



(11) *Número de Publicação:* PT 809635 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07D241/44 A A61K031/495 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1996.01.24	(73) <i>Titular(es):</i> WARNER-LAMBERT COMPANY 201 TABOR ROAD, MORRIS PLAINS NEW JERSEY 07950 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1995.02.16 US 389525	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.12.03	(72) <i>Inventor(es):</i> KEVIN KA-WANG WANG US PO-WAI YUEN US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.10.04	(74) <i>Mandatário(s):</i> PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* HIDRAZINAS ALFA-SUBSTITUÍDAS COM ACTIVIDADE INIBIDORA DE CALPAÍNA

(57) *Resumo:*

HIDRAZINAS ALFA-SUBSTITUÍDAS COM ACTIVIDADE INIBIDORA DE CALPAÍNA





DESCRIÇÃO

"HIDRAZIDAS α -SUBSTITUÍDAS COM ACTIVIDADE INIBIDORA DE CALPAÍNA"

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A protease dependente de cálcio (calpaína) existe na maior parte dos tipos de células de mamíferos. Esta enzima tem duas isoformas que diferem quanto à sua sensibilidade a iões cálcio (calpaína I e calpaína II) (ver Murachi T., *Biochem. Int.* 1989; 18:263-264). A calpaína reside no citossol das células e é activada por Ca^{2+} a pH fisiológico. A sua actividade proteolítica parecer ser selectiva contra certas proteínas alvo, tais como componentes do citoesqueleto e enzimas dependentes de calmodulina. Até à data, não estão descritos inibidores de calpaína com afinidade elevada, selectivos, não-peptídicos (ver Wang K. K. W., *Trends Pharmacol. Sci.* 1990; 11:139-142).

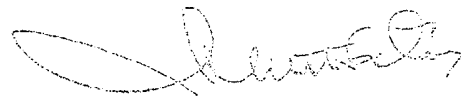
A excitação excessiva por um glutamato neurotransmissor pode conduzir à morte de células nervosas (neurónios) e neurodegeneração (ver Meldrum B., Garthwaite J., *Trends Pharmacol. Sci.*, Special Report 1991, 1991:54-62). Crê-se que o efeito tóxico do glutamato resulta da sobreactivação dos seus receptores alvo de glutamato (e.g., em patologias isquémicas ou derrame). Esta por seu turno produz um influxo de ião cálcio (Ca^{2+}) para os neurónios. O aumento do nível de Ca^{2+} celular despoleta a activação da calpaína. A calpaína provoca então a degradação de proteínas citoesqueléticas tais como espectrina, que se crê perturbar as funções celulares normais, e leva eventualmente à morte celular (Siman R., Noszek J. C., Kegerise C., *J. Neurosciences* 1989; 9:1579-1590). A inibição de produtos secundários de calpaína abrangida pela presente invenção minimiza a lesão celular e portanto impede a neurodegeneração.



Demonstrou-se que vários inibidores não-selectivos de calpaína são neuroprotectores em vários modelos de isquemia (Arai A., Kessler M., Lee K.S., Lynch G., *Brain Res.* 1990; **532**:63-68).

O processamento anômalo de proteínas está implicado na doença de Alzheimer e a calpaína e várias das suas proteínas alvo incluindo a proteína precursora de amilóides e a proteína tau foram identificadas como os principais componentes dos agregados neurofibrilares da doença de Alzheimer (Holtzman D. M., Mobley W. C., *Trends Biochem. Sci.* 1991; **16**:140-144; Iwamoto N., Thangnipon W., Crawford C., Emson P. C., *Brain Res.* 1991:177-180) em regiões afectadas do cérebro. Também se verificou que a proteína precursora de amilóides é sensível à digestão por calpaína (Siman R., et al., *J. Neuroscience* 1990; **10**:2400-2411). É concebível que uma actividade defeituosa de calpaína possa levar ao processamento anômalo da sua proteína alvo. O argumento é que a inibição de produtos secundários da calpaína abrangida pela presente invenção proporcionará vantagens terapêuticas a doentes com doença de Alzheimer.

A catarata é uma opacidade que ocorre na lente em resultado de uma variedade de lesões na lente (Shearer T. R., David L. L., Anderson R. S., *Current Eye Res.* 1987; **6**:280-300). Num modelo experimental em que a catarata é induzida por um excesso de selenito de sódio (catarata de selenito), demonstrou-se que a lente apresenta aumento de cálcio e proteínas insolúveis em água. Também se encontra calpaína em concentração elevada no epitélio córneo da lente. Na catarata de selenito, demonstrou-se que as proteínas da lente tais como α -, β -cristalinas, e proteínas citoesqueléticas foram degradadas durante a formação da catarata (Marcantonio J. M., Duncan G., *Biochem. Soc. Trans.* 1991; **19**:1148-1150). Demonstrou-se que o inibidor de cisteína protease E64, que inibe a calpaína, reduz a taxa de formação de cataratas em animais integrais (Azuma, M., David L. L., Shearer T. R., *Current Eye Res.* 1991; **10**:657-666). Os inibidores de calpaína tais como os compostos abrangidos pela



presente invenção podem ter utilidade na retardação da formação de cataratas.

Demonstrou-se que o nível de cálcio intracelular aumenta após uma lesão traumática do cérebro ou da medula espinal (Banik N. L., Hogan E. L., Whetstone L. J., Balentine J. D., 1984; 1:131-137). Crê-se que a sobreactivação de calpaína desempenha um papel no processo degenerativo que ocorre após a lesão, semelhante ao da toxicidade dos amino ácidos excitatórios no cérebro (Taft W. C., Lyeth B. G., Dixon C. E., Hayes R. L., *Soc. Neurosciences* 1991:164, Abstr. 17). Também existem provas da degradação da proteína mielina que pode provocar neurodegeneração (Banik N., McAlhaney W. W., Hogan E. L., *J. Neurochemistry* 1985;45:581-588). Os inibidores de calpaína da presente invenção podem minimizar a degeneração observada.

O enfarte do miocárdio isquémico é um resultado do bloqueamento da alimentação de sangue aos vasos coronários. Foi descrito que se observou a activação de calpaína nos miócitos cardíacos durante estes estados (Iizuka K., Kawaguchi H., Yasuda H., *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 1991; 46:427-431). Verificou-se que a perfusão coronária de inibidor de cisteína protease E64c após enfarte agudo do miocárdio em cães reduzia significativamente o tamanho do enfarte (Toda G., Matsushita S., Kuramoto L., et al., *Jap. Heart J.* 1989; 30:375-386). Mais uma vez, os inibidores de calpaína da presente invenção podem proporcionar vantagens terapêuticas.

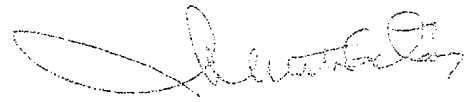
A angioplastia coronária percutânea transluminal é actualmente um procedimento médico largamente aceite para expandir o diâmetro interno da artéria bloqueada em doentes com doença aterosclerótica das artérias coronárias. Contudo, a taxa de sucesso deste procedimento é ensombrada pelo reestreitamento espontâneo, lento das artérias (restenose) (McBride W., Lange R. A., Hillis L. D., *New Eng. J. Med.* 1988; 318:1734-1737). Recentemente, demonstrou-se o controlo da proliferação e



migração das células do músculo liso para a camada neoíntima do vaso sanguíneo por inibidores de calpaína I e outros inibidores de cisteíno proteases (March K. L., Roeske R., Hathaway D. R., *Clin. Res.* 1990; **38**:234A). Demonstrou-se adicionalmente que estes agentes podem inibir a restenose (Wilensky R. L., March K. L., Hathaway D. R., *J. Amer. Coll. Cardiol.* 1991; **17**:268A). Uma vez que os compostos desta invenção também são inibidores de calpaína, devem ser úteis na redução da restenose angioplástica.

Encontra-se calpaína no líquido sinovial (articular) da articulação do joelho. De facto, verificou-se que tanto a calpaína I como a calpaína II no líquido sinovial aumentam várias vezes em doentes com artrite reumatóide (Fukui I., Tanaka K., Murachi T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; **162**:559-566). Também se verificou que um proteoglicano principal componente da cartilagem é um substrato de calpaína (Suzuki K., et al., *Biochem. J.* 1992;**285**:857-862). Crê-se que a sobreactivação da calpaína tem um efeito lesionante sobre a articulação e sobre o próprio processo inflamatório. A inibição da actividade da calpaína por compostos da presente invenção pode proporcionar vantagens a doentes que sofrem dessa inflamação.

A perturbação da regulação da concentração de cálcio intracelular foi descrita na distrofia muscular, tal como a distrofia muscular de Duchenne (DMD) e após a desnervação muscular. Verificou-se que os níveis de cálcio intracelular em murganhos com distrofia muscular era significativamente aumentado resultando numa degradação acrescida de proteínas. Muitas proteínas miofibrilares (tais como miosina, Troponina I e T) são de facto bons substratos para a calpaína (Sugita H., Tshiura S., Kamakura K., Nakase H., Hagiwara K., Nonaka I., In: *Calcium Regulation in Biological Systems*, (Ebashi S., Endo M., Imahori K., Kakiuchi S., Nishizuka Y., eds., Academic Press, 1984:243-257) e a concentração de calpaína II era mais elevada no músculo esquelético distrófico em animais (Johnson P., Hammer



J. L., *Int. J. Biochem.* 1988; **20**:1227-30). Consequentemente, é concebível que a sobreactivação de calpaína desempenhe um papel importante na degradação anómala de miofibras. Os inibidores de calpaína descritos nesta invenção serão úteis para o tratamento de doenças degenerativas musculares tais como distrofia muscular ou desnervação do músculo.

