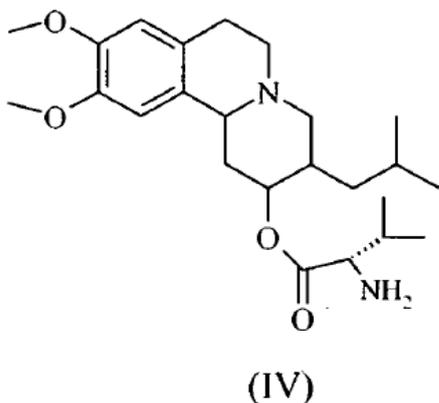
"Alcanodiilo C<sub>1-6</sub>" significa un alquilo C<sub>1-6</sub> divalente del que se toman dos átomos de hidrógeno del mismo átomo de carbono o de átomos de carbono diferentes, tal como -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- o -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-.

- 10 "Residuo aminoacídico" significa una estructura aminoacídica que carece del hidroxilo del grupo α-carboxilo. Por ejemplo, el residuo de alanina es -C(=O)-CH(NH<sub>2</sub>)CH<sub>3</sub>.

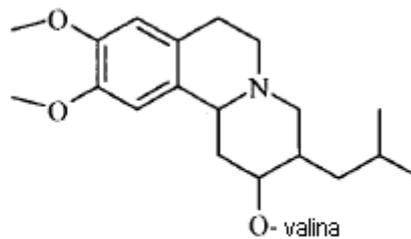
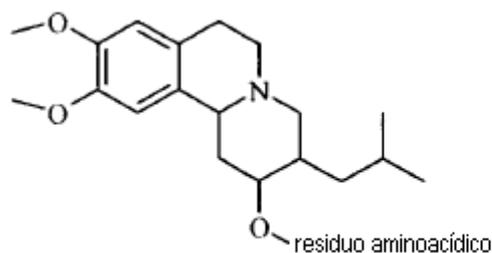
En una realización, R<sub>1</sub> de la estructura (I) es -C(=O)O-alquilo como se muestra en la estructura (II) y, en otra realización, R<sub>1</sub> de la estructura (I) es -C(=O)-alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub> como se muestra en la estructura (III).



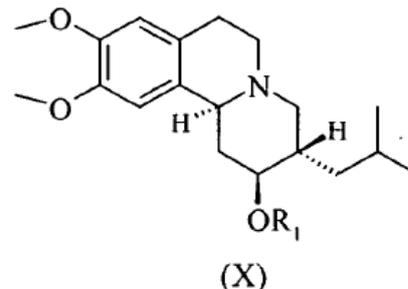
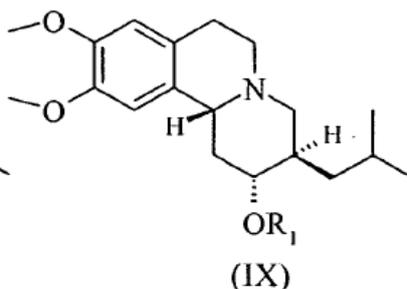
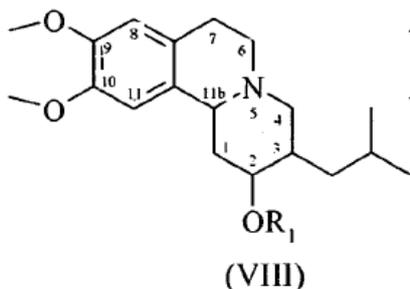
- 15 En una realización, el -alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub> de la estructura (III) es (S)-1-amino-2-metilpropan-1-ilo como se muestra en la estructura (IV). La estructura (V) muestra una realización de la estructura (I) en la que R<sub>1</sub> es -C(=O)-alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub> y el alcanodiilo C<sub>1-6</sub> está sustituido con -COOH.



- 20 En realizaciones adicionales, R<sub>1</sub> de la estructura (I) es un residuo aminoacídico como se muestra en la estructura (VI). La estructura (VII) muestra una realización de estructura (VI) en la que el residuo aminoacídico es valina.

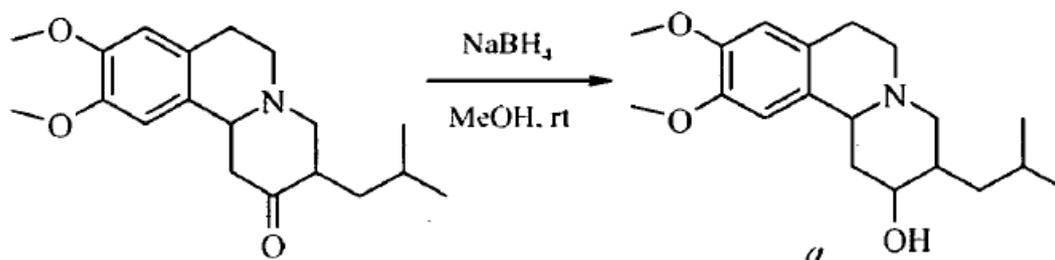


5 En una realización, los compuestos de la presente invención pueden existir en forma de mezcla racémica, de par diastereoisomérico o como un enantiómero individual o mezcla de enantiómeros. La estructura (VIII) muestra la numeración de anillo para los compuestos de 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol sustituidos de la invención. Los estereocentros están localizados en las posiciones 2, 3 y 11b del sistema de anillo. Los compuestos de la presente invención incluyen la configuración 2*R*,3*R*,11b*R* así como 2*R*,3*R*,11b*S*, 2*R*,3*S*,11b*R*, 2*S*,3*R*,11b*R*, 2*R*,3*S*,11b*S*, 2*S*,3*R*,11b*S*, 2*S*,3*S*,11b*R* y 2*S*,3*S*,11b*S*. Los enantiómeros 2*R*,3*R*,11b*R* y 2*S*,3*S*,11b*S* se muestran en las estructuras (IX) y (X), respectivamente.



10 Los compuestos de la presente invención pueden prepararse mediante técnicas de síntesis orgánica conocidas, incluyendo los métodos descritos con más detalle en los ejemplos. En general, los compuestos de estructura (I) anterior pueden prepararse mediante los siguientes esquemas de reacción, en los que todos los sustituyentes son como se definen anteriormente a menos que se indique otra cosa.

Esquema de reacción 1

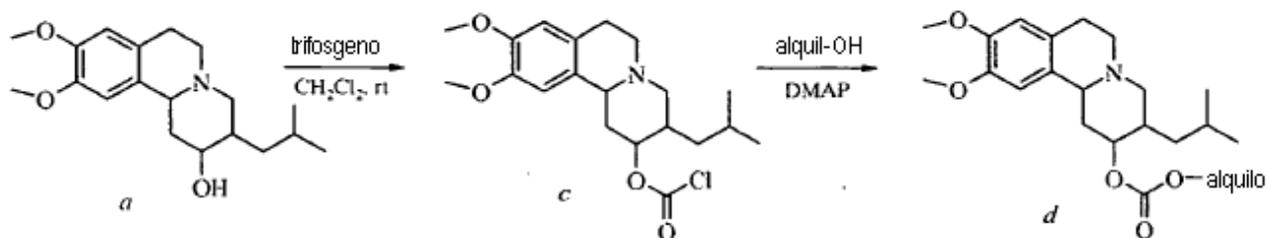


15 La reducción de una mezcla racémica de *R,R*- y *S,S*-tetrabenacina con un agente reductor borohidruro da la dihidrotetrabenacina *a*. Cuando el agente reductor es tri-*sec*-butilborohidruro de litio (*L*-selectrida), se generan predominantemente los isómeros 2*S*,3*R*,11b*R* y 2*R*,3*S*,11b*S*. El uso de borohidruro de sodio da como resultado una mezcla de los 4 estereoisómeros. Los estereoisómeros restantes pueden sintetizarse tomando cualquier o todos los estereoisómeros anteriormente generados y haciéndolos reaccionar con un agente deshidratante tal como pentacloruro de fósforo, formando un compuesto insaturado que se rehidrata estereoselectivamente entonces, por ejemplo, mediante un procedimiento de hidroboreación usando borano-THF, formando un complejo de borano que se oxida a la dihidrotetrabenacina apropiada con peróxido de hidrógeno (Clarke *et al.*, WO2005077946). Los productos racémicos pueden separarse adicionalmente mediante cromatografía quiral en los enantiómeros individuales mediante cromatografía quiral.

