



Patentdirektoratet  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3704/84

(22) Indleveringsdag: 30 jul 1984

(41) Alm. tilgængelig: 04 feb 1985

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 13 okt 1997

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 03 aug 1983 DE 3328365

(51) Int.Cl.6

A 61 K 49/00

C 07 D 207/46

C 07 D 211/94

C 07 D 405/12

C 07 G 17/00

C 07 K 17/00

//C 07 D 405/12,

C 07 D 207:00,

C 07 D 317:00)

(C 07 D 405/12,

C 07 D 207:00,

C 07 D 321:00)

(C 07 D 405/12,

C 07 D 211:00,

C 07 D 317:00)

(73) Patenthaver: \*SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT; Muellerstrasse 170-178;

Berlin und Bergkamen; 1 Berlin 65, DE

(72) Opfinder: Heinz \*Gries; DE, Ulrich \*Niedballa; DE, Hanns-Joachim \*Weinmann; DE

(74) Fuldmægtig: Chas. Hude A/S

(54) Diagnostiske midler indeholdende nitroxylforbindelser, samt hidtil ukendte nitroxylforbindelser og fremgangs-  
måde til deres fremstilling

(56) Fremdragne publikationer

FR offentl.skr. nr. 2235103

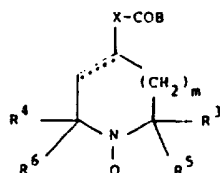
Andre publikationer: Pharmazie 35, H. 1 (1980), side 10-14

Chem. Abs. 88 (1978), abstract nr. 134654s

(57) Sammendrag:

**3704-84**

Diagnostisk middel, der indeholder en forbindelse med den  
almene formel I



(I),

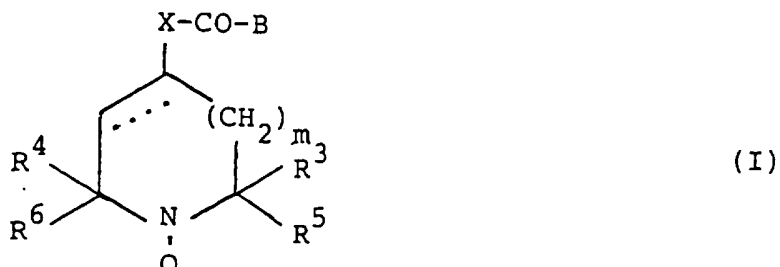
hvor R er en protein-, sukker- eller lipidrest eller en grup-  
pe

3704-84

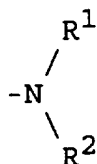


..... er en enkeltbinding eller dobbeltbinding, X er gruppen  $-(\text{CH}_2)_n-$ , eller hvis ..... er en enkeltbinding, også gruppen  $-\text{IIIIC}(\text{CH}_2)_n-$ , hvor n betyder 0 - 4, m er tallet 0, 1 eller 2,  $\text{R}^1$  er en med hydroxygrupper, acyloxygrupper og/eller alkylidendioxygrupper substitueret alkylrest,  $\text{R}^2$  har samme betydning som  $\text{R}^1$  eller betyder et hydrogenatom eller en alkylrest,  $\text{R}^3$  og  $\text{R}^4$  er alkylrester, og  $\text{R}^5$  og  $\text{R}^6$  er eventuelt med hydroxygrupper substituerede alkylrester.

Den foreliggende opfindelse angår et diagnostisk middel, der er ejendommeligt ved, at det indeholder en forbindelse med den almene formel



5 hvor B er en protein-, sukker- eller lipidrest eller en gruppe



10

..... er en enkeltbinding eller dobbeltbinding, X er gruppen  $-(\text{CH}_2)_n-$  eller, hvis ..... er en enkeltbinding, også gruppen  $-\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n-$ , hvor n betyder 0-4, m er tallet 0, 1 eller 2,  $\text{R}^1$  er en med 1-5 hydroxygrupper, 1-5 acyloxygrupper med 2-6 C-atomer og/eller 1-3 alkylidendioxygrupper med 1-6 C-atomer substitueret alkylgruppe med 2-8 C-atomer,  $\text{R}^2$  har samme betydning som  $\text{R}^1$  eller betyder et hydrogenatom eller en  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -alkylgruppe,  $\text{R}^3$  og  $\text{R}^4$  er  $\text{C}_1$ - $\text{C}_4$ -alkylgrupper, og  $\text{R}^5$  og  $\text{R}^6$  betyder eventuelt med 1-3 hydroxygrupper substituerede alkylgrupper med 1-4 C-atomer.

20

Opfindelsen angår også nitroxylforbindelser med den ovenfor viste almene formel I med undtagelse af 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2-hydroxyethyl)amid, 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid og forbindelser, hvor B er en sukker- eller phospholipidrest,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  og  $\text{R}^6$  er alkylgrupper, m og n er 0, og ..... er en dobbeltbinding. Disse nitroxylforbindelser er hidtil ukendte. Endelig angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af de hidtil ukendte nitroxylforbindelser.