A formação de coágulos sanguíneos (trombos) é um resultado da agregação de plaquetas. Quando as plaquetas são estimuladas por trombina ou plasmina, ocorrem dois acontecimentos chave que levam à agregação de plaquetas (Puri R. N., et al., *Am. J. Physiol.* 1990; **259**:C862): 1) a agregina de receptores de ADP putativa é proteolizada e 2) os receptores de fibrinogénio ficam expostos à superfície das plaquetas. A agregina foi hidrolizada *in vitro* por calpaína mas não por trombina. Verificou-se adicionalmente que a trombina aumentou os níveis de cálcio intracelular em plaquetas activando assim a calpaína que hidrolizou então a agregina. A calpaína também pareceu modificar a estrutura membranar das plaquetas expondo assim os receptores de fibrinogénio latentes (Baldassare J. J., et al., *J. Biol. Chem.* 1985; **260**:10531-10535). Isto permite que o fibrinogénio se ligue às plaquetas que conduz à agregação de plaquetas. Demonstrou-se que os inibidores de calpaína Phe-Gln-Val-Val-Cys(3-nitro-2-tiopiridino)-Gly-NH₂ e quinínogénio de peso molecular elevado bloqueiam a degradação de agregina e a agregação de plaquetas (Puri N., et al., *Am. J. Physiol.* 1990; **259**:C862; Puri R. N., et al., *Blood* 1991; **77**:500-507). Assim, os inibidores de calpaína descritos nesta patente devem ser inibidores eficazes da agregação de plaquetas.

Provas crescentes sugerem que a activação excessiva da protease calpaína dependente de Ca²⁺ pode desempenhar um papel numa diversidade de patologias: isquémia cerebral, cataratas, isquémia do miocárdio, distrofia muscular, e agregação de plaquetas (Wang, K. K. K., et al., *TIPS* 1994; **15**:412-419).



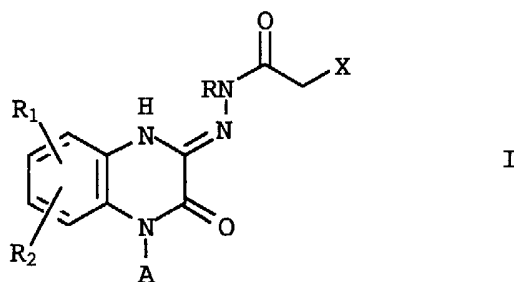
Os resultados demonstram que o efeito neuroprotector de um inibidor de calpaína penetrador nas células quando administrado sistemicamente e portanto direccionado para mecanismos intracelulares, activados por cálcio tais como proteólise é uma estratégia terapêutica viável para limitação da lesão neurológica após isquémia (Hong S.-C., et al., *Stroke* 1994; **25**:663-669).

Uma série de estudos demonstrou que um inibidor potente de calpaína, AK275, aplicado directamente nas superfícies de neocortex isquémico pode reduzir de forma dramática e inequívoca o tamanho do enfarte esperado (Bartus R. T., et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994; **14**:537-577).

O pedido de patente dos Estados Unidos co-pendente com o Número de Série 08/132.624 depositado em 21 de Maio de 1993, descreve uma série de ácidos α -mercaptoacrílicos como possuindo actividade inibidora potente de calpaína. Este pedido é aqui dado como incorporado por citação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona uma série de hidrazidas substituídas de Fórmula



os seus tautómeros ou isómeros e os seus sais de adição de base ou de ácido farmacologicamente aceitáveis em que R, R₁, R₂, A e X estão descritos adiante.



Estes não-péptidos selectivos inibem tanto a calpaína I como a calpaína II e são inibidores irreversíveis de sítios activos.

A presente invenção também inclui composições farmacêuticas compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos de Fórmula I conjuntamente com um veículo farmacêuticamente aceitável na forma de dosagem unitária.

A presente invenção inclui métodos para utilização dos compostos de Fórmula I para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas incluindo doenças cerebrovasculares bem como para o tratamento de lesões traumáticas do cérebro, lesões da medula espinal e/ou dos nervos periféricos, enfarte cardíaco, catarata, inflamação, restenose, distrofia muscular, e agregação de plaquetas.

A presente invenção também inclui um método para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de patologias que respondem ao bloqueamento de uma ou ambas a calpaína I e calpaína II compreendendo a administração a um mamífero, incluindo um ser humano, dela necessitado de uma quantidade terapeuticamente eficaz da composição acima referida.

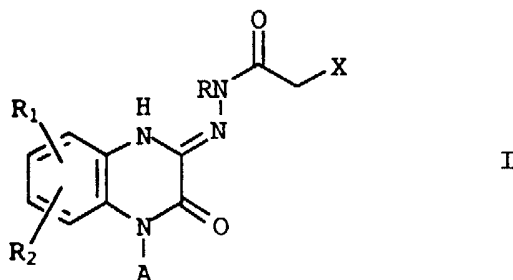
A invenção também inclui métodos para a preparação de composições farmacêuticas para o tratamento de derrame, isquémica cerebral, enfarte cerebral, vasospasmo cerebral, hipoglicémia, paragem cardíaca, doença de Alzheimer, lesão traumática do cérebro, lesão da medula espinal e/ou dos nervos periféricos, enfarte cardíaco, catarata, inflamação, restenose, distrofia muscular, e agregação de plaquetas.

A invenção inclui adicionalmente processos para a preparação de compostos de Fórmula I.

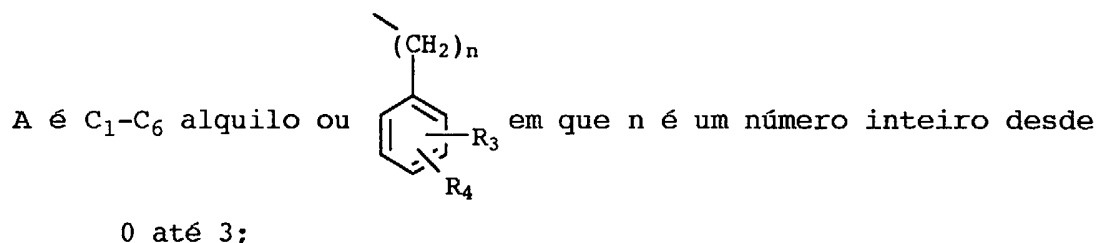
DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

Os compostos da presente invenção são inibidores não-peptídicos selectivos de calpaína.

As hidrazidas α -substituídas da presente invenção são as de Fórmula



os seus tautómeros e isómeros e um seu sal farmaceuticamente aceitável em que



R₁ e R₃ são cada um independentemente hidrogénio

C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogéneo, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquiloxi), C₂-C₆ alcenilo, C₂-C₆ alcinilo, arilo, que é não-substituído ou substituído por um ou mais de halogéneo, nitro, C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogéneo, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquiloxi), C₁-C₆ alquiloxi, C₁-C₆ alquiltio ou hidroxilo, fenilo, naftilo, e bifenilo),



heteroarilo, que é um grupo monocíclico com 5 ou 6 membros, bicíclico ou tricíclico, contendo pelo menos um até quatro heteroátomos no anel se for monocíclico ou em pelo menos um dos anéis, se for bicíclico ou tricíclico fundido,

arilaquilo, em que arilo e alquilo são como definidos acima,

arilalcenilo, em que arilo e alcenilo são como definidos acima,

arilalcinilo, em que arilo e alcinilo são como definidos acima,

heteroarilalquilo, em que heteroarilo e alquilo são como definidos acima,

heteroarilalcenilo, em que heteroarilo e alcenilo são como definidos acima,

heteroarilalcinilo, em que heteroarilo e alcinilo são como definidos acima;

R₂ e R₄ são cada um independentemente

hidrogénio,

halogéneo,

hidroxilo,

C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogéneo, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquiloxi, em que alquilo é como definido acima), amino, nitro, ciano, e

COOR₅ em que R₅ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, ou arilo tal como definido acima;

R é hidrogénio,

C₁-C₆ alquilo tal como definido acima, ou

arilo tal como definidos acima; e

X é halogéneo,

C₁-C₆ alquiloxi tal como definido acima, ou O₂CR₆ em que R₆ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, ou arilo tal como definidos acima.



Os compostos preferidos da invenção são os de Fórmula I em que

R₁ e R₃ são cada um independentemente hidrogénio;

R₂ e R₄ são cada um independentemente seleccionados de hidrogénio, halogéneo, hidroxilo, e COOR₅ em que R₅ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo tal como definido acima, ou arilo tal como definido acima;

R é hidrogénio ou C₁-C₆ alquilo tal como definido acima; e

X é halogéneo, ou O₂CR₆ em que R₆ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo tal como definido acima, ou arilo, tal como definido acima.