20

25

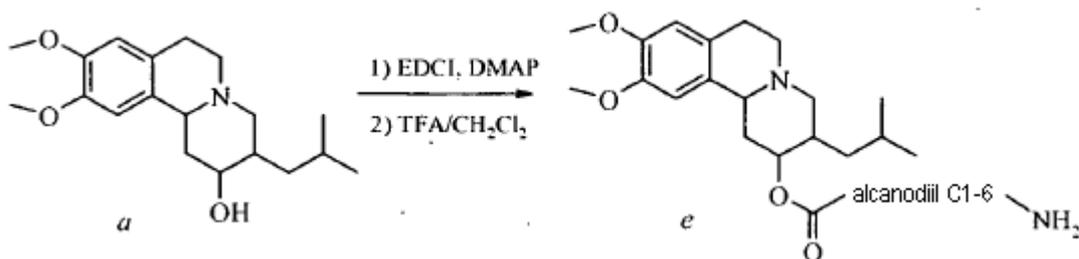
## Esquema de reacción 2



El intermedio cloroformiato *c* puede generarse tratando *a* con fosgeno o trifosgeno. El tratamiento de *c* con un alcohol en presencia de una base tal como DMAP genera el producto carbonato *d*. Como alternativa, el carbonato *d* puede generarse directamente tratando el alcohol *a* con un pirocarbonato con catálisis por DMAP.

5

## Esquema de reacción 3



Se condensa la dihidrotetrabenacina *a* con un aminoácido protegido con BOC usando hidrocloreuro de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDCI) y dimetilaminopiridina (DMAP) en dimetilformamida y cloruro de metileno, seguido de desprotección de la funcionalidad BOC, por ejemplo, con una disolución de ácido trifluoroacético/cloruro de metileno 50/50, dando *e*. Como alternativa, la dihidrotetrabenacina *a* puede condensarse con un aminoácido protegido con CBZ usando DCC (1,3-diciclohexilcarbodiimida) seguido de desprotección de la funcionalidad CBZ mediante hidrogenación en condiciones apropiadas.

10

15

20

Los compuestos de la presente invención exhiben una mayor selectividad por VMAT2 que la tetrabenacina. Como resultado, pueden proporcionar las propiedades deseables de la tetrabenacina sin todos los efectos secundarios indeseables. Además, como se muestra en las Figuras 3a-3d, ciertos compuestos de esta invención tales como, por ejemplo, el compuesto **2-1**, proporcionan inesperadamente una mayor duración de acción que la tetrabenacina. Esto puede ser particularmente beneficioso porque puede permitir un régimen de administración que requiera menos dosis por día que la tetrabenacina. Por ejemplo, aunque la tetrabenacina se administra típicamente 2-3 veces al día, ciertos compuestos de esta invención tales como, por ejemplo, el compuesto **2-1**, pueden ser terapéuticamente eficaces cuando se administran solo una vez al día. Por tanto, debido a la duración de acción inesperadamente más larga procurada por estos compuestos, puede ser alcanzable una dosificación de una vez al día.

Los compuestos de la presente invención incluyen los siguientes ésteres:

25

Éster 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico.

Los compuestos de la presente invención incluyen los siguientes carbonatos:

Éster etílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

Éster butílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

30

Éster pentílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

Éster isobutílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

35

Éster *sec*-butílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

Éster 3-metilbutílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico;

Éster *terc*-butílico y 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2*H*-pirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico.

5 Los compuestos de la presente invención pueden utilizarse generalmente como ácido libre o base libre. Como alternativa, los compuestos de esta invención pueden usarse en forma de sales de adición de ácido o base. Las sales de adición de ácido de los compuestos de amino libre de la presente invención pueden prepararse mediante métodos bien conocidos en la materia, y pueden formarse a partir de ácidos orgánicos e inorgánicos. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos maleico, fumárico, benzoico, ascórbico, succínico, metanosulfónico, acético, 10 trifluoroacético, oxálico, propiónico, tartárico, salicílico, cítrico, glucónico, láctico, mandélico, cinámico, aspártico, esteárico, palmítico, glicólico, glutámico y bencenosulfónico. Los ácidos inorgánicos adecuados incluyen ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, fosfórico y nítrico. Las sales de adición de base incluían aquellas sales que se forman con el anión carboxilato e incluyen sales formadas con cationes orgánicos e inorgánicos tales como aquellos elegidos de los metales alcalinos y alcalinotérreos (por ejemplo, litio, sodio, potasio, magnesio, bario y calcio), así 15 como el ión amonio y derivados sustituidos del mismo (por ejemplo, dibencilamonio, bencilamonio, 2-hidroxietilamonio). Por tanto, el término "sal farmacéuticamente aceptable" de la estructura (I) se pretende que englobe todas y cada una de las formas de sal aceptables.

Con respecto a los estereoisómeros, los compuestos de estructura (I) pueden tener centros quirales y pueden aparecer como racematos, mezclas racémicas y como enantiómeros o diastereómeros individuales. Todas dichas 20 formas isoméricas se incluyen en la presente invención, incluyendo las mezclas de las mismas. Además, algunas de las formas cristalinas de los compuestos de estructura (I) pueden existir como polimorfos, que se incluyen en la presente invención. Además, algunos de los compuestos de la estructura (I) pueden formar también solvatos con agua u otros disolventes orgánicos. Dichos solvatos se incluyen de forma similar dentro del alcance de la invención.

Como se menciona anteriormente, los compuestos de esta invención y sus sales pueden reducir el suministro de monoaminas al sistema nervioso central al inhibir el transportador de monoamina humano de isoforma 2 (VMAT2). Como tales, estos compuestos y sus sales pueden tener utilidad en un amplio intervalo de aplicaciones terapéuticas, 25 y pueden usarse para tratar una variedad de trastornos que están causados por o ligados a la inhibición del transportador de monoamina humano de isoforma 2. Estos trastornos incluyen trastornos hiperkinéticos.

En una realización, las afecciones que pueden tratarse por compuestos de la presente invención incluyen el tratamiento de trastornos hiperkinéticos tales como enfermedad de Huntington, discinesia tardía, síndrome de 30 Tourette y tics.

En otra realización de la invención, los compuestos de esta invención y sus sales pueden hidrolizarse en el cuerpo de un mamífero hasta compuestos que pueden inhibir el transportador de monoamina humano de isoforma 2. Como tales, estos compuestos y sus sales pueden tener utilidad adicional en la alteración de las propiedades *in vivo* del 35 metabolito en un mamífero, tales como la concentración máxima o la duración de acción.

En otra realización de la invención, se dan a conocer composiciones farmacéuticas que contienen una o más inhibidores de la recaptación de monoamina. Con los fines de la administración, los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un inhibidor de la recaptación de monoamina de la presente invención y un portador y/o 40 diluyente farmacéuticamente aceptable. El inhibidor de VMAT2 está presente en la composición en una cantidad que es eficaz para tratar un trastorno particular, es decir, en una cantidad suficiente para reducir el suministro de monoaminas al sistema nervioso central, y preferiblemente con una toxicidad aceptable para el paciente. Las concentraciones y dosificaciones apropiadas pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia.