30

Forbindelserne med den almene formel I ifølge krav 1 bærer som substituent B enten resten af et protein, såsom f.eks. albumin, et immunoglobulin eller monoklonale antistoffer, eller resten af en sukkerart, såsom f.eks. glucose eller et glucosederivat, eller resten af et lipid, såsom f.eks. dipalmitoylphosphatidylethanolamin, eller gruppen  $-NR^1R^2$ . Her betyder  $R^1$  en med 1-5 hydroxygrupper, 1-5 acyloxygrupper eller 1-3 alkylidendioxygrupper substitueret alkylgruppe med fortrinsvis 2-8 og især 2-6 carbonatomer. Egnede substituent-  
10 ter  $R^1$  er f.eks.: 2-hydroxyethylgruppen, 2-hydroxypropylgruppen, 2-hydroxy-1-methylethylgruppen, 3-hydroxypropylgruppen, 2,3-dihydroxypropylgruppen, 2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-ethylgruppen, 2-hydroxybutylgruppen, 2,3-dihydroxybutylgruppen, 2,3,4-trihydroxybutylgruppen, 2,3-dihydroxy-1-hydroxy-  
15 methylpropylgruppen, 2,3,4,5-tetrahydroxypentylgruppen eller 2,3,4,5,6-pentahydroxyhexylgruppen. Hydroxygrupperne kan foreligge i fri, forestret eller ketaliseret form. Egnede estere er fortrinsvis de estere, der afledes af en alkan-carboxylsyre med 2-6 carbonatomer, såsom f.eks. eddikesyre, propionsyre, smørsyre, isosmørsyre, trimethyleddikesyre, valerianesyre eller hexansyre. Ketaliserede hydroxygrupper er især acetoniderne.

Substituenten  $R^2$  kan have samme betydning som substituenten  $R^1$ . Fortrinsvis er den dog et hydrogenatom eller en alkyl-  
25 gruppe med indtil 4 carbonatomer, såsom ethylgruppen, propylgruppen, isopropylgruppen eller, især, methylgruppen.

Substituenterne  $R^3$  og  $R^4$  er lavere alkylgrupper med 1-4 carbonatomer, såsom ethylgruppen, propylgruppen, isopropylgruppen eller, især, methylgruppen.

30 Substituenterne  $R^5$  og  $R^6$  har fortrinsvis samme betydning som  $R^3$  og  $R^4$ . De kan dog også være med hydroxygrupper substituerede alkylgrupper med indtil 4 carbonatomer, såsom

f.eks. hydroxymethylgruppen, 1-hydroxyethylgruppen, 2-hydroxyethylgruppen, 1,2-dihydroxyethylgruppen, 1-hydroxypropylgruppen, 1,2-dihydroxypropylgruppen eller 1,2,3-trihydroxypropylgruppen.

5 m er fortrinsvis tallet 0 eller 1.

I gruppen  $(CH_2)_n$  har n fortrinsvis betydningen 0 eller 1.

I gruppen  $-NHCO(CH_2)_n-$  har n fortrinsvis betydningen 3 eller 4 og især betydningen 2.

10 Fra litteraturen kendes enkelte af de nitroxylforbindelser, der er omfattet af den almene formel I; den angivne anvendelse af disse kendte forbindelser har imidlertid intet med genstanden for den foreliggende opfindelse at gøre, nemlig anvendelse af forbindelserne som diagnostiske midler.

15 Således bliver der i FR-A-2235103 og Chemical Abstracts 88, 1978, nr. 134654s beskrevet 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyresaccharider, der anvendes til undersøgelse af strukturen og permeabiliteten af membraner og morfologien og bionedbrydningen af saccharider samt som haptener til undersøgelse af anti-Streptococcus gruppe A-antistoffer.

20 Pharmazie 35, 10 (1980) beskriver syntesen af phospholipider ved omsætning af en primær alkohol af et 2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-oxyl-grundskelet med en phosphorsyre, hvilke phospholipider skal anvendes til biofysiske undersøgelser i biologiske membraner og modelmembraner.

25 I Synthesis 1975, 462 og Tetrahedron 33, 2969 (1977) beskrives (2-hydroxyethyl)- og (2,3-dihydroxypropyl)-amiderne af 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre, der fremstilles ved omsætning af 3,5-dibrom-4-oxo-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-3-carboxylsyre med aminer og an-  
30 vendes til undersøgelse af biokemien af  $\beta$ -lactam-antibiotika.

Biochemistry 14, 2754 (1975) beskriver anvendelsen af et til amidgruppen i 2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyreamid bundet pentapeptid som receptor for vancomycin og ristocetin.

- 5 Det har overraskende vist sig, at både disse stoffer og de øvrige, ikke tidligere kendte forbindelser ifølge krav 1 er fremragende egnede til fremstilling af diagnostiske midler, som finder anvendelse ved NMR-diagnostik. Der er til talrige formål et behov for godt tålelige, men også stabile, godt  
10 opløselige og tilstrækkeligt selektive NMR-diagnostika. De omhandlede forbindelser med den almene formel I - især de forbindelser, hvori hydroxygrupperne ikke foreligger i forestret eller ketaliseret form - tilfredsstiller disse krav.

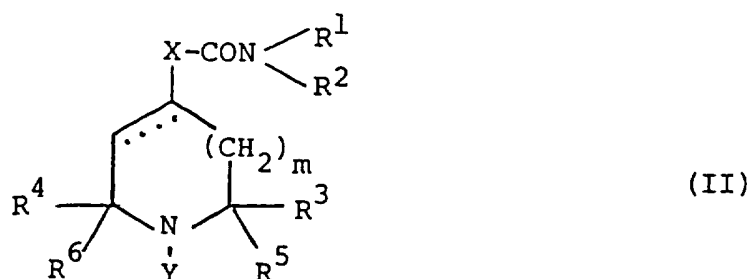
- F.eks. egner de til proteiner bundne forbindelser med den  
15 almene formel I sig især til tumor- og infrakt-diagnostik. Til lever- og milt-undersøgelser er f.eks. lipidkonjugater eller indslutningsforbindelser med liposomer, der f.eks. foreligger som uni- eller multilamellare phosphatidylcholin-cholesterol-vesikler, særligt egnede.

- 20 De diagnostiske midler ifølge opfindelsen kan anvendes enteralt eller parenteralt, især intravenøst, intraarterielt eller intralumbalt.