Os compostos mais preferidos da invenção são os de Fórmula I em que

R, R₁ e R₂ são hidrogénio;

A é metilo, fenilo, ou 4-clorofenilo; e

X é cloro ou bromo.

Os compostos ainda mais preferidos da invenção são os de Fórmula I e seleccionados de

(4-metil-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-cloro-acético;

(3-oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-bromo-acético;

[4-(4-cloro-fenil)-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno]-hidrazida do ácido 2-cloro-acético; e

(3-oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-cloro-acético.

Os grupos C₁-C₆ alquilo contemplados na presente invenção tais como alquilo *per se*, aminoalquilo, arilalquilo, heterocicloalquilo são tanto de cadeia de átomos de carbono linear como ramificada.

C₁-C₆ alquilo significa uma cadeia linear ou uma cadeia ramificada com desde um até seis átomos de carbono incluindo mas



não limitado a metilo, etilo, propilo, n-propilo, butilo, 2-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, n-hexilo, e outros semelhantes. Os grupos alquilo podem ser não-substituídos ou substituídos por um ou mais substituintes seleccionados de: halogéneo, amino e C₁₋₆ alquiloxi.

C₂-C₆ alcenilo significa um grupo com desde dois até seis átomos de carbono, contendo pelo menos uma ligação dupla. Estes são, por exemplo, mas não limitados a etileno, 1,2- ou 2,3-propileno, 1,2-, 2,3-, ou 3,4-butileno, 1,2-, 2,3-, 3,4- ou 4,5-pentileno, ou hexileno, ou os seus isómeros.

C₂-C₆ alcinilo significa um grupo com desde dois até seis átomos de carbono, contendo pelo menos uma ligação tripla. Estes são, por exemplo, mas não limitados a etinilo, 2,3-propinilo ou 3,4-butinilo, ou os seus isómeros.

Cicloalquilo significa um anel saturado com desde três até cerca de seis ou sete átomos de carbono. Esses grupos incluem mas não estão limitados a ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo que são não substituídos ou substituídos por um ou mais substituintes seleccionados de: halogéneo, alcoxi, alquilo, ou hidroxilo.

Cicloalcenilo significa um anel insaturado com desde quatro até seis átomos de carbono contendo uma ou duas ligações duplas carbono-carbono.

Heterociclo significa um grupo monocíclico com 5 ou 6 membros, bicíclico ou tricíclico, contendo pelo menos um até quatro heteroátomos num anel se for monocíclico ou em pelo menos um dos anéis, se for bicíclico ou tricíclico fundido. Os heteroátomos são azoto, oxigénio, ou enxofre ou uma sua combinação, quando possível. Esses heterociclos incluem tienilo, benzotienilo, furanilo, benzofuranilo, pirazinilo, pirazolilo, piridazinilo, piridilo, pirimidinilo, pirrolilo, isotiazolilo,



tiazolilo, oxazolilo, isoxazolilo, triazolilo, tetrazolilo, imidazolilo, tiadiazolilo, benzotiadiazolilo, oxadiazolilo, benzotiazolilo, indolilo, carbazolilo, quinolinilo, isoquinolinilo, ou os seus N-óxidos.

O termo arilo inclui fenilo, naftilo, e bifenilo substituídos ou não-substituídos. Os substituintes incluem um ou mais seleccionados de: halogéneo, nitro, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquiloxi, C₁-C₆ alquiltio, hidroxilo, ou outros tal como especificado acima.

O termo halogéneo inclui flúor, cloro, bromo, e iodo.

Grupos protectores bem conhecidos e a sua introdução e remoção podem ser utilizados de acordo com a arte e estão descritos, por exemplo, em McOmie J. F. W., *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, London, New York (1973), e Greene T. W., Wuts P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Second Edition, Wiley, New York (1991).

Os compostos da presente invenção podem conter átomos de carbono assimétricos. A presente invenção também pode incluir os diastereómeros e enantiómeros individuais, que podem ser preparados ou isolados por métodos conhecidos pelos especialistas na matéria.

Compostos seleccionados da presente invenção também podem existir como formas anti e sin e também estão reivindicados na presente invenção. Compostos seleccionados também podem existir como isómeros com ligação dupla E e Z. Ambas as formas estão incluídas na presente invenção.

Os compostos da presente invenção também podem existir em formas tautoméricas.



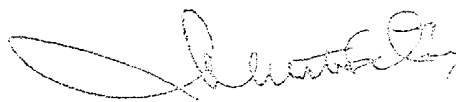
Qualquer racemato resultante pode ser resolvido nos antípodos ópticos por métodos conhecidos, por exemplo por separação dos seus sais diastereoméricos, com uma amina opticamente activa, e libertação do composto ácido opticamente activo por tratamento com um ácido. Os compostos racémicos da presente invenção podem ser assim ser resolvidos nos seus antípodos ópticos e.g., por cristalização fraccionada a partir de d- ou l- α -metil-benzilamina, brucina, quinidina, ou sais de quinina.

Pode utilizar-se métodos adicionais para a resolução de isómeros ópticos, conhecidos pelos especialistas na arte, por exemplo os discutidos por J. Jaques, A. Collet, e S. Wilen em *Enantiomers, Racemates, and Resolutions*, John Wiley and Sons, New York (1981).

Os sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos de Fórmula I também estão incluídos como parte da presente invenção.

Os sais de bases podem ser produzidos a partir de compostos de Fórmula I com um equivalente de uma base adequada, não-tóxica, farmacêuticamente aceitável seguida por evaporação da reacção do solvente utilizado e recristalização do sal, se necessário. Os compostos de Fórmula I podem ser recuperados do sal de base por reacção do sal com uma solução aquosa de um ácido adequado tal como ácido bromídrico, clorídrico, ou acético.

Bases adequadas para a formação de sais de bases dos compostos desta invenção incluem aminas tais como trietilamina ou dibutilamina, ou bases de metais alcalinos e bases de metais alcalino-terrosos. Hidróxidos de metais alcalinos e hidróxidos de metais alcalino-terrosos preferidos como formadores de sais são os hidróxidos de lítio, sódio, potássio, magnésio, ou cálcio. A classe de bases adequada para a formação de sais não-



tóxicos, farmacêuticamente aceitáveis é bem conhecida pelos praticantes das artes de formulação farmacêutica. Ver, por exemplo, Berge S. N., et al., *J. Pharm. Sci.* 1977; **66**:1-19.

Ácidos adequados para a formação de sais de ácido dos compostos desta invenção contendo um grupo básico incluem, mas não estão necessariamente limitados aos ácidos acético, benzóico, benzenossulfônico, tartárico, bromídrico, clorídrico, cítrico, fumárico, glucônico, glucurônico, glutâmico, láctico, málico, maleico, metanossulfônico, pamóico, salicílico, esteárico, succínico, sulfúrico, e tartárico. Os sais de adição de ácido são formados por procedimentos bem conhecidos na arte.

Além disso, os compostos desta invenção podem existir tanto em formas não-solvatadas como solvatadas com solventes farmacêuticamente aceitáveis tais como água, etanol, e outros semelhantes. Em geral, as formas solvatadas são consideradas equivalentes às formas não-solvatadas para efeitos da presente invenção.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados numa grande variedade de formas de dosagem orais e parentéricas. Será evidente para os especialistas na arte que as seguintes formas de dosagem podem compreender como componente activo, ou um composto de Fórmula I ou um correspondente sal farmacêuticamente aceitável de um composto de Fórmula I.

Para a preparação de composições farmacêuticas dos compostos da presente invenção, os veículos farmacêuticamente aceitáveis podem ser sólidos ou líquidos. As preparações na forma sólida incluem pós, comprimidos, pílulas, cápsulas, "cachets", supositórios, e grânulos dispersáveis. Um veículo sólido pode ser uma ou mais substâncias que também podem actuar como diluentes, agentes aromatizantes, solubilizantes, lubrificantes, agentes de suspensão, aglutinantes, conservantes,



agentes de desintegração de comprimidos, ou um material encapsulante.

Nos pós, o veículo é um sólido finamente dividido que se encontra em mistura com o componente activo finamente dividido.

Em comprimidos, o componente activo é misturado com adjuvantes com as necessárias propriedades aglutinantes em proporções adequadas e compactado na forma e tamanho desejados.

Os pós e comprimidos preferencialmente contêm desde 5% ou 10% até cerca de 70% do composto activo. Os veículos adequados são carbonato de magnésio, estearato de magnésio, talco, açúcar, lactose, pectina, dextrina, amido, gelatina, tragacanta, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, uma cera de baixo ponto de fusão, manteiga de cacau, e outros semelhantes. O termo "preparação" pretende incluir a formulação do composto activo com um material encapsulante como um veículo proporcionando uma cápsula em que o componente activo, com ou sem veículos, está rodeado por um veículo, que está assim em associação com ele. Analogamente, estão incluídos "cachets" e pastilhas. Os comprimidos, pós, cápsulas, pílulas, "cachets", e pastilhas podem ser utilizados como formas de dosagem sólidas adequadas para administração oral.

Para a preparação de supositórios, primeiro funde-se uma cera de baixo ponto de fusão, tal como uma mistura de glicéridos gordos ou manteiga de cacau, e o componente activo é nela disperso homogeneamente, tal como por agitação. A mistura homogénea fundida é então vertida em moldes de tamanho conveniente, deixada arrefecer, e assim solidifica.