Los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables son familiares para los expertos en la materia. Para composiciones formuladas como disoluciones líquidas, los portadores y/o diluyentes aceptables incluyen disolución 45 salina y agua estéril, y pueden incluir opcionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y otros aditivos comunes. Las composiciones pueden formularse también como píldoras, cápsulas, gránulos o comprimidos que comprenden, además de un inhibidor de VMAT2, diluyentes, agentes dispersantes y tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. Un experto en la materia puede formular adicionalmente el inhibidor de VMAT2 de manera apropiada, y de acuerdo con las prácticas aceptadas, tales como las dadas a conocer en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 50 Gennaro, Ed., Mark Publishing Co., Easton, PA 1990.

Se da a conocer también un método para tratar trastornos del sistema nervioso central o periférico. Dichos métodos incluyen administrar un compuesto de la presente invención a un animal de sangre caliente en una cantidad suficiente para tratar la afección. En este contexto, "tratar" incluye administración profiláctica. Dichos métodos 55 incluyen la administración sistémica de un inhibidor de VMAT2 de esta invención, preferiblemente en forma de una composición farmacéutica como se discute anteriormente. Como se usa en la presente memoria, la administración sistémica incluye los métodos de administración oral y parenteral. Para administración oral, las composiciones farmacéuticas útiles incluyen polvos, gránulos, píldoras, comprimidos y cápsulas, así como líquidos, jarabes,

- 5 suspensiones y emulsiones. Estas composiciones pueden incluir también aromatizantes, conservantes, agentes de suspensión, espesantes y emulsionantes y otros aditivos farmacéuticamente aceptables. Para administración parenteral, los compuestos de la presente invención pueden prepararse en disoluciones acuosas de inyección que pueden contener, además del inhibidor de VMAT2, tampones, antioxidantes, bacteriostáticos y otros aditivos empleados comúnmente en dichas disoluciones.

### Ejemplos

Métodos de HPLC para analizar las muestras

Tiempo de retención,  $t_R$ , en minutos

#### Método analítico de HPLC-EM 1

- 10 Plataforma: Agilent 1100 Series: equipada con un automuestreador, un detector de UV (220 nm y 254 nm) y un detector de EM (IQPA);

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

gradiente de HPLC: 1,0 ml/minuto, de 10% de acetonitrilo en agua a 90% de acetonitrilo en agua en 2,5 minutos, manteniendo a 90% durante 1 minuto. Tanto acetonitrilo como agua tienen un 0,025% de TFA.

- 15 Método analítico de HPLC-EM 2

Plataforma: Agilent 1100 Series: equipada con un automuestreador, un detector de UV (220 nm y 254 nm) y un detector de EM (IQPA);

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

- 20 gradiente de HPLC: 1,0 ml/minuto, de 5% de acetonitrilo en agua a 95% de acetonitrilo en agua en 13,5 minutos, manteniendo a 95% durante 2 minutos. Tanto acetonitrilo como agua tienen un 0,025% de TFA.

#### Método analítico de HPLC 3

Plataforma: automuestreador Gilson 215, columna Dionex Thermostatted Column Compartment TCC-100 mantenida a 30°C, detector de fila de diodos Dionex PDA-100 (220 nm y 254 nm), bomba de HPLC Dionex P680, espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Thermo Finnigan MSQ (IQPA);

- 25 columna de HPLC: Phenomenex Gemini 5 $\mu$  C18 110A, 4,6 x 150 mm;

gradiente de HPLC: 2,5 ml/min, de 5% de acetonitrilo en agua a 90% de acetonitrilo en agua en 9,86 minutos, de 90% de acetonitrilo en agua a 95% de acetonitrilo en agua en 0,1 minutos, mantenido a 95% durante 1,19 minutos, Tanto acetonitrilo como agua tienen un 0,04% de NH<sub>4</sub>OH.

#### Método analítico de HPLC-EM 4

- 30 Plataforma: automuestreador Gilson 215, columna Dionex Thermostatted Column Compartment TCC-100 mantenida a 30°C, detector de fila de fotodiodos Dionex PDA-100 (220 nm y 254 nm), bomba de HPLC Dionex P680, espectrómetro de masas de cuadrupolo simple Thermo Finnigan MSQ (IQPA);

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

- 35 gradiente de HPLC: 1,5 ml/min, de 5% de acetonitrilo en agua a 90% de acetonitrilo en agua en 9,86 minutos, de 90% de acetonitrilo en agua a 95% de acetonitrilo en agua en 0,1 minutos, mantenido a 95% durante 1,19 minutos. Tanto acetonitrilo como agua tienen un 0,04% de NH<sub>4</sub>OH.

#### Método de cromatografía de fluido supercrítico quirál para separación quirál 1

Plataforma: sistema Berger Multigram II SFC de Autochem

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

- 40 modificador: 20% de metanol

caudal: 60 ml/min

presión: 10 MPa

temperatura de estufa: 35°C

carga: aproximadamente 14 mg/inyección (metanol)

Método de cromatografía de fluido supercrítico quiral para separación quiral 2

Plataforma: sistema Berger Multigram II SFC de Autochem

columna: columna Chiralpak AS-H, 2,1 x 25 cm, SFC

modificador: 20% de metanol

5 caudal: 60 ml/min

presión: 10 MPa

temperatura de estufa: 35°C

carga: 40 mg/inyección (MeOH)

Método de cromatografía de fluido supercrítico quiral para separación quiral 3

10 Columna: columna Chiralpak IA, 2,1 x 25 cm, SFC

modificador: 28% (metanol/acetona= 7:3)

caudal: 55 ml/min

presión: 10 MPa

temperatura de estufa: 35°C

15 carga: 50 mg/inyección.

Se disolvió la muestra en una mezcla 1:1 de metanol/acetona. La concentración final era de 50 mg/ml.

Ejemplo 1

*(2R,3R,11BR)*-3-ISOBUTIL-9,10-DIMETOXI-1,3,4,6,7,11B-HEXAHIDRO-2*H*-PIRIDO[2,1-*A*]ISOQUINOLIN-2-OL  
(*(2R,3R,11BR)*-DIHIDROTETRABENACINA)20 Etapa 1A: 3-Dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona

Se suspendieron HCl de dimetilamina (90 g, 1,1 mol), 5-metil-2-hexanona (450 ml, 3,3 mol), y paraformaldehído (50 g, 1,7 mol) en MeOH (80 ml) y se añadió HCl concentrado (200 µl). Se calentó la mezcla de reacción a 80°C durante 12 horas. Se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se añadió NaOH al 10% hasta basicidad. Se extrajo toda la mezcla con Et<sub>2</sub>O (100 ml, 2X). Se secó la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. Se pasó por columna la mezcla de reacción bruta mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0,5:9,5), dando 30 g (175 mmol) de 3-dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona **1a** con un 16% de rendimiento.

25

Etapa 1B: Metiloduro de 3-dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona

Se añadieron a un matraz de fondo redondo 3-dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona **1a** (30 g, 175 mmol) y AcOEt (300 ml) seguidos de yoduro de metilo (22 ml, 351 mmol). Se agitó la mezcla durante una noche y se formó un precipitado blanco. Se filtró el precipitado, se lavó con Et<sub>2</sub>O (150 ml, 3X) y se secó, proporcionando metiloduro de 3-dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona **1b** (44,9 g, 81% de rendimiento) en forma de un sólido blanco esponjoso.