- De hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I, hvori B er en gruppe  $-NR^1R^2$ , kan fremstilles ved en fremgangsmåde,  
25 der er ejendommelig ved, at man

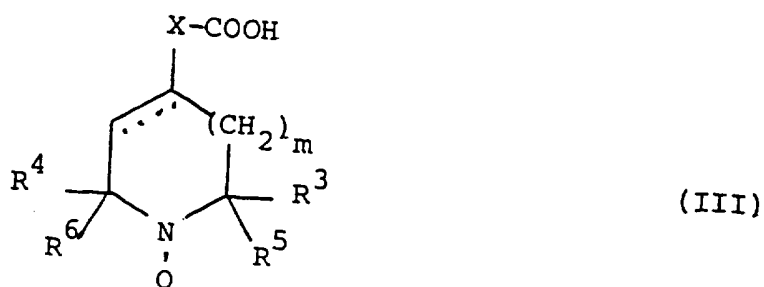
a) på i og for sig kendt måde oxiderer en forbindelse med den almene formel II

5



hvor .....,  $m$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de ovenfor angivne betydninger, og  $Y$  er et hydrogenatom eller en hydroxygruppe, eller

b) kondenserer en carboxylsyre med den almene formel III



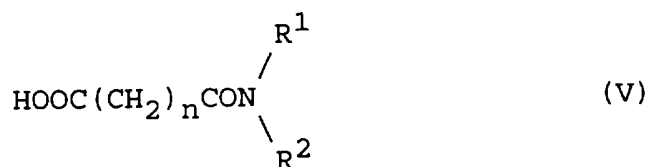
5 hvor .....,  $m$ ,  $X$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de ovenfor angivne betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en amin med den almene formel IV

10



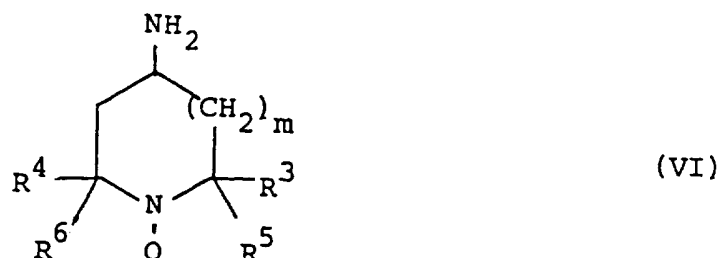
hvor  $R^1$  og  $R^2$  har de ovenfor angivne betydninger, eller

c) kondenserer en carboxylsyre med den almene formel V



5

hvor  $n$ ,  $\text{R}^1$  og  $\text{R}^2$  har de ovennævnte betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en amin med den almene formel VI



hvor  $m$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  og  $\text{R}^6$  har de ovenfor angivne betydninger, og om ønsket hydrolytisk spalter tilstedeværende ketalgrupper eller acylgrupper.

De hidtil ukendte forbindelser med den almene formel I, hvori B er en protein-, sukker- eller lipidrest, fremstilles ved en fremgangsmåde, der er ejendommelig ved, at man på i og for sig kendt måde omsætter en carboxylsyre med den almene formel III, hvori .....,  $m$ ,  $X$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$  og  $\text{R}^6$  har de ovenfor angivne betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en nukleofil gruppe i et protein, en sukkerart eller et lipid.

20 Fremstillingen af nitroxylforbindelserne med den almene formel I, hvor B betyder en  $-\text{NR}^1\text{R}^2$ -gruppe, ud fra forbindelserne med den almene formel I sker under betingelser, som er velkendte for fagmanden. Således kan man oxidere forbindelserne

med den almene formel II f.eks. med hydrogenperoxid i nærværelse af wolframkatalysatorer, såsom natriumwolframat. Særligt godt lykkes oxidationen med organiske persyrer, såsom perbenzoesyre, 3-chlorbenzoesyre og pereddikesyre.

5      Dannelsen af amiderne af de tilsvarende carboxylsyrer og aminer sker således på konventionel måde (Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, bind 15/2, 1974, side 1 ff.). Således kan man f.eks. omdanne carboxylsyrerne til det tilsvarende syrechlorid eller blandede anhydrid (f.eks. med trifluor-  
10      eddikesyreanhydrid eller chlormyresyremethylester) og omsætte dette med aminen. Endvidere er det også muligt at kondensere begge komponenter i nærværelse af et vandfjernende middel (f.eks. N,N'-carbonyldiimidazol eller dicyklohexylcarbodiimid).

15      Den eventuelt påfølgende fraspaltning af beskyttelsesgrupper sker ligeledes på konventionel måde. Der kan nævnes ketal-spaltning ved hjælp af syre og esterspaltning ved hjælp af alkoholiske syrer eller baser.

20      Dannelsen af konjugater med biomolekyler sker ligeledes på i og for sig kendte måder, f.eks. ved omsætning af den nukleofile gruppe i et biomolekyle, såsom amino-, phenol-, sulfhydryl- eller imidazolgruppen, med et aktiveret derivat med den almene formel III. Som aktiverede derivater kan der f.eks. være tale om syrechlorider, blandede anhydrider (se f.eks. G.E.

Krejcarek & K.L.Tucker, Biochem.Biophys.Res.Comm. 1977, 581), aktiverede estere, nitrener eller isothiocyاناتer.

5 Udgangsforbindelserne til brug ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er kendte eller kan fremstilles på i og for sig kendt måde. Det har vist sig, at syntesen af de kendte forbindelser ofte kan udføres på en væsenligt enklere måde end beskrevet i literaturen, således som de efterfølgende fremstillingsforskrifter viser.

10 2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-carboxylsyremethylester.