As preparações na forma líquida incluem soluções, suspensões, e emulsões, por exemplo, soluções em água ou água e propileno glicol. Por exemplo, as preparações líquidas para



injecção parentérica podem ser formuladas em solução, tal como, em solução aquosa de polietileno glicol.

As soluções aquosas adequadas para utilização oral podem ser preparadas por dissolução do componente activo em água e adição de corantes, aromatizantes, estabilizantes, e agentes espessantes, consoante desejado.

As suspensões aquosas adequadas para utilização oral podem ser preparadas por dispersão do componente activo finamente dividido em água com material viscoso, tal como gomas naturais ou sintéticas, resinas, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, e outros agentes de suspensão bem conhecidos.

Também estão incluídas preparações na forma sólida que se destinam a ser convertidas, pouco antes da utilização, em preparações na forma líquida para administração oral. Essas formas líquidas incluem soluções, suspensões, e emulsões. Estas preparações podem conter, para além do componente activo, corantes, aromatizantes, estabilizantes, tampões, edulcorantes naturais e artificiais, dispersantes, espessantes, agentes solubilizantes, e outros semelhantes.

A preparação farmacêutica está preferencialmente na forma de dosagem unitária. Nessa forma, a preparação é subdividida em doses unitárias contendo quantidades apropriadas do componente activo. A forma de dosagem unitária podem ser uma preparação embalada, contendo a embalagem quantidades discretas de preparação, tais como comprimidos, cápsulas ou pós embalados em frascos ou ampolas. Além disso, a forma de dosagem unitária pode ser uma cápsula, comprimido, "cachet", ou pastilha propriamente dita, ou pode ser o número apropriado de qualquer destas na forma embalada.

A quantidade de componente activo numa preparação de dose unitária pode ser variada ou ajustada desde 0,1 mg até 1000 mg,



preferencialmente 10 mg até 100 mg de acordo com a aplicação particular e a potência do componente activo. A composição pode, se desejado, conter também outros agentes terapêuticos compatíveis.

Os compostos da presente invenção apresentam propriedades farmacológicas valiosas por inibição selectiva de proteases neutras dependentes de cálcio em mamíferos. Os compostos são por isso úteis para o tratamento de doenças que respondem à inibição de proteases neutras dependentes de cálcio em mamíferos.

Essas patologias incluem mas não estão limitadas a isquémia cerebral ou enfarte cerebral resultantes de uma gama de patologias tais como derrame tromboembólico ou hemorrágico, vasospasmo cerebral, hipoglicémia, paragem cardíaca, status epilepticus, e asfixia perinatal, anoxia tal como por afogamento, cirurgia pulmonar, e trauma cerebral. Outros tratamentos são para doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer, lesão da medula espinal e/ou de nervos periféricos, e envenenamento por venenos de NMDA exógenos (e.g., algumas formas de latirismo). Utilizações adicionais incluem o tratamento de enfarte cardíaco, catarata, inflamação, restenose, distrofia muscular, e agregação de plaquetas.

Especificamente, os compostos da presente invenção têm actividade como inibidores das proteases neutras dependentes de cálcio. Como tal, os compostos da presente invenção são inibidores de cisteíno proteinases específicas de calpaína.

Por exemplo, os compostos da invenção apresentam propriedades biológicas valiosas devido a estas propriedades inibidoras de proteases neutras dependentes de cálcio. Estas propriedades podem ser verificadas por um ou mais dos ensaios seguintes.



ENSAIOS BIOLÓGICOS

EXEMPLO 1

Doseamento da actividade de calpaína: Purificou-se calpaína I a partir de eritrócitos humanos tal como descrito por Wang K. K. W., Roufogalis B. D., e Villalobo A., *Arch. Biochem. Biophys.* 1988; **267**:317-327. A actividade de calpaína foi doseada num formato em microplaca com 96 poços (Buroker-Kilgore M. e Wang K. K. W., *Anal. Biochem.* 1993; **208**:387-392). Em 250 μL de mistura reaccional, incubou-se caseína substrato (0,5 mg/mL) com 0,01 unidades (80-120 ng) de calpaína I, 20 mM de ditionotreitól (DTT), 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4 a 25°C) e 4 mM de CaCl_2 a 25°C durante 60 minutos. Retirou-se duas alíquotas de 100 μL para análise de ligação com Azul de Coomassie para quantificar a caseína remanescente.

Como se pode verificar pelos resultados da Tabela I, as hidrazidas α -substituídas listadas apresentaram potência variada contra calpaína I e II neste ensaio *in vitro*. As concentrações de composto que produzem 50% de inibição (IC_{50}) são tal como indicado (Tabela I). Também está apresentada a taxa em segundos da inactivação de calpaína I para 2 compostos.

TABELA I. Actividade Inibidora de Hidrazidas α -Substituídas contra Calpaína I e II Humana

Exemplo	IC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)	$\text{K}_i/[\text{I}]$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
	Calpaína I	Calpaína II	
5	0,364	0,590	109
4	0,697	0,574	ND
9	0,486	0,158	63,7
14	8,28	10,84	ND

ND = Não determinada.



EXEMPLO 2

Selectividade de Hidrazidas α -Substituídas: Doseou-se calpaína I e II tal como descrito no Exemplo 1. Doseou-se uma a 2 ng de papaína (látex de papaia, Sigma, P3125), 1,25 μ g de tripsina (de pâncreas bovino, Sigma, T8003), 5 μ g de termolisina (*Bacillus thermoproteolyticus*, Sigma, P1512) utilizando 0,5 mg/mL de caseína como substrato no formato em microplacas (volume de reacção de 250 μ L), essencialmente tal como descrito por Buroker-Kilgore, M. e Wang K. K. W., *Anal. Biochem.* 1993; **208**:387-392. Doseou-se catepsina B (0,002 unidades, baço de bovino) com 50 mM de MES (pH 5,5), 100 μ M de carbobenzoxy-Arg-Arg-4-metoxi-nafatlamida (Cbz-Arg-Arg-MNA), inibidor, e 2 mM de DTT em 200 μ L durante 60 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se alíquotas de cinquenta microlitros para uma placa compatível com fluorescência e em seguida leu-se com um fluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (excitação a 340 nm e emissão a 425 nm). Doseou-se calcineurina (de cérebro de bovino, Sigma) (5 μ g, 0,8 unidades) com 10 mM de fosfato de p-nitrofenilo em 1 mM de DTT, 1 mM de CaCl_2 , 1 mM de MnCl_2 , 200 μ M de calmodulina (CaM, se adicionado), e 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4) a 25°C durante 60 minutos ou mais. A produção de p-nitrofenol foi monitorizada a 405 nm. A inibição destas proteases é apresentada como IC₅₀.

Tal como apresentado na Tabela 2, um exemplo de uma hidrazida α -substituída inibiu a Calpaína I e II com uma IC₅₀ entre 0,36 μ M a 0,59 μ M mas não inibiu a tripsina (uma serino protease) ou a metaloprotease termolisina. A papaína (uma cisteíno protease) foi inibida a concentrações mais elevadas. Assim, estes resultados mostraram que as hidrazidas α -substituídas apresentaram boa selectividade para calpaína em relação a outras proteases.



TABELA II. Actividade Inibidora da Hidrazida α -Substituída do
Exemplo 5 Contra Várias Proteases

Protease	IC ₅₀ (μ M)
Calpaína I	0,364
Calpaína II	0,590
Catepsina B	>200
Papaína	5,6
Tripsina	>200
Termolisina	>500
Calmodulina-calcineurina	>500

EXEMPLO 3

Doseamento de calpaína de base celular: Anteriormente, demonstrou-se que o tratamento com A23187 de células Molt-4 de leucemia humana conduz a uma degradação distinta de espectrina por calpaína endógena, nomeadamente a formação de fragmentos de 150 kD e 145 kD sequencialmente (Saïdo, et al., *J. Biol Chem.* 1992; 267:24585-24590). Nos presentes estudos, lavou-se células Molt-4 três vezes com meio RPMI 1640 isento de soro e ressuspendeu-se até 4 milhões/0,5 mL e pré-incubou-se durante 1 hora. Para activar adicionou-se então calpaína endógena, 15 μ M de A23187 (como uma solução-mãe 5 mM em DMF), e as células foram incubadas durante mais 90 minutos a 37°C. As células foram então lisadas com SDS a 2% (p/v), 5 mM de EGTA, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 0,5 mM de PMSF, 10 μ g/mL de AEBSF, 5 μ g/mL de leupeptina, 10 μ g/mL de pepsatina, 10 μ g/mL de TLCK, 10 μ g/mL de TPCK, e 20 mM de Tris-Hcl (pH 7,4) à temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. Adicionou-se cem microlitros de TCA 1 100% (p/v) e o precipitado de proteína total foi recolhido por microcentrifugação. Os sedimentos finais foram neutralizados com Tris base. Eluiu-se amostras de proteína (50 μ g) em SDS-PAGE com o sistema tampão de eluição de Tris-glicina e transferiu-se para uma membrana de PVDF. As manchas foram testadas com um anticorpo de anti-espectrina (não-eritróide) e um segundo anticorpo com



conjugado de fosfatase alcalina. As manchas foram reveladas com azul de nitro tetrazólio e fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo. O pré-tratamento das células com hidrazidas α -substituídas diminuiu a formação do fragmento com 145 kD com uma IC₅₀ de 15 a 25 μ M (Tabela III).