30

Etapa 1C: Tetrabenacina

Se añadieron a un matraz de fondo redondo 6,7-dimetoxi-3,4-dihidroisoquinolina (13 g, 67,8 mmol), metiloduro de 3-dimetilaminometil-5-metilhexan-2-ona **1b** (26 g, 81,4 mmol) y EtOH (130 ml). Se calentó la suspensión a 80°C durante una noche. Se dejó enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añadió H<sub>2</sub>O (200 ml), formando un precipitado. Se retiró el EtOH a vacío y se añadió CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (400 ml). Se añadió una disolución de NaOH al 10% a la mezcla hasta basicidad. Se extrajo entonces la fase acuosa 3X con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (250 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron. Se purificó la mezcla de reacción bruta mediante cromatografía en columna ultrarrápida (acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0,5:9,5) y se recrystalizó adicionalmente con AcOEt y hexanos, dando 16,1 g (5,1 mmol) de una mezcla racémica de (3*S*,11*bS*)- y (3*R*,11*bR*)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11*b*-hexahidropirido[2,1-*a*]isoquinolin-2-ona **1c** (tetrabenacina, TBZ) con un 75% de rendimiento. Se separaron los enantiómeros de tetrabenacina por SFC utilizando una columna Chiralpak AD-H con 15% de CAN/MeOH más un 0,5% de DMEA a 2,5 ml/min a 10 MPa y a 35°C, proporcionando 4,3 g de (3*R*,11*bR*)-tetrabenacina **1c.1** y 4,3 g de (3*S*,11*bS*)-tetrabenacina **1c.2**. (3*R*,11*bR*)-tetrabenacina **1c.1**: EM calc.: (317); encontrado 318,7 (M + H). (3*S*,11*bS*)-tetrabenacina **1c.2**: EM calc.: (317); encontrado 318,7 (M+H).

35

40

45

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

Se disolvió (3R,11bR)-tetrabenacina **1c.1** (2 g, 6,3 mmol) en EtOH (70 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió entonces borohidruro de sodio (261 mg, 6,9 mmol) en porciones a 0°C. Se completó la reacción después de 30 minutos y se inactivó con NH<sub>4</sub>Cl saturado (4 ml). Se filtró el precipitado blanco formado y se lavó con EtOH (5 ml, 2X). Se retiró el EtOH a vacío y se extrajo la fase acuosa 3X con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentraron. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 0,5:9,5), dando 1,6 g (5 mmol) de (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol, ((2R,3R,11bR)-dihidotetrabenacina) **1d.1** y 410 mg (1,3 mmol) de (2S,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol, ((2S,3R,11bR)-dihidotetrabenacina) **1d.2.**, (2R,3R,11bR)-dihidotetrabenacina **1d.1**: EM calc.: (319); encontrado 320,3 (M + H). (2S,3R,11bR)-dihidotetrabenacina **1d.2**: EM calc.: (319); encontrado 320,3 (M + H).

## Ejemplo 2

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2h-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico

15 Etapa 2A: Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico 2-1

Se disolvió (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol **1d.1** (200 mg, 0,63 mmol) en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro, se añadieron DMAP (75,0 mg, 0,63 mmol) y Cbz-L-valina (190 mg, 0,75 mmol) y se agitó la mezcla durante 5 min. Se añadió DCC (155 mg, 0,75 mmol) y se formó inmediatamente un precipitado blanco. Se agitó la mezcla durante una noche, entonces se filtró y concentró. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,2:9,8) dio 360 mg (0,63 mmol) de éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido 2-benciloxycarbonilamino-3-metilbutírico **2a** en forma de un sólido amarillo pálido con rendimiento cuantitativo. Se disolvió el compuesto **2a** (163 mg, 0,29 mmol) en MeOH (10 ml), se añadió Pd/C y se purgó la mezcla con H<sub>2</sub>. Se agitó la mezcla durante una noche, se filtró a través de Celite y se concentró. La purificación mediante cromatografía en columna ultrarrápida (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0,5:9,5) dio 105 mg (0,25 mmol) de éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico **2-1** con 85% de rendimiento. EM calc.: (419); encontrado 419,3 (M + H).

Los compuestos adicionales sintetizados mediante el mismo procedimiento usando diferentes aminoácidos incluyen:

30 Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (R)-2-amino-4-metilpentanoico **2-2**. EM calc.: (433); encontrado 433,4 (M + H).

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-4-metilpentanoico **2-3**. EM calc.: (433); encontrado 433,4 (M + H).

35 Éster 1-((2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-aminosuccínico **2-4**. EM calc.: (449); encontrado 449,3 (M + H).

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido 2-amino-2-metilpropiónico **2-5**. EM calc.: (405); encontrado 405,3 (M + H).

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (R)-2-aminopropiónico **2-6**. EM calc.: (391); encontrado 391,3 (M + H).

40 Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-aminopropiónico **2-7**. EM calc.: (391); encontrado 391,3 (M + H).

Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (R)-2-amino-3-metilbutírico **2-8**. EM calc.: (419); encontrado 419,4 (M + H).

45 Éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido aminoacético **2-9**. EM calc.: (377); encontrado 377,3 (M + H).

## Ejemplo 3

Éster etílico y (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico

Etapa 3A: Éster etílico y (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico 3-1

5 Se disolvió (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ol **1d.1** (100 mg, 0,31 mmol) en 3 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro y se añadieron DMAP (1,0 mg, 0,01 mmol) y piridina (51 µl, 0,63 mmol) seguidos de la adición gota a gota de cloroformiato (45 µl, 0,47 mmol). Se dejó agitar la reacción durante una noche, se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) y se extrajo con NH<sub>4</sub>Cl sat. (5 ml). Se secó la fase orgánica sobre MgSO<sub>4</sub> y se concentró. Se purificó el producto bruto mediante cromatografía en columna ultrarrápida (acetona:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:9), dando 88 mg (2,25 mmol) de **3-1** en forma de una espuma amarilla pálida con 72% de rendimiento. EM calc.: (392); encontrado 392,3 (M + H).

10 Se prepararon también mediante el procedimiento anterior:

Éster metílico y (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico **3-2** con 37% de rendimiento. EM calc.: (378); encontrado 378,1 (M + H)

Éster butílico y (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido carbónico **3-3** con 46% de rendimiento. EM calc.: (420); encontrado 420,1 (M + H)

15 Ejemplo 4

Método para determinar la estabilidad de compuestos en hepatocitos humanos

20 Se descongelaron hepatocitos humanos crioconservados de 12 donantes individuales según las instrucciones del suministrador y se agruparon. Se determinó que la viabilidad celular era de más de un 85%. Se incubó TBZ (1 µM) con hepatocitos humanos individuales (1 x 10<sup>6</sup> células/ml) a 37°C con 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> durante 0, 5, 15, 30 y 60 min. Se añadió TBZ en DMSO para conseguir 1,0 µM (el DMSO estaba a menos de 0,5% v/v). Todas las concentraciones y contenidos celulares eran relativos al volumen de incubación final de 100 µl. Se terminó la incubación mezclando 100 µl de acetonitrilo enfriado con hielo en ácido fórmico al 1% que contenía dextrometorfano (1,0 µM) como patrón interno para análisis de CL/EM. Se retiraron las proteínas precipitadas mediante centrifugación (1500-2500 x g durante 30 min a 15°C).

25 Brevemente, se separaron las muestras con un método HPLC en gradiente mediante sistemas Acquity UPLC consistentes en una bomba, un calentador de columna (40°C) y un desgasificador de vacío/bandeja de fase móvil. La fase móvil A era agua con 0,1% de ácido fórmico y la fase móvil B era acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico. La elución en gradiente fue como sigue: fase móvil B: 0-10% a 0-0,75 min, 40-90% a 1,25-1,5 min, 90-0% a 1,75-2,0 min, y el tiempo de proceso era de 3 min. La columna de fase inversa era una columna BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm). El caudal era de 0,8 ml/min y el volumen de inyección era de 7,5 µl. Se monitorizaron las muestras con un espectrómetro de masas API-3000 y fuente iónica de IEP en modo positivo, TBZ m/z 318,4 > 220,4, HTBZ m/z 320,3 > 302,3 y dextrometorfano m/z 272,2 > 147,2.

30 Las Figuras 1a, 1b y 1c muestran la conversión de tetrabenacina, compuesto **2-1** y compuesto **3-1** en hepatocitos humanos en HTBZ en el caso de tetrabenacina y en **1d.1** en el caso de los compuestos **2-1** y **3-1**. La tetrabenacina y el compuesto **3-1** mostraron que esta conversión era rápida, mientras que el compuesto **2-1** era comparativamente lento.