Til 1200 ml natriummethylatopløsning, hvori der findes 20,69 g (900 mmol) natrium, sættes under omrøring og afkøling ved 0 - 15°C portionsvis 118,19 g (300 mmol) 3,5-dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on-hydrobromid. Efter 30 minutters omrøring inddamper man i vakuum, optager remanensen i tør diethylether, frafiltrerer det faste stof, inddamper igen opløsningen i vakuum og destillerer remanensen i vandstrålevakuum.

20 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyremethylester går over som en farveløs væske ved 88 - 89°C/15 mm. Man får 54,2 g (91% af det teoretiske).

25 Forbindelsen er ifølge gaskromatogram 92,3% og tilstrækkeligt ren til videre forarbejdning.

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylester.

30 I 70 ml dichlormethan opløses 13,38 g (73 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyremethylester, og der tilsættes 0,1 g (1,2 mmol) natriumacetat, afkøles til -10°C, og under omrøring tilsættes portionsvis en afkølet opløsning af 30 g (146 mmol) 37% pereddikesyre, der endvidere indeholder 0,8 g

(9,6 mmol) natriumacetat. Efter endt tilsætning efterrøres i 4 timer. Derpå fortynder man med dichlormethan og omrører i natriumbicarbonatopløsning for at neutralisere eddikesyren. Den organiske fase fraskilles, tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed i vakuum. 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylesteren krystalliserer af diethylether som nåle med smeltepunkt 87 - 89°C.

Udbyttet er 12,63 g (87,3% af det teoretiske).

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre..

Til en opløsning af 15,10 g (76,17 ml) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylester i 40 ml destilleret vand og 10 ml ethanol blev der sat 4,57 g (114,26 mmol) natriumhydroxid i 40 ml destilleret vand. Man opvarmer i 1 1/2 time under omrøring til 60°C, fortynder med 200 ml vand, syrner med 4 N svovlsyre til en pH-værdi på 3 og ekstraherer syren med methylenchlorid. Den organiske fase tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed i vakuum. 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre krystalliserer af ethanol/diethylether (smeltepunkt 221 - 223°C).

Udbyttet er 13,82 g (98,5 af det teoretiske).

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyremethylester.

87,80 g (479 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyremethylester opløses i 1000 ml methanol og hydrogeneres i nærværelse af 11 g Raney-nikkel og et begyndelsestryk på 180 bar ved stuetemperatur. Man frasuger katalysatoren, behandler opløsningen med aktivt kul, inddamper i vakuum og destillerer remanensen i vandstrålevakuum. 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyremethylesteren går over ved 86 - 87°C/14 mm. Man får 77,1 g (88% af det teoretiske). For-

bindelsen er ifølge gaskromatogram 98,7%.

$C_{10}H_{19}NO_2$  (185,27).

5

Beregnet: 64,83 C, 10,34 H, 7,56 N.

Fundet: 64,71 C, 10,44 H, 7,44 N.

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylester.

10

Til en opløsning af 20,30 g (106,15 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyremethylester (98,7%) i 200 ml dichlormethan sættes 0,14 g (1,6 mmol) natriumacetat, og opløsningen afkøles til  $-10^{\circ}C$ . Til den omrørte opløsning dryppes 45,2 g (220 mmol) pereddikesyre (37%), 1% svovlsyre, der ligeledes er afkølet, samt 1,22 g (14,7 mmol) natriumacetat suspenderet i pereddikesyre. Man lader omrøre natten over, neutraliserer eddikesyren med natriumbicarbonat, fraskiller den organiske fase, tørrer den over natriumsulfat og inddamper den i vakuum. Remanensen destilleres i oliepumpevakuum. Ved  $76^{\circ}/0,01$  torr går 20,23 g (93,4% af det teoretiske) af en orangefarvet olie over.

15

20

$C_{10}H_{18}NO_3$  (200,26).

25

Beregnet: 59,98 C, 9,06 H, 6,99 N.

Fundet: 59,89 C, 9,17 H, 6,93 N.

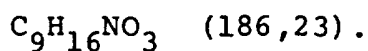
2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre.

30

I 120 ml destilleret vand opløses 8,75 g (218,87 mmol) natriumhydroxid, og der tilsættes en opløsning af 29,22 g (145,91 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylester i 20 ml ethanol. Man opvarmer under omrøring i 90 minutter til  $60^{\circ}C$ , fortynder med 200 ml vand og syrner med 4 N svovlsyre til en pH-værdi på 3. Syren optages i dichlormethan,

35

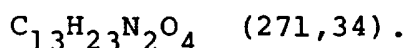
og den organiske opløsning tørres over natriumsulfat og inddam-  
pes til tørhed i vakuum. Remanensen krystalliseres af  
dichlormethan/diethylether. Man får derved 26,12 g (96,1%  
af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-  
3-carboxylsyre med smeltepunkt 197-199°C.



Beregnet: 58,05 C, 8,66 H, 7,52 N.  
Fundet: 58,11 C, 8,72 H, 7,35 N.

Ravsyre-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-4-piperidyl)monoamid.

55 g (321 mmol) 4-amino-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl  
opløses i 55 ml pyridin. Hertil drypper man under omrøring  
en opløsning af 40,7 g (407 mmol) ravsyreanhydrid i 500 ml  
tetrahydrofuran. Man lader efterrøre i 12 timer ved stue-  
temperatur og inddamper til tørhed i vakuum. Til remanensen  
sættes 1000 ml vand, og med henblik på fjernelse af pyridinen  
ekstraheres den vandige opløsning med ether. Derpå inddamper  
man i vakuum til ca. 200 ml og frasuger det dannede bundfald  
efter flere timers omrøring i isbad. Efter vask med lidt  
iskoldt vand og tørring ved 40°C i vakuum får man 81,3 g  
(93% af det teoretiske) som orangefarvede krystaller med smel-  
tepunkt 108 - 110°C.