TABELA III. Actividade Inibidora de Hidrazidas α -Substituídas Sobre a Degradação de Espectrina em Células Molt-4 de Leucemia Humana Tratadas com o Ionóforo de Cálcio A23187

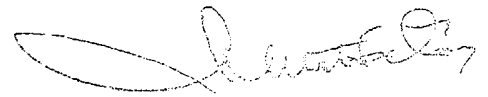
Exemplo	IC ₅₀ (μ M)
5	25
4	25
9	15

EXEMPLO 4

Efeitos Neuroprotectores de Hidrazidas α -Substituídas em Culturas de Neurónios Cerebrocorticais

(i) Doseamento de Lactato desidrogenase (LDH): Cultivou-se células corticais fetais de rato em placas com 12 poços tal como descrito por Koh J. Y., Choi D. W., *J. Neurosci. Methods* 1987; **20**:83-90). Pré-tratou-se culturas com setenta dias com 200 μ M de composto inibidor de calpaína (quando adicionado) durante 1 hora antes do tratamento de 500 μ M de D-aspartato de N-metilo (NMDA) durante 30 minutos (na ausência ou na presença do composto). após mais 4 horas na ausência ou na presença do composto (Exemplo 5), realizou-se a determinação da libertação de LHD de neurónios para o meio como uma medida da morte celular induzida por NMDA analogamente ao descrito por Koh J. Y., Choi D. W., *J. Neurosci. Methods* 1987; **20**:83-90).

Os resultados apresentados na Tabela IV mostram que 195 minutos de hipoxia/hipoglicémia induziram cerca de 170 unidades/mL de libertação de LHD das células. Também se



verificou que o Exemplo 5 de hidrazida α -substituída permitiu que os neurónios resistissem à privação de oxigénio/glucose durante mais tempo, como reflectido pela libertação de LDH após 24 horas.

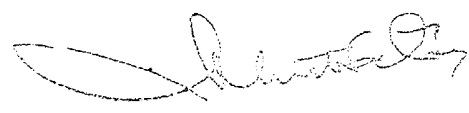
TABELA IV. Efeitos do Composto do Exemplo 5 sobre a Libertação de LDH Induzida por Privação de Oxigénio/Glucose de Culturas Cerebrocorticais Fetais de Rato

Condições	Libertação de LDH (Unidades/mL)
Normoxia	46,13 $\pm$ 6,08 (6)
Hipoxia/Hipoglicémia	143,81 $\pm$ 9,72 (6)
Composto do Exemplo 5	57,27 $\pm$ 8,11 (6)**

Os resultados apresentados são médias e EPM. O número de experiências realizadas está indicado entre parêntesis.

** Significativamente diferente de Hipoxia/Hipoglicémia só ($p < 0,001$).

(ii) Efeitos neuroprotectores do composto do Exemplo 5 contra a toxicidade de AMPA para células Purkinje em lâminas cerebelares: Isolou-se lâminas cerebelares rapidamente de ratos adultos e manteve-se num banho oxigenado durante a duração da experiência tal como descrito noutro local (Caner, et al., *Brain Research* 1993; 607:354-356). Adicionou-se Exemplo 5 (100 μ M) a ACSF (124 mM de NaCl, 3,3 mM de KCl, 2 mM de CaCl₂, 25,7 mM de NaHCO₃, 2,4 mM de MgSO₄, 1,25 mM de KH₂PO₄, 10 mM de glucose) 60 minutos antes da adição de ácido aminio-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propiónico (AMPA; 30 μ M durante 30 minutos). Deixou-se então que as lâminas recuperassem em ACSF normal durante mais 90 minutos. Identificou-se e quantificou-se as lesões histológicas produzidas nas células Purkinje tal como descrito em pormenor noutro local (Caner, et al., *Brain Research* 1993; 607:354-356).



Os resultados apresentados na Tabela V mostraram que a neurotoxicidade induzida por AMPA pode ser melhorada com o composto do Exemplo 5.

No seu conjunto, os resultados apresentados acima mostram que as hidrazidas α -substituídas descritas acima são neuroprotectoras.

TABELA V. Efeitos Neuroprotectores do Composto do Exemplo 5 Contra a Toxicidade de AMPA para Células Purkinje em Lâminas Cerebelares

Condições	% de Neurónios Purkinje Vivos
Controlo	94,41 $\pm$ 0,97 (10)
AMPA	13,41 $\pm$ 2,34 (10)
AMPA + Composto do Exemplo 5	51,03 $\pm$ 4,80 (10)**

Os resultados apresentados são médias e EPM. O número de experiências realizadas está indicado entre parêntesis.

** Significativamente diferente do tratamento com AMPA só ($p < 0,005$).

Consequentemente, os compostos de Fórmula I e os seus sais farmaceuticamente aceitáveis são agentes eficazes para a profilaxia e/ou tratamento terapêutico de patologias que respondem a agentes que inibem proteases neutras dependentes de cálcio, constituindo analogamente assim um aspecto adicional da presente invenção.

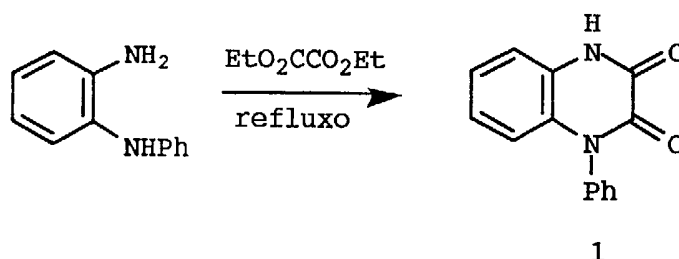
Em vista dos resultados apresentados prevê-se que os compostos novos da presente invenção sejam úteis para o tratamento de patologias do sistema nervoso central relacionadas com a sua actividade biológica. Isto inclui alívio, tratamento ou eliminação de uma indicação associada à actividade biológica. Isto inclui especialmente psicose relacionada com calpaína, anorexia relacionada com calpaína, isquémica relacionada com calpaína, derrame, vasospasmo cerebral, lesão traumática do

[Handwritten signature]

cérebro, e lesão da medula espinal e/ou dos nervos periféricos. Também inclui enfarte cardíaco, catarata, inflamação, restenose, distrofia muscular, e agregação de plaquetas.

Os exemplos seguintes são ilustrativos da presente invenção mas não têm a intenção de limitar o seu âmbito.

EXEMPLO QUÍMICO 1



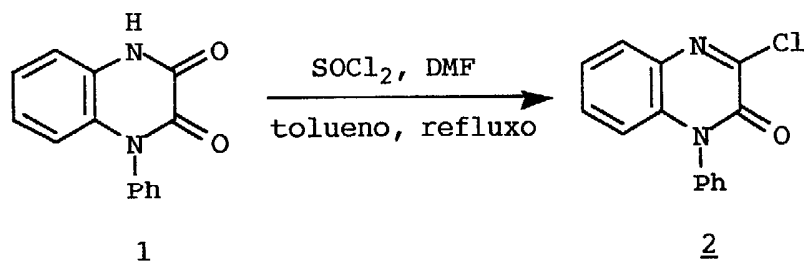
Referência: Cheeseman G. W. H., *J. Chem. Soc.*, 1804 (1995).

Aqueceu-se uma solução de N-fenil-o-fenilenodiamina (10,79 g, 58,56 mmol) em 25 mL de oxalato de dietilo a refluxo durante 5 horas. A suspensão de cor azul foi arrefecida até à temperatura ambiente e diluída com etanol (60 mL). O sólido foi recolhido e lavado com etanol (2 x 60 mL). O sólido cinzento foi seco sob vácuo para dar 9,59 g da quinoxalinodiona 1. Foi utilizada sem purificação adicional.

¹HRMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 12,14 (1H, s), 7,66-7,53 (3H, m), 7,39 (2H, d, J=7,02 Hz), 7,23 (1H, dd, J=7,93, 1,39 Hz), 7,14 (1H, dt, J=8,48, 1,16 Hz), 6,98 (1H, dt, J=8,14, 1,08 Hz), 6,31 (1H, d, J=7,33 Hz).