Ejemplo 5

Método para determinar la estabilidad de compuestos en microsomas hepáticos de mamífero

40 Brevemente, se incubaron microsomas hepáticos humanos agrupados (0,1 o 0,5 mg/ml; n>10; género mixto) a 37°C con el compuesto de ensayo en presencia de un sistema generador de NADPH que contenía tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4, cloruro de magnesio 3 mM, EDTA 1 mM, NADP 1 mM, G-6-P 5 mM y 1 unidad/ml de G-6-PD.

45 Se realizaron incubaciones en seis placas de 96 pocillos profundos de 2,0 ml modificadas con 1 µM de cada compuesto (con 0,01% de DMSO) con un volumen total de 250 µl. Cada placa, que representa un punto temporal individual, contenía 96 Titertube® Micro Tubes que permitían duplicados de 48 compuestos en cada punto temporal (0, 5, 10, 20, 40 y 60 minutos). Se detuvo la reacción mediante la adición de un reactivo de detención apropiado (0,3 ml de acetonitrilo que contenía un patrón interno comercial). Se retiraron las proteínas precipitadas mediante centrifugación durante 15 min a 3000 rpm y se analizó el fluido sobrenadante (~0,1 ml) mediante CL/EM para el % de compuesto original restante.

50 Se separaron las muestras con un método de HPLC en gradiente mediante sistemas Agilent LC consistentes en una bomba, un calentador de columna (40°C) y un desgasificador de vacío/bandeja de fase móvil. La fase móvil A era agua con 0,1% de ácido fórmico y la fase móvil B era acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico. La elución en gradiente era como sigue: fase móvil B: 0-30% a 0-0,30 min, 30-98% a 0,7-1,1 min, 98-0% a 1,50-1,51 min, y el tiempo de proceso era de 3 min para **3-1**; fase móvil B: 5-98% a 0,5-2,5 min, 98-5% a 4,0-4,1 min, y el tiempo de proceso era

de 6,5 min para **2-1**. La columna de fase inversa era una columna Luna C18 (20 x 2 mm, 5 µm) para **3-1** y una columna Synergi C18 (150 x 2 mm, 5 µm) para **2-1**. El caudal era de 0,55 ml/min para **3-1** y de 0,4 ml/min para **2-1** y el volumen de inyección era de 20 µl. Se monitorizaron las muestras con un espectrómetro de masas API-3000 y una fuente iónica de IEP en modo positivo, TBZ m/z 318,4 > 220,4, HTBZ m/z 320,3 > 302,3 y dextrometorfano m/z 272,2 > 147,2.

Las Figuras 2a a 2f muestran la conversión de compuesto **2-1** y compuesto **3-1** en microsomas hepáticos de rata, perro y ser humano en **1d.1**. En cada una de las especies, la conversión de compuesto **2-1** en **1d.1** era más lenta que la conversión observada en el caso de compuesto **3-1** en compuesto **1d.1**.

#### Ejemplo 6

#### 10 Evaluación farmacocinética (PK)

##### Método animal:

##### 1. Rata

Brevemente, se administró una dosis oral única (10 mg/kg) de **2-1** y **3-1** con 10% de PEG en celulosa al 0,25% en agua MilliQ a ratas (3 ratas/dosis) para una evaluación farmacocinética. Se usó un muestreo en serie para recoger muestras de sangre, que se tomaron de cada animal tratado en nueve puntos temporales en el intervalo desde antes de la dosis hasta 24 horas después de la dosis (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 24 horas) para la administración oral. Se almacenaron las muestras de plasma a -80°C o menos hasta el análisis.

##### 2. Perro

Brevemente, se administró una dosis oral única (6,1 mg/kg para **3-1** y 10 mg/kg para **2-1**) con 10% de PEG en metilcelulosa al 0,25% en agua MilliQ a perros (3 perros/dosis) para una evaluación farmacocinética. Se usó un muestreo en serie para recoger muestras de sangre, que se tomaron de cada animal tratado en nueve puntos temporales en el intervalo desde antes de la dosis hasta 24 horas después de la dosis (0, 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas) para la administración oral. Se almacenaron las muestras de plasma a -80°C o menos hasta el análisis.

##### 25 Método bioanalítico general:

Se descongelaron muestras de plasma en hielo y se transfirieron 50 µl de plasma a una placa de 96 pocillos. Se precipitaron las proteínas plasmáticas mediante la adición de 150 µl de acetonitrilo (ACN) preenfriado que contenía 75 ng/ml de patrón interno. Se añadieron 50 µl de ACN/agua (60:40) adicionales a cada muestra. Se prepararon las muestras de curva de calibración mediante dilución en serie con ACN/agua (60:40). Se transfirieron 50 µl de cada muestra patrón a una placa de 96 pocillos seguido de la adición de 150 µl de acetonitrilo (ACN) que contenían 75 ng/ml de patrón interno y 50 µl de plasma de rata de referencia. Se taparon las placas, se mezclaron y se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min. Se recogió el sobrenadante y se inyectó en un sistema de CL-EM/EM para cuantificación. El método de ensayo no validado mostró buena linealidad, especificidad y exactitud para **3-1**, **2-1** y **1d.1** en el intervalo de concentración de 1 a 1000 ng/ml, y los límites inferiores de cuantificación de **3-1**, **2-1** y **1d.1** estaban todos a 1 ng/ml. Se usaron 3 conjuntos de muestras de CG (4, 40, 400, 800 ng/ml) para **3-1**, **2-1** y **1d.1** como control de calidad para los estudios necesarios y se prepararon del mismo modo que los patrones. Se efectuó la cuantificación ajustando las relaciones de área de pico a una curva de calibración lineal ponderada ( $1/x^2$ ).

##### Método farmacocinético:

Se derivó y evaluó la farmacocinética descriptiva basándose en las concentraciones plasmáticas de **3-1**, **2-1** y **1d.1** de cada rata individual. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos usando análisis no compartimental de los perfiles de concentración plasmática-tiempo de **3-1**, **2-1** y **1d.1** en el software de modelización farmacocinética de WinNonlin programa Professional versión 5.0.1 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

La Figura 3a muestra que los perfiles de concentración plasmática-tiempo en rata del compuesto **1d.1** a partir de **3-1** y **1d.1** administrados por vía oral son indistinguibles. No se detectó **3-1** en el plasma de rata después de la administración oral de **3-1**.

La Figura 3b muestra el perfil de concentración plasmática-tiempo en rata de los compuestos **1d.1** y **2-1** después de la administración oral de **2-1**.

La Figura 3c muestra el perfil de concentración plasmática-tiempo en rata de los compuestos **1d.1** y **3-1** después de la administración oral de **3-1**.

La Figura 3d muestra el perfil de concentración plasmática-tiempo en rata de los compuestos **1d.1** y **2-1** después de la administración oral de **2-1**.

Estas figuras muestran que la semivida plasmática de **1d.1** tras la administración oral del compuesto **2-1** es 2-3 veces mayor que tras la administración oral del compuesto **3-1**.