Beregnet: 57,54 C, 8,54 H, 10,33 N.  
Fundet: 57,48 C, 8,60 H, 10,41 N.

Forbindelserne ifølge opfindelsen med formlen I er værdifulde  
diagnostika. Til den praktiske anvendelse bliver de opløst  
eller suspenderet i vand eller en fysiologisk saltopløsning og  
eventuelt ved hjælp af de i galenikken sædvanlige tilsætninger  
omdannet til en til intranasal eller oral applikation egnet  
form, således at deres koncentrationer ligger i området fra

1  $\mu\text{mol/liter}$  til 1  $\text{mol/liter}$ .

5 Tåleligheden af de hidtil ukendte diagnostiske midler er tydeligt bedre end af de kendte sammenlignelige forbindelser. Toksiske virkninger af de hidtil til saltdannelse nødvendige ioner, såsom natrium, kalium, meglumin etc., bortfalder helt eller for størstedelens vedkommende. Det osmotiske tryk af de koncentrerede opløsninger af disse diagnostiske midler er drastisk reduceret. Også herved forbedres tåleligheden væsentligt efter oral og parenteral indgivelse, da stærkt hypertone opløsninger skader blodkar og væv, påvirker hjerte og kredsløb og udviser diuretiske virkninger.

15 Forbindelserne ifølge opfindelsen påvirker på gunstig måde protonernes relaxations-tid. De udviser sammenlignet med de kendte nitroxylradikaler en bedre biodisposition og er - som følgende forsøg viser - væsentligt mindre toksiske end disse.

20 Mus med en vægt fra 18 til 22 g får injiceret forskellige mængder stof som 0,5 mmol vandig opløsning pr. kg, indstillet til pH 7 - 7,5, intravenøst i halevenen. Efter 7 dage konstateres musenes overlevelsesrate, og af denne beregnes på sædvanlig måde  $\text{LD}_{50}$  i mmol/kg dyr.

25 Følgende tabel viser de herved fremkomne resultater sammenlignet med de tidligere kendte forbindelser 1 og 2 (J.Comput. Assist.Tomogr. 7, 1983, 184).

30

| Nr. | Substrat                                                                                | LD <sub>50</sub> i mmol/kg mus |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| 1   | Ravsyre-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-<br>piperidin-4-yl)amid                             | 10                             |
| 2   | 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-<br>carboxylsyre                                 | 10                             |
| 3   | 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-<br>carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)amid | 20                             |
| 4   | 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-<br>carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid      | 15                             |
| 5   | 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-<br>carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)amid  | 25                             |

Ialt er det dermed lykkedes at tilvejebringe hidtil ukendte diagnostiske midler, som giver nye muligheder i den diagnostiske medicin. Især udviklingen af nye billedgivende fremgangsmåder i den medicinske diagnostik gør denne udvikling  
5 meget ønskværdig og nødvendig.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af fremgangsmåden ifølge opfindelsen og anvendelsen af de fremstillede produkter. Dog angår eksempel 9 en kendt forbindelse, og  
10 eksemplerne 7, 10, 13, 16, 20 og 33 angår fremstilling af udgangsmaterialer.

#### EKSEMPEL 1.

-----

15

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid.

20

Til en opløsning af 14,82 g (79,58 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre i 200 ml absolut tetrahydrofuran sættes under omrøring, afkøling og overdækning med argon 8,053 g (79,58 mmol) triethylamin. Efter afkøling til -5°C tildryppes under omrøring i løbet af 45 minutter 8,638 g

25

(79,59 mmol) chlormyresyreethylester i 10 ml absolut tetrahydrofuran. Der omrøres i 30 minutter ved -5°C. Derpå til-sættes i portioner 12,83 g (79,59 mmol) 2-amino-1-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethanol. Efter 30 minutter fjernes kølingen, og der omrøres i 3 timer ved stuetemperatur. Der-

30

efter fortyndes med 200 ml absolut ether, suges fra det faste stof, som vaskes med absolut ether. Den organiske opløsning inddampes til tørhed i vakuum. Remanensen optages i dichlormethan, vaskes med en halvmættet natriumbicarbonatopløsning, tørres over natriumsulfat og inddampes til tørhed i vakuum. Den tilbageblevne gule olie krystalliserer efter til-sætning af diethylether. 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-(hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan  
35 4-yl)ethyl]amid smelter efter omkrystallisation fra ethylacetat

ved 144°C, og man får 14,79 g (56,4% af det teoretiske) af forbindelsen. Af bicarbonatopløsningen genvindes 4,0 g udgangssyre.

5 EKSEMPEL 2.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3,4-trihydroxybutyl)amid.

10

I 150 ml vand, hvori der findes 0,1 ml (3,6 mmol) koncentreret svovlsyre, suspenderes 13,9 g (42,46 mol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid. Under omrøring opvarmes i 3 ti-  
15 mer til 40 - 50°C. Opløsningen afkøles, og svovlsyren neutraliseres med ionbytteren Amberlite® IRA 410, OH<sup>-</sup>-form. Ionbytteren frafiltreres og vaskes med vand. De forenede opløsninger indampes til tørhed i vakuum. 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-(2,3,4-trihydroxybutyl)amid krystal-  
20 liseres fra ethanol, og man får 10,97 g (89,3% af det teoretiske) gule krystaller med smeltepunkt 172°C. Efter omkrystallisation fra vand får man gule nåle med smeltepunkt 189 - 191°C.