Handwritten signature

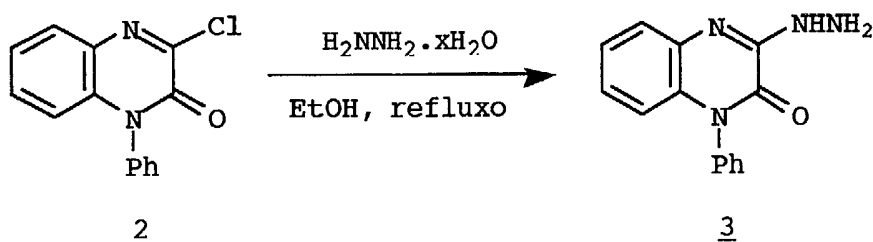
EXEMPLO 2



A uma suspensão da quinoxalinodiona 1 (4,38 g, 18,38 mmol) em tolueno (175 mL) e dimetilformamida (11 mL) adicionou-se cloreto de tionilo (2 mL, 27,42 mmol). A suspensão acinzentada foi aquecida a refluxo durante 4 horas. No final do período de 4 horas, a solução verde foi arrefecida até à temperatura ambiente. Adicionou-se água (100 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 15 minutos. A camada orgânica foi recolhida e seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada. O resíduo foi redissolvido em acetato de etilo (250 mL). Adicionou-se carvão activado (3 g) e a mistura foi aquecida a refluxo. A mistura foi filtrada a quente para remover o carvão activado. O resíduo foi lavado com acetato de etilo (3 x 60 mL). O filtrado e as lavagens foram concentrados para dar um sólido. O sólido foi triturado a quente com 20% de acetato de etilo em hexanos (200 mL). O sólido esbranquiçado foi recolhido por filtração e depois seco ao ar de um dia para o outro para dar 3,50 g do Composto 2 clorado.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 7,84 (1H, dd, $J=7,90$, 1,46 Hz), 7,70-7,61 (3H, m), 7,50-7,37 (4H, m), 6,56 (1H, dd, $J=8,24$, 1,22 Hz).

EXEMPLO 3



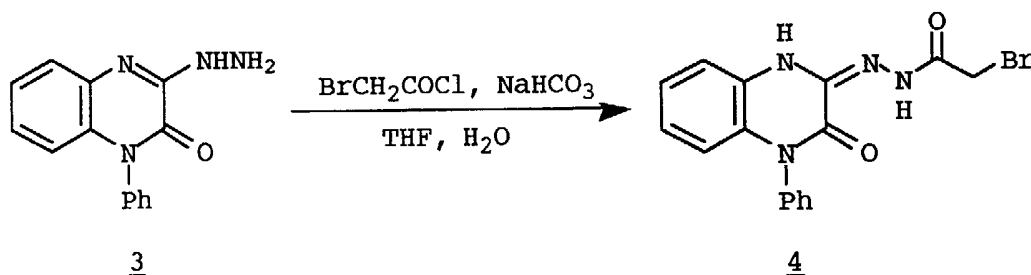
[Handwritten signature]

A uma suspensão do Composto 2 clorado (1,87 g, 7,29 mmol) em etanol absoluto (20 mL) adicionou-se hidrato de hidrazina (8,8 mL). A mistura foi aquecida a refluxo durante 1 hora. A mistura reaccional foi arrefecida a 0°C e diluída com água (12 mL). O precipitado esbranquiçado foi recolhido e lavado com água (2 x 30 mL) e depois com éter (30 mL). O sólido foi então seco ao ar para dar 1,68 g do produto.

¹HRMN (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,95 (1H, s largo), 7,67-7,58 (3H, m), 7,47 (1H, d, J=7,86 Hz), 7,40 (2H, d, J=7,09 Hz), 7,8 (1H, t, J=7,60 Hz), 7,01 (1H, t, J=7,70 Hz), 6,37 (1H, d, J=8,59 Hz), 4,63 (2H, s largo).

EXEMPLO 4

(3-Oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-bromo-acético



A uma solução da hidrazona 3 (1,06 g, 4,20 mmol) em 100 mL de tetrahidrofurano adicionou-se uma solução aquosa 1 M de bicarbonato de sódio (15 mL). Adicionou-se lentamente cloreto de bromoacetilo (0,5 mL, 6,06 mmol) à mistura reaccional à temperatura ambiente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 20 minutos. Adicionou-se água (50 mL) e a mistura foi saturada com brometo de sódio. A camada orgânica foi recolhida e a camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x 50 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas para dar 0,94 g de um sólido castanho. O sólido foi dissolvido em 50 mL de metanol quente, tratado com carvão activado, filtrado, e arrefecido até

Handwritten signature

à temperatura ambiente para dar 0,62 g da hidrazida 4 como um sólido branco; p.f. = 215°C (dec).

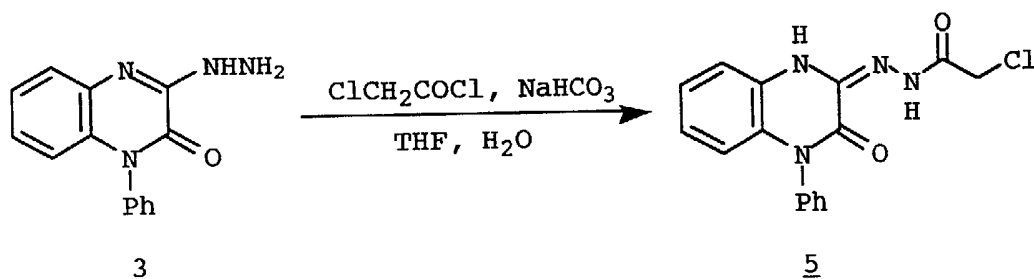
Anal. Cald. para $C_{16}H_{13}BrN_4O_2$:

C, 51,49; H, 3,51; N, 15,01.

Encontrada: C, 52,27; H, 3,51; N, 15,15.

EXEMPLO 5

(3-Oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-cloro-acético

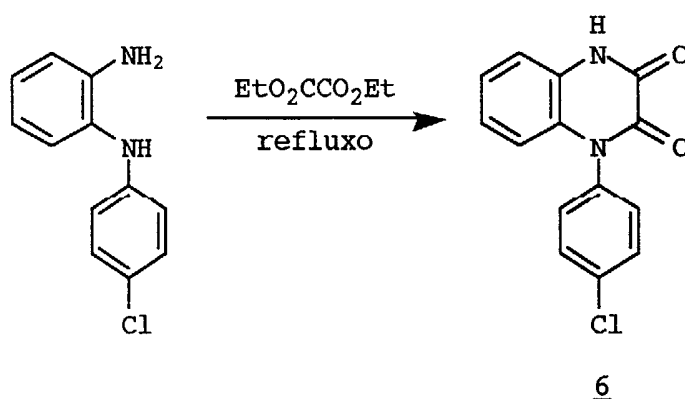


A uma solução da hidrazona 3 (2,38 g, 9,43 mmol) em 200 mL de tetrahidrofurano adicionou-se 75 mL de uma solução semi-saturada de bicarbonato de sódio. A mistura reaccional foi arrefecida a 0°C e adicionou-se lentamente cloreto de cloroacetilo (1 mL, 12,56 mmol). A mistura reaccional foi agitada a 0°C durante 30 minutos. A mistura foi saturada com cloreto de sódio e a camada orgânica foi recolhida. A camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x 100 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas para dar um sólido esbranquiçado. O sólido foi recristalizado de metanol para dar 2,45 g da hidrazida.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10,41 (1H, s largo), 8,55 (1H, s largo), 7,63-7,53 (3H, m), 7,48-7,39 (2H, m), 7,17 (1H, t, $J=7,57$ Hz), 7,07 (1H, t, $J=7,69$ Hz), 6,38 (1H, d, $J=8,06$ Hz), 4,21 (2H, s).

Handwritten signature

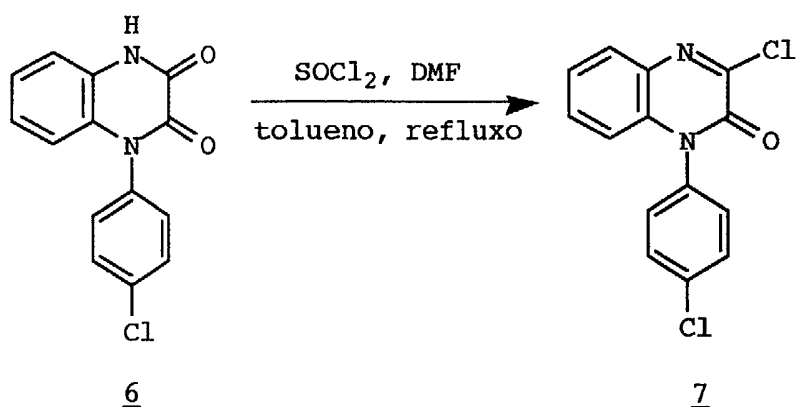
EXEMPLO 6



Aqueceu-se uma mistura de 2-amino-4'-clorodifenilamina (15,08 g, 68,96 mmol) e oxalato de dietilo (27,49 g, 1,88 mol) a refluxo durante 4 horas. A suspensão de cor púrpura foi arrefecida até à temperatura ambiente. Adicionou-se etanol (60 mL). O sólido foi recolhido por filtração e lavado com etanol (5 x 60 mL).

$^1\text{HRMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 12,20 (1H, s), 7,65–7,54 (3H, m), 7,39 (2H, d, $J=7,23$ Hz), 7,23 (1H, d, $J=2,17$ Hz), 7,04 (1H, dd, $J=8,92, 2,41$ Hz), 6,29 (1H, d, $J=8,92$ Hz).