#### Ejemplo 7

5 Ensayo de unión del transportador de monoamina vesicular de isoforma 2 (VMAT2) (Adaptado de TENG, *ET AL.*, J. NEUROCHEM. 71, 258-65, 1998)

#### Procedimiento A:

Preparación de vesículas de cuerpo estriado de ratas

10 Se agrupan cuerpos estriados de rata de tres ratas y se homogeneizan en sacarosa 0,32 M. Se centrifuga entonces el homogeneizado a 2.000xg durante 10 min a 4°C y se centrifuga el sobrenadante resultante a 10.000xg durante 30 min a 4°C. Se somete a choque osmótico el sedimento resultante que contiene la fracción sinaptosómica enriquecida (2 ml) mediante la adición de 7 ml de H<sub>2</sub>O destilada, y posteriormente se homogeneiza la suspensión. Se restaura la osmolaridad mediante la adición de 0,9 ml de HEPES 0,25 M y 0,9 ml de tampón de sal dipotásica de ácido L-(+)-tartárico neutro 1,0 M (pH 7,5) seguido de una centrifugación de 20 min (20.000 x g a 4°C). Se centrifuga entonces el sobrenadante durante 60 min (55.000x a 4°C) y se centrifuga el sobrenadante resultante durante 45 min (100.000 x g a 4°C). Se resuspende el sedimento resultante en HEPES 25 mM, sal dipotásica del ácido L-(+)-tartárico 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 10 mM, EGTA 0,05 mM, pH 7,5 hasta una concentración de proteína de 1-2 mg/ml y se almacena a -80°C durante hasta 3 semanas sin pérdida apreciable de actividad de unión. Inmediatamente antes del uso, se resuspende el sedimento final en tampón de unión (HEPES 25 mM, sal dipotásica del ácido L-(+)-tartárico 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NaCl 10 mM, EGTA 0,05 mM, EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 1,7 mM, pH 7,4).

20 Unión de [<sup>3</sup>H]-dihidrotetrabenacina (DHTBZ)

25 Se incuban alícuotas de la suspensión de vesícula (0,16 ml, 15 µg de proteína/ml) con compuestos competidores (en el intervalo de  $1 \times 10^{-6}$  M a  $1 \times 10^{-12}$  M) y [<sup>3</sup>H]-dihidrotetrabenacina 2 nM (HTBZ; actividad específica: 20 Ci/mmol, American Radiolabeled Chemicals, Inc) durante 1 hora a temperatura ambiente en un volumen total de 0,5 ml. Se termina la reacción mediante la rápida filtración de las muestras por filtros Whatman GF/F usando un recolector celular Brandel. Se determina la unión no específica usando tetrabenacina (TBZ) 20 µM. Se empapan anteriormente los filtros durante 2 h con polietilenimina (al 0,5%) enfriada con hielo. Después de lavar los filtros tres veces con el tampón enfriado con hielo, se disponen en viales de centelleo con 10 ml de cóctel de centelleo. Se determina la radiactividad unida mediante espectrometría de centelleo.

#### Procedimiento B:

30 Se adaptó el procedimiento a partir del descrito anteriormente (Near, (1986), Mol. Pharmacol. 30: 252-7). Se prepararon homogeneizados de prosencéfalo de rata de Sprague-Dawley mediante homogeneización y lavado por centrifugación como se describe anteriormente (Hoare *et al.*, (2003) Peptides 24: 1881-97). En un volumen total de 0,2 ml en placas de 96 pocillos de baja unión (Corning nº 3605), competían 12 concentraciones de isómero de HTBZ o análogo frente a <sup>3</sup>H-dihidrotetrabenacina 6 nM (American Radiolabeled Chemicals, K<sub>d</sub> 2,6 nM) en homogeneizado de prosencéfalo de rata (100 µg de proteína de membrana por pocillo) en tampón de unión a VMAT2 (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, EDTA 1 mM, pH 7,4). Después de incubar a 25°C durante 2 horas, se recogió el radioligando unido mediante filtración rápida por filtros de fibra de vidrio GF/B usando un recolector Unifilter-96 (PerkinElmer). Se pretrataron las placas de filtrado durante 10 minutos con 0,1% de polietilenimina y después de recoger se lavaron con 800 µl de tampón de unión a VMAT2. Se cuantificó el radioligando unido mediante conteo de centelleo usando un Topcount NXT (PerkinElmer).

Compuesto	pKi (n)	K <sub>i</sub> (nM)
2R,3R,11bR-HTBZ	8,7 ± 0,2 (6)	1,9
2S,3R,11bR-HTBZ	7,9 ± 0,1 (5)	13
2S,3S,11bS-HTBZ	6,7 ± 0,1 (3)	202
2R,3S,11bS-HTBZ	6,7 ± 0,1 (4)	714
Compuesto <b>3-1</b>	7,9 ± 0,1 (2)	14
Compuesto <b>3-2</b>	6,7 ± 0,2 (2)	187

Los datos son medias ± DE para al menos dos experimentos independientes. Se determinaron los valores de K<sub>i</sub> usando un valor de K<sub>d</sub> publicado de 1,2 nM para membranas de cuerpo estriado de rata (Roland *et al.*, 2000).

Ejemplo 8

Ensayos de unión para selectividad del receptor

5 Se ensayó en los cuatro estereoisómeros de HTBZ y los compuestos de la presente invención la especificidad por receptor cribando frente a un panel de 80 receptores, canales iónicos y transportadores (perfil de alto rendimiento, Cerep, S.A.). Posteriormente, se ensayaron los compuestos en ensayos de unión competitiva seleccionados en un intervalo de concentraciones para determinar su afinidad por los receptores descritos a continuación.

(a) Receptor D2S de dopamina:

Referencia: Grandy *et al.*, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9762-6

fuelle: humana recombinante (células CHO)

10 ligando: [<sup>3</sup>H]espiperona, 1,0 nM

tiempo/temperatura de incubación: 90 min/25°C

tampón de incubación: HEPES 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, pH 7,4

ligando no específico: clozapina (10 µM)

K<sub>d</sub>: 27 pM

15 B<sub>máx</sub>: 6,9 pmol/mg

unión específica: 600 cpm

método de cuantificación: conteo por centelleo

(b) Receptor D4.4 de dopamina:

Referencia: Van Tol *et al.* (1992) Nature, 358: 149-152.

20 fuente: humana recombinante (células CHO)

ligando: [<sup>3</sup>H]espiperona, 0,3 nM

tiempo/temperatura de incubación: 60 min/22°C

ligando no específico: (+)-butaclamol (10 µM)

K<sub>d</sub>: 0,19 nM

25 método de cuantificación: conteo por centelleo

Tabla 2: Datos de unión para selectividad de receptor						
	2R,3R,11bR-HTBZ	2S,3R,11bR-HTBZ	2S,3S,11bS-HTBZ	2R,3S,11bS-HTBZ	3-1	2-1
D2S (h)	-6% de inhibición a 10 µM	17% de inhibición a 30 µM	192	57	15% de inhibición a 10 µM	2% de inhibición a 10 µM
D4.4 (h)	0% de inhibición a 1 µM	30% de inhibición a 10 µM	9% de inhibición a 1 µM	67	15% de inhibición a 10 µM	13% de inhibición a 10 µM
Los valores mostrados son K <sub>i</sub> (nM) o % de inhibición a la concentración ensayada						

30 2R,3R,11bR-HTBZ y los dos análogos estructurales de 2R,3R,11bR-HTBZ, los compuestos 2-1 y 3-1, demostraron selectividad por VMAT2. En contraposición, los estereoisómeros 2S,3S,11bS y 2R,3S,11bS-HTBZ exhibían una unión de alta afinidad por D2(S). La 2S,3R,11bR-HTBZ mostraba cierta inhibición menor en los receptores de dopamina ensayados. Esta actividad fuera de objetivo de ciertos isómeros de HTBZ podría contribuir a algunos de los efectos secundarios observados con TBZ.

Ejemplo 9

Reducciones de la actividad locomotora inducidas por el inhibidor de VMAT2

5 Se adaptan ratas (Sprague-Dawley, 100-300 g) a alojamientos individuales durante al menos 3 días antes del ensayo. Se administran a las ratas sustancias de ensayo por vías oral, intraperitoneal, subcutánea o intravenosa (entre 1-100 mg/kg) o controles de vehículo. Después de un tiempo de pretratamiento de 15-60 minutos, se disponen las ratas en una jaula transparente rodeada por detectores fotocelulares (San Diego Instruments). Se detecta la actividad locomotora de las ratas por las roturas de los rayos de las fotocélulas y se define la actividad como el número de roturas de rayos por sesión. Los periodos de observación están en el intervalo de 15 min a 2 horas. Se comparan los efectos del compuesto novedoso con los efectos del vehículo y el control positivo (diazepam a 3 mg/kg) con un ANOVA de una cola seguido de análisis *post-hoc* de Student-Neuman-Keul. Se usan 8-10 ratas por condición de ensayo.