25 EKSEMPEL 3.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid.

30

Til en opløsning af 19,93 g (107 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre i 300 ml dimetylformamid sættes under omrøring, afkøling og overdækning med argon  
12,05 g (119 mmol) triethylamin. Efter afkøling til -10°C  
35 tilsættes i løbet af 30 minutter 12,92 g (119 mmol) chlormyresyreethylester i 30 ml absolut tetrahydrofuran. Efter 10 mi-

nutter tilsættes portionsvis 10,89 g (107 mmol) N-methyl-glucamin. Man lader omrøre i 2 timer ved 0°C, fjerner kølingen og omrører natten over ved stuetemperatur. Der filtreres fra det faste stof, som vaskes med dimethylformamid og absolut tetrahydrofuran. De forenede opløsninger indampes i vakuum, til sidst i oliepumpevakuum. Remanensen optages i absolut tetrahydrofuran og omkrystalliseres fra diethylether. Den udfældede olie opløses i vand og fås ionfri ved behandling med ionbytteren Amberlite® IR 120, H<sup>0</sup>-form, og IRA 410, OH<sup>0</sup>-form. Den gule opløsning indampes til tørhed i vakuum. Den tilbageblevne sirup opbevares i vakuum over diphosphor-pentoxid, da den er stærkt hygroskopisk. Der fås 24,8 g (63,8% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]-amid som en gulorange sirup.

$C_{16}H_{31}N_2O_7$  (molvægt 363,43).

Beregnet: 52,88 C, 8,60 H, 7,71 N.  
Fundet: 52,61 C, 8,78 H, 7,59 N.

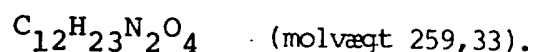
#### EKSEMPEL 4.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid.

Til en opløsning af 13,61 g (73,1 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre i 150 ml dichlormethan sættes under omrøring, afkøling og overdækning med argon 8,13 g (80,3 mmol) triethylamin. Efter afkøling til -10°C tildryppes 8,72 g (80,3 mmol) chlormyresyreethylester i 10 ml dichlormethan, og efter 20 minutters omrøring ved -5°C tildryppes 6,66 g (73,1 mmol) 2,3-dihydroxypropylamin i 40 ml

dimethylacetamid. Man fjerner kølingen og efterrører i 1 time, suger fra det faste stof, vasker med absolut tetrahydrofuran og inddamper i vakuum til tørhed, til sidst i oliepumpevakuum. Remanensen udtrækkes med absolut ether, opløses i vand og fås ionfri ved behandling med ionbytteren Amberlite<sup>®</sup> IR 120, H<sup>+</sup>-form, og IRA 410, OH<sup>-</sup>-form. Den gule opløsning inddampes til tørhed i vakuum, og man får 12,4 g (65,5% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)-amid som en gulorange sirup.



Beregnet: 55,58 C, 8,94 H, 10,80 N.

Fundet: 55,33 C, 9,19 H, 10,62 N.

#### EKSEMPEL 5.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-bis-(2-hydroxyethyl)amid.

Til en opløsning af 12,91 g (69,32 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre i 150 ml absolut tetrahydrofuran sættes under omrøring, afkøling og overdækning med argon 7,69 g (76,0 mmol) triethylamin. Efter afkøling til -10°C tildryppes 8,25 g (76,0 mmol) chlormyresyreethylester i 10 ml absolut tetrahydrofuran, og efter 20 minutters omrøring ved -5°C tildryppes 7,2 g (69,32 mmol) diethanolamin i 40 ml dioxan. Man fjerner kølingen og efterrører i 1 time. Derpå fortyndes med 200 ml absolut ether, suges fra fast stof, eftervaskes med ether og inddampes i vakuum. Remanensen optages i vand og fås ionfri ved behandling med ionbytteren Amberlite<sup>®</sup> IR 120, H<sup>+</sup>-form, og IRA 410, OH<sup>-</sup>-form. Den gule neutrale opløsning inddampes til tørhed i vakuum, og man får 11,64 g (61,4% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-bis(2-hydroxyethyl)amid som

en gulorange sirup.

$C_{13}H_{25}N_2O_4$  (molvægt 273,36).

5

Beregnet: 57,12 C, 9,22 H, 10,25 N.

Fundet: 57,01 C, 9,38 H, 10,10 N.

EKSEMPEL 6.

10

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid.

15

Til en opløsning af 11,41 g (61,27 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre og 6,20 g (61,27 mmol) triethylamin i 200 ml absolut tetrahydrofuran tildryppes ved  $-5^{\circ}\text{C}$  under omrøring og overdækning med argon 6,65 g (61,27 mmol) chlormyresyreethylester i 10 ml tetrahydrofuran. Efter 30 minutter tilsættes portionsvis 5,59 g (61,3 mmol) pulveriseret 2-amino-1,3-propandiol. Man fjerner kuldebadet og efterrører i 5 timer. Derpå fortyndes med 200 ml absolut diethylether, suges fra fast stof, eftervaskes med ether og inddampes i vakuum. Remanensen optages i vand og fås ionfri ved behandling med ionbytteren Amberlite<sup>®</sup> IR 120,  $\text{H}^+$ -form, og IRA 410,  $\text{OH}^-$ -form. Den neutrale gule opløsning inddampes til tørhed i vakuum, og man får 10,1 g (64,4% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid som en mørkegul sirup.

20

25

30

$C_{12}H_{23}N_2O_4$  (259,33).

Beregnet: 55,58 C, 8,94 H, 10,80 N.

Fundet: 55,37 C, 9,19 H, 10,64 N.

35

## EKSEMPEL 7.

-----

5 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-  
1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid.

Til en opløsning af 22,93 g (175 mmol) (2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methylamin og 58,9 g (525 mmol) kalium-tert.-butylat i 700 ml isopropanol sættes portionsvis under omrøring,  
10 afkøling til mellem -5 og 0°C og overdækning med argon 68,94 g (175 mmol) 3,5-dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on-hydrobromid. Der dannes en hvid grød. Man lader efterrøre i 1 time uden afkøling, suger fra fast stof og inddamper til  
15 tørhed i vakuum. Remanensen fordeles mellem dichlormethan og vand. Den organiske fase tørres over natriumsulfat og indampes til tørhed i vakuum. Remanensen krystalliserer. Efter omkrystallisation fra pentan får man 30,1 g (60,9% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid med smeltepunkt 55 -  
20 57°C.