EXEMPLO 7



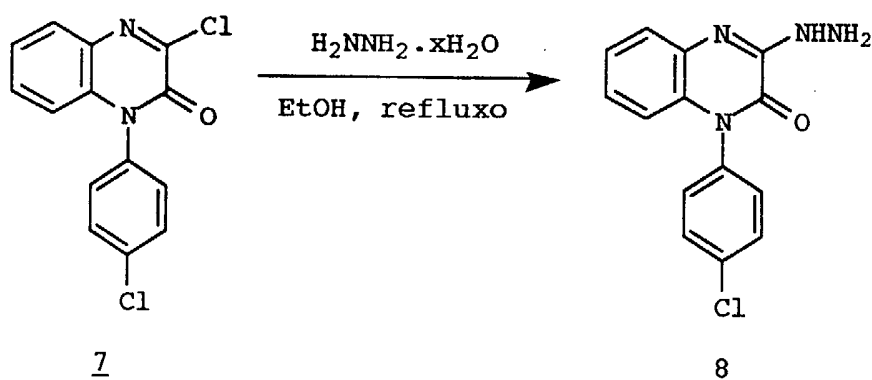
A uma suspensão da quinoxalinodiona 6 (8,89 g, 32,60 mmol) em 360 mL de tolueno adicionou-se 23 mL de dimetilformamida e

Handwritten signature

cloreto de tionilo (5 mL, 68,55 mmol). A suspensão foi aquecida a refluxo durante 4 horas. A solução azul escura foi arrefecida até à temperatura ambiente. Adicionou-se água (200 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 10 minutos. A camada orgânica foi recolhida e a camada aquosa foi reextraída com éter (2 x 200 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas para dar um sólido púrpura. O sólido foi triturado com solução de 5% de acetato de etilo em hexanos. O sólido cinzento foi recolhido por filtração e seco ao ar para dar 7,59 g de produto.

$^1\text{HRMN}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 7,96 (1H, d, $J=2,37$ Hz), 7,71-7,44 (6H, m), 6,56 (1H, d, $J=8,98$ Hz).

EXEMPLO 8



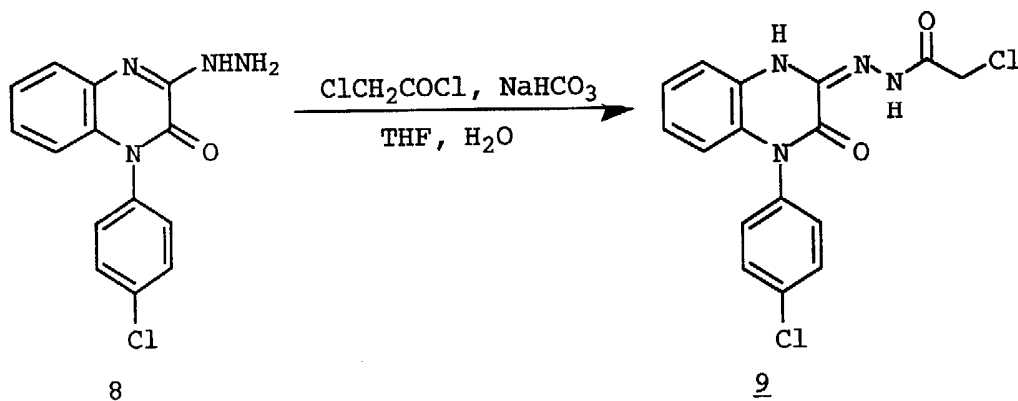
A uma suspensão da cloroimina **7** (7,38 g, 60,41 mmol) em 75 mL de etanol adicionou-se hidrazina (31 mL). A mistura foi aquecida a refluxo durante 1 hora. A mistura reaccional foi arrefecida até à temperatura ambiente e diluída com 45 mL de água. O sólido foi recolhido por filtração e depois lavado com água (2 x 60 mL), metanol (1 x 30 mL) e éter (2 x 40 mL). O sólido púrpura claro foi seco ao ar para dar 6,68 g da hidrazona **8**.

$^1\text{HRMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ 9,30 (1H, s), 7,66-7,55 (3H, m), 7,42-7,40 (2H, m), 7,02 (1H, dd, $J=8,92, 2,41$ Hz), 6,34 (1H, d, $J=8,68$ Hz), 4,74 (2H, s).

Handwritten signature

EXEMPLO 9

[4-(4-Cloro-fenil)-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno]-
hidrazida do ácido 2-cloro-acético



A uma solução da hidrazona 8 (3,58 g, 12,49 mmol) em 250 mL de tetrahydrofurano adicionou-se 100 mL de uma solução semi-saturada de bicarbonato de sódio. Adicionou-se lentamente cloreto de cloroacetilo (1,5 mL, 18,83 mmol) à mistura reaccional à temperatura ambiente. A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Adicionou-se água (100 mL) e em seguida a mistura foi saturada com cloreto de sódio. A camada orgânica foi recolhida e a camada aquosa foi extraída com acetato de etilo (3 x 70 mL). As camadas orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas para dar um óleo castanho. O sólido foi dissolvido em 200 mL de metanol quente. Adicionou-se carvão activado (2,5 g) e a mistura foi aquecida à fervura. A mistura foi filtrada a quente e o filtrado foi deixado arrefecer até à temperatura ambiente. Obteve-se um sólido branco que foi recolhido por filtração e lavado com éter (2 x 60 mL). O sólido foi seco ao ar para dar 2,88 g da hidrazida 9; p.f. = 213-214°C.

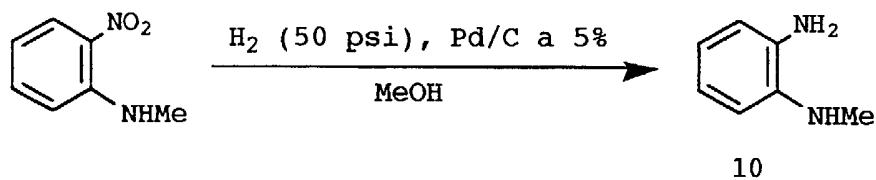
Anal. Cald. para C₁₆H₁₂Cl₂N₄O₂:

C, 52,91; H, 3,33; N, 15,43.

Encontrada: C, 53,14; H, 3,34; N, 15,44.

Handwritten signature

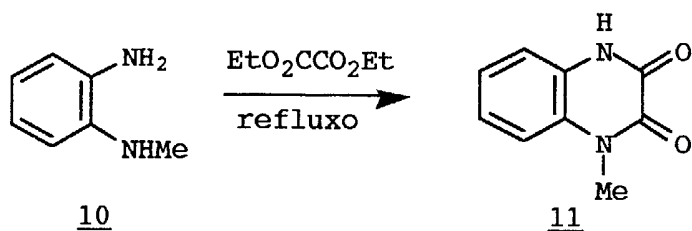
EXEMPLO 10



Uma mistura de N-metil-o-nitroanilina (16,3 g, 0,107 mol) e catalisador Pd/C a 5% (0,6 g) em 100 mL de metanol foi agitada num agitador Parr sob 50 psi de hidrogênio durante 3,5 horas. O catalisador foi removido por filtração e o filtrado foi concentrado para dar um óleo escuro. O óleo foi então passado através de uma coluna de sílica gel eluída com 50% de acetato de etilo em hexanos para retirar as impurezas da linha de base. Obteve-se a diamina 10 com rendimento de 13,76 g como um óleo cor de laranja.

¹HRMN (300 MHz, CDCl₃) δ 6,91-6,67 (4H, m), 3,35 (3H, s), 2,88 (3H, s).

EXEMPLO 11

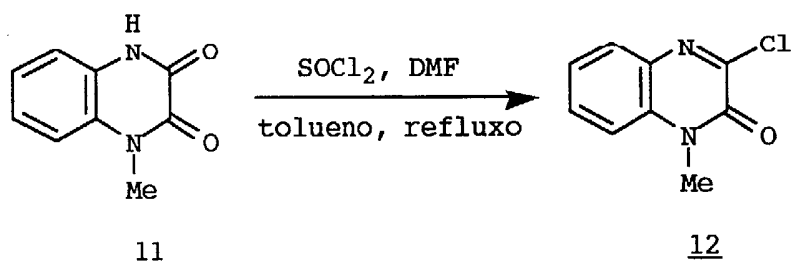


Aqueceu-se uma mistura da diamina 10 (7,38 g, 60,41 mmol) e oxalato de dietilo (24 g, 0,164 mol) a refluxo de um dia para o outro. A suspensão azul foi arrefecida até à temperatura ambiente e depois diluída com etanol (20 mL). Os precipitados foram recolhidos por filtração e lavados com etanol (2 x 40 mL). O sólido azul resultante foi recristalizado de metanol (800 mL) para dar 6,76 g da quinoxalinodiona 11 como um pó cinzento.

Handwritten signature

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,02 (1H, s), 7,37-7,33 (1H, m), 7,21-7,16 (3H, m), 3,51 (3H, s).