10 Ejemplo 10

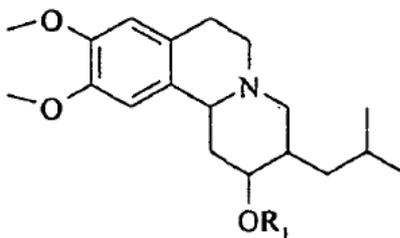
Ptois inducida por inhibidor de VMAT2

15 Se adaptan ratas (Sprague-Dawley, 100-300 g) a alojamientos individuales durante al menos 3 días antes del ensayo. Se administran a las ratas sustancias de ensayo por vías oral, intraperitoneal, subcutánea o intravenosa (entre 1-100 mg/kg) o controles de vehículo. Después de un tiempo de pretratamiento de 15 minutos, se disponen las ratas en una jaula transparente para la observación de la ptois. Se evalúa la ptois en una escala de 4 puntos: ojos totalmente abiertos = 0, ojos cerrados un cuarto= 1, ojos medio cerrados= 2, ojos cerrados= 4, ojos totalmente cerrados= 4. Las medidas se toman a intervalos de 15 minutos hasta 3 horas después de la administración de compuestos. Se comparan los efectos del compuesto novedoso con los efectos del vehículo con ANOVA de una cola, seguido de análisis *post-hoc* de Student-Neuman-Keul. Se usan 8-10 ratas por condición de ensayo.

20

## REIVINDICACIONES

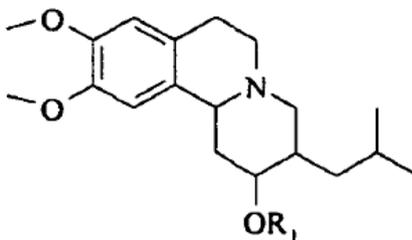
1. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



(I)

y estereoisómeros, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos del mismo, en la que R<sub>1</sub> es -C(=O)-O-alquilo.

- 5 2. Un compuesto que tiene la siguiente estructura:



(I)

10 y estereoisómeros, sales farmacéuticamente aceptables y solvatos del mismo, en la que R<sub>1</sub> es -C(=O)-alcanodiil C<sub>1-6</sub>-NH<sub>2</sub>, y en la que dicho alcanodiil C<sub>1-6</sub> es -CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]-, -CHCH<sub>2</sub>[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]- o -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>- y está opcionalmente sustituido con un grupo seleccionado de -NH-C(=NH)NH<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -CO<sub>2</sub>Me, -SH, -C(O)NH<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -SCH<sub>3</sub>, fenilo, -OH, 4-hidroxifenilo, imidazolilo e indolilo.

3. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto es éster 3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido 2-amino-3-metilbutírico o un estereoisómero, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

15 4. El compuesto de la reivindicación 3, en el que el compuesto es éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido 2-amino-3-metilbutírico o un estereoisómero, sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo.

20 5. El compuesto de la reivindicación 4, en el que el compuesto es éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

25 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que el compuesto es éster (2R,3R,11bR)-3-isobutil-9,10-dimetoxi-1,3,4,6,7,11b-hexahidro-2H-pirido[2,1-a]isoquinolin-2-ílico del ácido (S)-2-amino-3-metilbutírico o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

8. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 6 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de trastornos hiperkinéticos que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad farmacéuticamente eficaz.

30 9. El uso según la reivindicación 8, en el que el trastorno hiperkinético es enfermedad de Huntington, discinesia tardía, síndrome de Tourette o tics.

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de trastornos hiperkinéticos que comprende administrar a un sujeto necesitado de ello una cantidad farmacéuticamente eficaz.

11. La composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el trastorno hiperkinético es enfermedad de Huntington, discinesia tardía, síndrome de Tourette o tics.

12. El compuesto de la reivindicación 2, en el que el compuesto tiene la siguiente estructura:

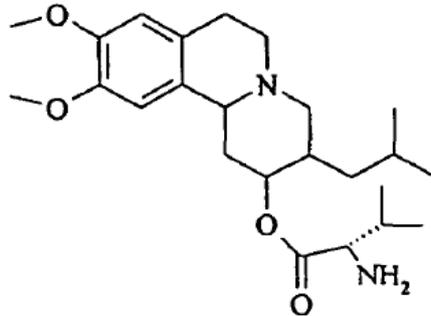


Figura 1a

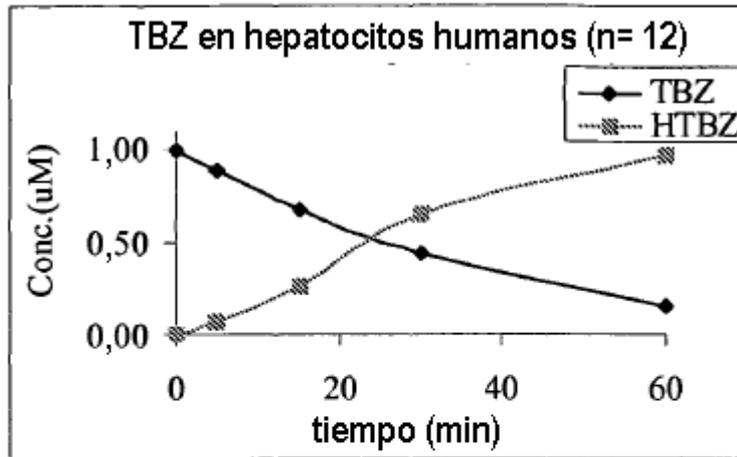


Figura 1b

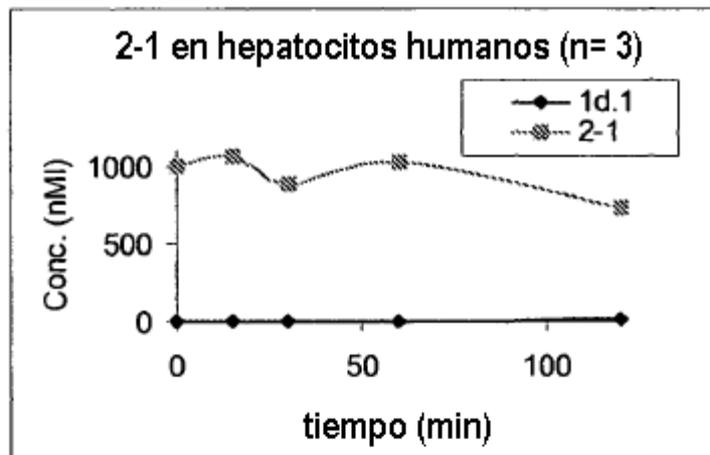


Figura 1c

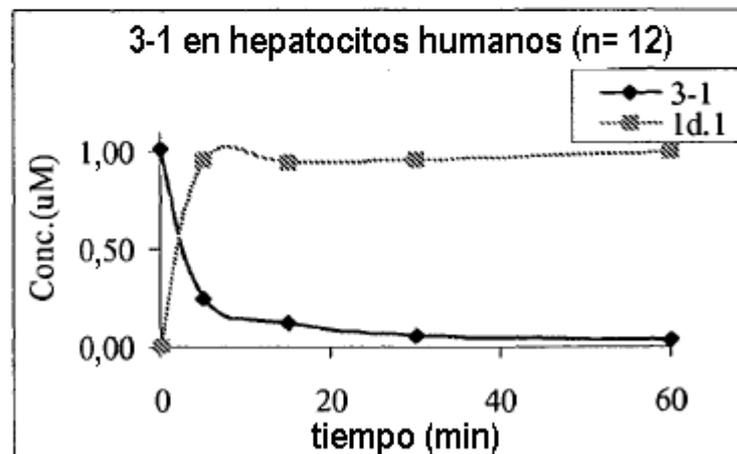


Figura 2a (rata)