$C_{15}H_{26}N_2O_3$  (282,40).

25 Beregnet: 63,35 C, 9,92 H, 9,82 N.  
Fundet: 63,11 C, 9,72 H, 9,99 N.

## EKSEMPEL 8.

-----

30 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid.

I 200 ml absolut diethylether opløses 15,88 g (56,23 mmol)  
35 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid, der afkøles til -5°C, og under omrøring tilsættes portionsvis en opløsning af 23,92 g (112,4 mmol)

3-chlorperbenzoesyre, 80%, i 150 ml absolut ether. Man fjerner  
 kølebadet, lader efterrøre i 2 timer, indrører i 200 ml soda-  
 opløsning, hvori der findes 29 g natriumcarbonat -decahydrat,  
 og optager produktet i diethylether. Etheropløsningen tørres  
 5 over natriumsulfat og inddampes til tørhed i vakuum. Man får  
 derved 16,46 g (98,4% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-  
 3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-  
 5-ylmethyl)amid som en orangefarvet sirup.

10  $C_{15}H_{25}N_2O_4$  (297,38).

Beregnet: 60,59 C, 8,47 H, 9,42 N.

Fundet: 60,33 C, 8,68 H, 9,30 N.

15 EKSEMPEL 9.

-----

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-di-  
 20 hydroxypropyl)amid.

20

14,2 g (47,8 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-  
 carbonsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid suspen-  
 deres i 100 ml destilleret vand, hvori der findes 0,1 ml  
 (3,6 mmol) koncentreret svovlsyre, og omrøres i 3 timer ved  
 25 50°C. Efter afkøling neutraliseres med ionbytteren Amberlite  
 ® IRA 410, OH<sup>-</sup>-form. Man vasker harpiksen med vand og ind-  
 damper de forenede opløsninger i vakuum. Remanensen tørres  
 ved stuetemperatur under oliepumpevakuum. Man får derved  
 30 10,48 g (85,3% af det teoretiske) krystallinsk 2,2,5,5-tetra-  
 methyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)-  
 amid med smeltepunkt 131 - 133°C.

$C_{12}H_{21}N_2O_4$  (257,31).

35 Beregnet: 56,02 C, 8,23 H, 10,89 N.

Fundet: 55,87 C, 8,39 H, 10,74 N.

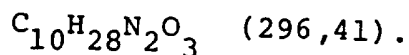
## EKSEMPEL 10.

-----

5 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid.

I analogi med eksempel 7 omsætter man 68,94 g (175 mmol) 3,5-dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on-hydrobromid,  
 10 58 g (525 mmol) kalium-tert.-butylat og 25,41 g (115 mmol) N-methyl-N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amin i 600 ml isopropanol.

Man får således 39,43 g (76% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetra-  
 15 methyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid som en orangefarvet sirup.



20 Beregnet: 64,84 C, 9,52 H, 9,45 N.  
 Fundet: 64,59 C, 9,73 H, 9,27 N.

## EKSEMPEL 11.

-----

25 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid.

I analogi med eksempel 8 omsættes 14,97 g (50,50 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-N-[(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methyl]-N-methylamid med 22,0 g (101 mmol) 3-chlorperbenzoesyre, 80%, i 300 ml absolut diethylether.  
 30 Man får således 13,12 g (83,5% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid, der efter krystallisation fra ethylacetat udviser et smeltepunkt på 69 - 71°C.  
 35

$C_{16}H_{28}N_2O_3$  (296,41).

Beregnet: 61,51 C, 9,03 H, 8,97 N.

Fundet: 61,80 C, 8,98 H, 8,87 N.

5

EKSEMPEL 12.

-----

10

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(2,3-dihydroxypropyl)-N-methylamid.

15

I analogi med eksempel 9 forsæbes 11,49 g (36,9 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid i 100 ml destilleret vand, hvori der findes 0,05 ml (1,8 mmol) koncentreret svovlsyre. Man får derved 9,18 g (91,7% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(2,3-dihydroxypropyl)-N-methylamid som en orangefarvet sirup.

20

$C_{13}H_{23}N_2O_4$  (271,34).

Beregnet: 57,55 C, 8,54 H, 10,32 N.

Fundet: 57,33 C, 8,75 H, 10,18 N.

25

EKSEMPEL 13.

-----

30

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyre-N-[(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid.

35

Til en opløsning af 22,58 g (76,18 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)amid i 400 ml methanol sættes 2 g Raney-nikkel B 115Z, og der hydrogeneres ved et begyndelsestryk på 180 bar. Der optages nøjagtigt 1 mol hydrogen. Man suger fra katalysatoren, behandler opløsningen med carbon og inddamper til tørhed i vakuum. Man får derved 21,0 g (92,4% af det teoretiske)

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid som en bleggul olie.

$C_{16}H_{30}N_2O_3$  (298,43).

5

Beregnet: 64,40 C, 10,13 H, 9,39 N.

Fundet: 64,66 C, 10,21 H, 9,57 N.

EKSEMPEL 14.

10

-----  
2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid.

15

I analogi med eksempel 8 omsættes 20,78 g (69,63 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-carboxylsyre-N-[N(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid med 30 g (140 mmol) 3-chlorperbenzoesyre, 80%, i 400 ml absolut diethylether.

20

Man får 17,52 g (80,3% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-[(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid som en orangefarvet sirup.

$C_{16}H_{29}N_2O_4$  (313,42).