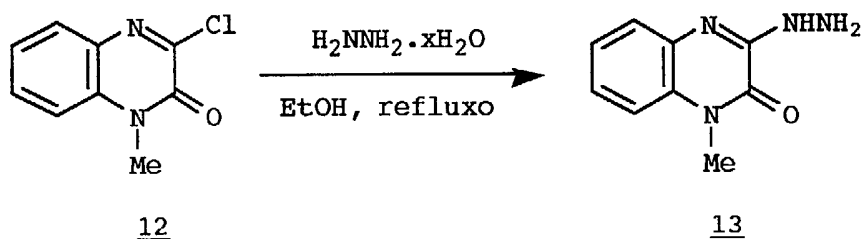
EXEMPLO 12



A uma suspensão da quinoxalinodiona 11 (1,87 g, 10,61 mmol) em 120 mL de tolueno anidro e 6 mL de dimetilformamida anidra adicionou-se cloreto de tionilo (1,2 mL, 16,45 mmol). A mistura reaccional foi aquecida a refluxo de um dia para o outro. A solução castanha foi arrefecida até à temperatura ambiente. Adicionou-se água (50 mL) para remover o excesso de dimetilformamida. A camada orgânica foi recolhida e seca com sulfato de magnésio. A mistura foi filtrada e concentrada para dar 2,1 g da cloroimina 12 como um sólido castanho. O material foi utilizado sem purificações adicionais.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,78-7,30 (4H, m), 3,74 (3H, s).

EXEMPLO 13



A uma suspensão da cloroimina 12 (2,1 g, 10,79 mmol) em 30 mL de etanol adicionou-se hidrato de hidrazina (13 mL). A

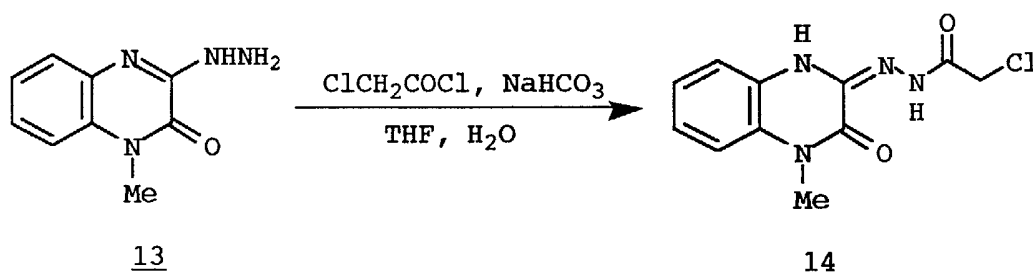
[Handwritten signature]

mistura foi aquecida a refluxo durante 1 hora, depois foi arrefecida até à temperatura ambiente e diluída com 20 mL de água. O precipitado amarelo foi recolhido por filtração e seco ao ar. Foi então recristalizado em 60 mL de etanol para dar 1,56 g da hidrazona 13 como agulhas esbranquiçadas.

$^1\text{HRMN}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7,65-7,55 (1H, m), 7,38 (1H, s largo), 7,35-7,20 (3H, m), 4,09 (1H, s), 4,08 (1H, s), 3,72 (3H, s).

EXEMPLO 14

(4-Metil-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-hidrazida do ácido 2-cloro-acético



A uma solução da hidrazona 13 (1,13 g, 5,94 mmol) em 60 mL de tetrahydrofurano anidro a 0°C adicionou-se cloreto de cloroacetilo (0,52 mL, 6,53 mmol). A mistura reaccional transformou-se imediatamente numa suspensão branca. A suspensão foi agitada a 0°C durante 15 minutos e depois à temperatura ambiente durante 1 hora. Adicionou-se solução saturada de bicarbonato de sódio (100 mL). A mistura reaccional transformou-se numa solução amarela e um precipitado branco reapareceu lentamente por agitação adicional. A mistura reaccional foi agitada à temperatura ambiente durante 15 minutos. O precipitado foi recolhido por filtração. O sólido foi lavado com água (3 x 60 mL) seguida por éter (2 x 60 mL). O sólido foi recristalizado em 550 mL de etanol para dar 1,24 g da hidrazida 14 como um pó branco, p.f. = 194-195°C (dec).

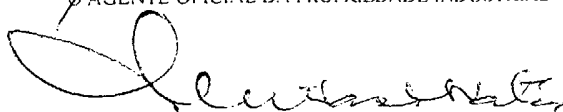
Anal. Cald. para $C_{11}H_{11}ClN_4O_2$:

C, 49,54; H, 4,16; N, 20,59.

Encontrada: C, 49,40; H, 4,10; N, 20,59.

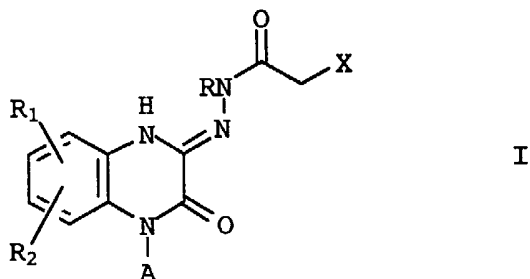
Lisboa, 6 de Dezembro de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



REIVINDICAÇÕES

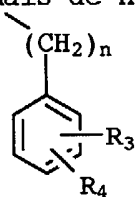
1. Composto de Fórmula



os seus tautômeros e isômeros e um seu sal farmacêuticamente aceitável em que

A é C₁-C₆ alquilo que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogênio, hidroxilo, amino

ou C₁-C₆ alquilo ou



em que n é um número inteiro

desde 0 até 3;

R₁ e R₃ são cada um independentemente

hidrogênio

C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogênio, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquilo), C₂-C₆ alcenilo, C₂-C₆ alcinilo, arilo que é fenilo, naftilo, e bifenilo, que é não-substituído ou substituído por um ou mais de halogênio, nitro, C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogênio, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquilo), C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ alquiltio ou hidroxilo, fenilo, naftilo, e bifenilo),



heteroarilo, que é um grupo monocíclico com 5 ou 6 membros, bicíclico ou tricíclico, contendo pelo menos um até quatro heteroátomos no anel se for monocíclico ou em pelo menos um dos anéis, se for bicíclico ou tricíclico fundido,
arilaquilo, em que arilo e alquilo são como definidos acima,
arilalcenilo, em que arilo e alcenilo são como definidos acima,
arilalcinilo, em que arilo e alcinilo são como definidos acima,
heteroarilalquilo, em que heteroarilo e alquilo são como definidos acima,
heteroarilalcenilo, em que heteroarilo e alcenilo são como definidos acima,
heteroarilalcinilo, em que heteroarilo e alcinilo são como definidos acima;

R₂ e R₄ são cada um independentemente

hidrogénio,

halogéneo,

hidroxilo,

C₁-C₆ alquilo (que pode ser não-substituído ou substituído por um ou mais de halogéneo, hidroxilo, amino ou C₁-C₆ alquilo, em que alquilo é como definido acima), amino, nitro, ciano, e

COOR₅ em que R₅ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, ou arilo tal como definido acima;

R é hidrogénio,

C₁-C₆ alquilo tal como definido acima, ou

arilo tal como definido acima; e

X é halogéneo,

C₁-C₆ alquilo tal como definido acima, ou O₂CR₆ em que R₆ é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo, ou arilo tal como definidos acima.



2. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que
R₁ e R₃ são cada um independentemente hidrogénio;
R₂ e R₄ são cada um independentemente seleccionados de
hidrogénio, halogéneo, hidroxilo, e COOR₅ em que R₅
é hidrogénio, C₁-C₆ alquilo tal como definido acima,
ou arilo que é fenilo, naftilo, e bifenilo
substituído ou não-substituído tal como definido
acima;
R é hidrogénio ou C₁-C₆ alquilo tal como definido acima; e
X é halogéneo, ou O₂CR₆ em que R₆ é hidrogénio, C₁-C₆
alquilo tal como definido acima, ou arilo, tal como
definido acima.
3. Composto de acordo com as reivindicações 1 ou 2 em que
R, R₁ e R₂ são cada um hidrogénio;
A é metilo, fenilo, ou 4-clorofenilo; e
X é cloro ou bromo.
4. Composto de acordo com as reivindicações 1 a 3
seleccionado de:
(4-metil-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-
hidrazida do ácido 2-cloro-acético;
(3-oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-
hidrazida do ácido 2-bromo-acético;
[4-(4-cloro-fenil)-3-oxo-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-
ilideno]-hidrazida do ácido 2-cloro-acético; e
(3-oxo-4-fenil-3,4-dihidro-1H-quinoxalin-2-ilideno)-
hidrazida do ácido 2-cloro-acético.
5. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade
terapeuticamente eficaz de um composto de acordo com as
reivndicações 1 a 4 conjuntamente com um veículo
farmaceuticamente aceitável em forma de dosagem unitária.
6. Utilização de um composto de acordo com as reivndicações 1
a 4 para o fabrico de uma composição farmacêutica para o

tratamento de patologias que respondem ao bloqueamento de uma ou ambas de calpaína I e calpaína II e para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

7. Utilização de um composto de acordo com as reivindicações 1 a 4 para o fabrico de uma composição farmacêutica para o tratamento de patologias que respondem ao bloqueamento de uma ou ambas de calpaína I e calpaína II e para o tratamento de derrames.
8. Utilização de um composto de acordo com as reivindicações 1 a 4 para o fabrico de uma composição farmacêutica para o tratamento de patologias que respondem ao bloqueamento de uma ou ambas de calpaína I e calpaína II e para o tratamento de lesões traumáticas do cérebro.
9. Utilização de um composto de acordo com as reivindicações 1 a 4 para o fabrico de uma composição farmacêutica para o tratamento de patologias que respondem ao bloqueamento de uma ou ambas de calpaína I e calpaína II e para o tratamento da restenose.

Lisboa, 6 de Dezembro de 2001

AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