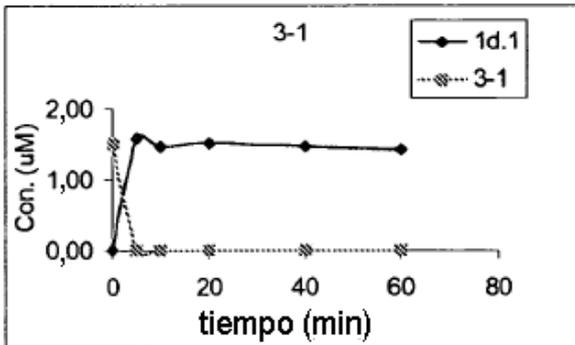


Figura 2b (rata)

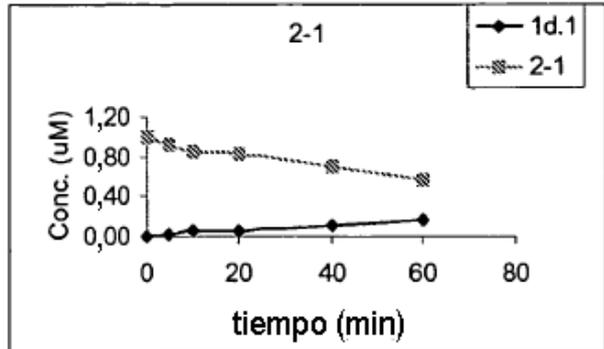


Figura 2c (perro)

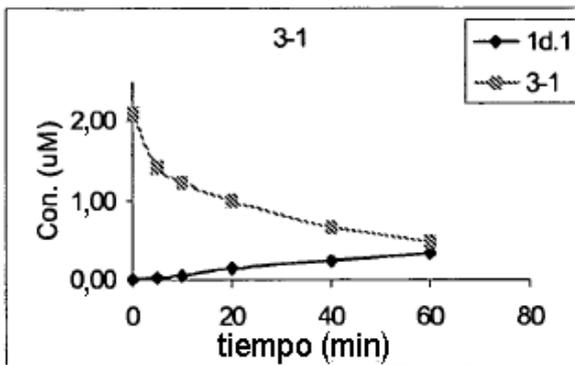


Figura 2d (perro)

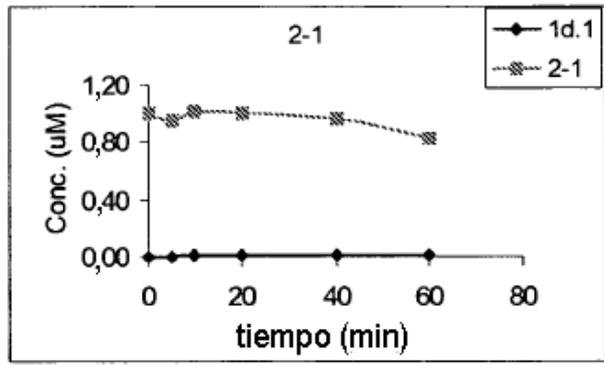


Figura 2e (ser humano)

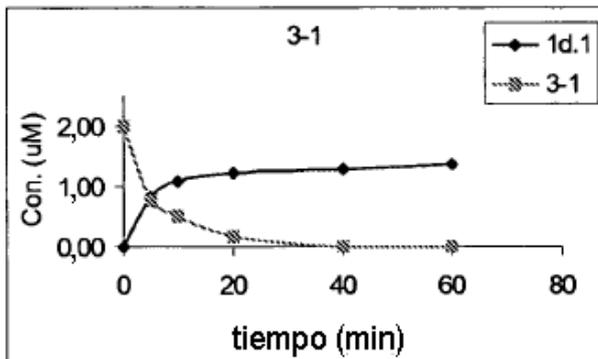


Figura 2f (ser humano)

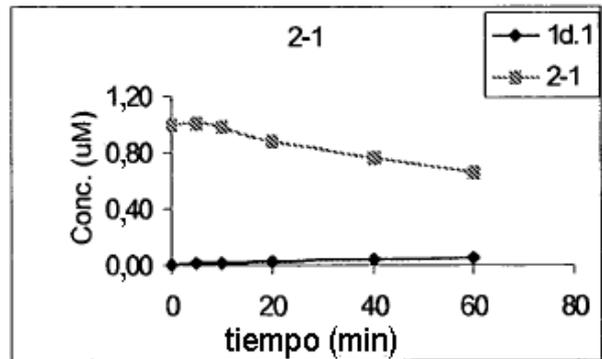


Figura 3a

Perfil de concentración plasmática-tiempo de 10 mg/kg por vía oral de 3-1 y 10 mg/kg por vía oral de 1d.1 a ratas macho (N=3)

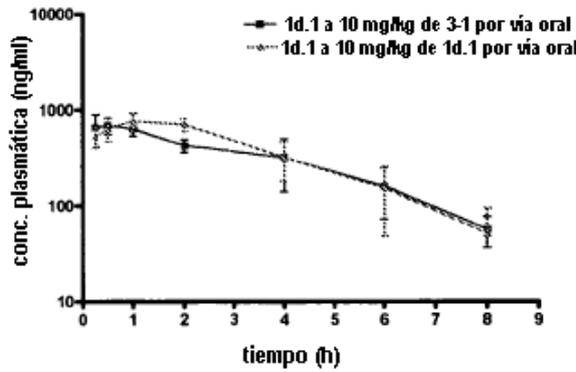


Figura 3b

Perfil de concentración plasmática-tiempo de 10 mg/kg por vía oral de 2-1 a ratas macho (N=3)

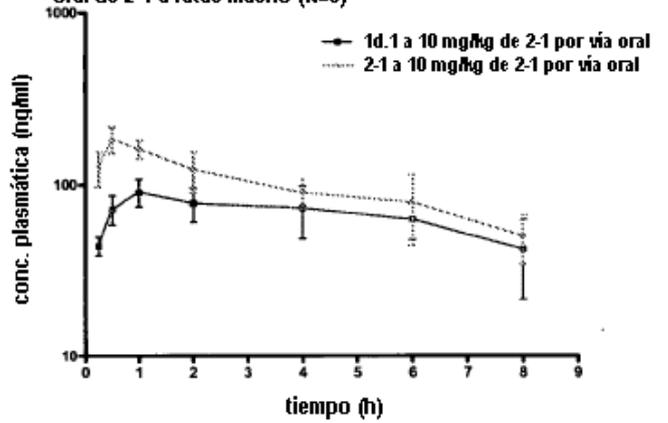


Figura 3c

Perfil de concentración plasmática-tiempo de 6,1 mg/kg por vía oral de 3-1 a perros macho (N=3)

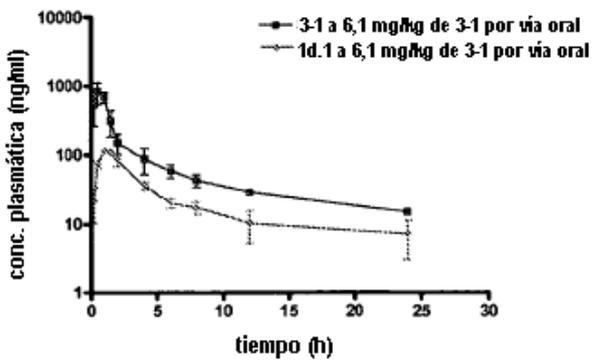


Figura 3d

Perfil de concentración plasmática-tiempo de 10 mg/kg por vía oral de 2-1 a perros macho (N=3)