25

Beregnet: 61,32 C, 9,33 H, 8,94 N.

Fundet: 61,61 C, 9,40 H, 8,83 N.

EKSEMPEL 15.

30

-----  
2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(2,3-dihydroxypropyl)-N-methylamid.

35

I analogi med eksempel 9 forsæbes 16,60 g (53 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-ylmethyl)-N-methyl]amid i 150 ml destilleret

vand, hvori der er opløst 0,05 ml (1,8 mmol) koncentreret  
svovlsyre. Man får derved 13,28 g (91,7% af det teoretiske)  
2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-(carboxylsyre-N-(2,3-  
dihydroxypropyl)-N-methylamid som en orangefarvet olie.

5

$C_{13}H_{25}N_2O_4$  (273,36).

Beregnet: 57,12 C, 9,22 H, 10,25 N.

10

Fundet: 56,86 C, 9,39 H, 10,06 N.

EKSEMPEL 16.

-----

15

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-  
dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid.

20

I analogi med eksempel 7 omsættes 51,22 g (130 mmol) 3,5-dibrom-  
2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on-hydrobromid, 45,05 g  
(390 mmol) kalium-tert.-butylat og 20,96 g (130 mmol) 2-amino-  
1-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethanol i 500 ml isopropanol.  
Man får således 22,93 g (56,5% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetra-  
methyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-  
dioxolan-4-yl)ethyl]amid, som omkrystalliseret fra diethylether-  
pentan har et smeltepunkt på 99 - 101°C.

25

$C_{16}H_{28}N_2O_4$  (312,41).

Beregnet: 61,51 C, 9,03 H, 8,97 N.

30

Fundet: 61,57 C, 9,33 H, 8,90 N.

EKSEMPEL 17.

-----

35

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-  
2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid.

I analogi med eksempel 8 omsættes 2,81 g (9 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid med 4,72 g (18 mmol) 3-chlorperbenzoesyre i 100 ml absolut diethylether. Man får derved  
5 2,43 g (83,5% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid med smeltepunkt 104 - 105°C.

10  $C_{16}H_{27}N_2O_5$  (327,40).

Beregnet: 58,70 C, 8,31 H, 24,43 N.

Fundet: 58,46 C, 9,57 H, 24,28 N.

15 EKSEMPEL 18.

-----  
2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid.

20 15,98 g (51,15 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid opløses i 100 ml destilleret vand, og der tilsættes 500 mg (1,34 mmol) Titriplex® III, 500 mg (1,52 mmol) natriumwolframat-dihydrat, samt 10 ml (88,2 mol) 30% hydrogenperoxid.

25 Man omrører i 5 dage ved stuetemperatur i en mørk kolbe, syrer med citronsyre til en pH-værdi på 3 og ekstraherer produktet med dichlormethan. Den organiske opløsning vaskes med vand, tørres over natriumsulfat og indampes til tørhed i vakuum. Den orange farvede olie optages i diethylether og sættes  
30 til krystallisation. Man får derved 12,79 g (76,4% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid med smeltepunkt 105 - 106°C.

## EKSEMPEL 19.

-----

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3,4-trihydroxybutyl)amid.

I analogi med eksempel 9 forsæbes 15,56 g (47,53 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid i 200 ml destilleret vand, hvori der er indeholdt 0,15 ml (5,4 mmol) koncentreret svovlsyre. Produktet krystalliserer fra vand. Man får 12,87 g (94,2% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3,4-trihydroxybutyl)amid med smeltepunkt 183 - 185°C.

$C_{13}H_{23}N_2O_5$  (287,34).

Beregnet: 54,34 C, 8,07 H, 9,75 N.

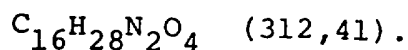
Fundet: 54,21 C, 8,28 H, 9,58 N.

## EKSEMPEL 20.

-----

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid.

I analogi med eksempel 7 omsættes 78,79 g (200 mmol) 3,5-dibrom-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-on-hydrobromid, 69,34 g kalium-tert.-butylat og 35,47 g (220 mmol) 6-amino-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-5-ol i 800 ml isopropanol, og derefter ekstraheres med dichlormethan. Man får derved 37,66 g (60,3% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid, der krystalliserer fra diethylether/hexan og har et smeltepunkt på 125 - 127°C.



Beregnet: 61,51 C, 9,03 H, 8,97 N.

Fundet: 61,32 C, 9,20 H, 8,83 N.

5

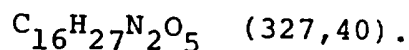
EKSEMPEL 21.

-----

10 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-  
2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid.

I analogi med eksempel 8 omsættes 13,0 g (41,61 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid med 19,15 g (90,0 mmol) 3-chlorperbenzoesyre, 80%, i 130 ml dichlormethan. Man får således 11,23 g (82,5% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)-amid, som omkrystalliseret fra diethylether/hexan har et smeltepunkt på 132 - 133°C.

20



Beregnet: 58,70 C, 8,31 H, 8,56 N.

Fundet: 58,04 C, 8,59 H, 8,34 N.

25

EKSEMPEL 22.

-----

30 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-tri-  
hydroxybut-2-yl)amid.

I analogi med eksempel 9 forsæbes 12,53 g (38,27 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)-amid i 100 ml destilleret vand, hvori der er indeholdt 0,1 ml (3,6 mmol) koncentreret svovlsyre.

35

Produktet krystalliserer fra den inddampede vandige opløsning.  
 Man får derved 9,60 g (87,3% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetra-  
 methyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-  
 2-yl)amid med smeltepunkt 75 - 77°C.

$C_{13}H_{23}N_2O_5$  (287,34).

Beregnet: 54,34 C, 8,07 H, 9,75 N.

Fundet: 54,36 C, 8,32 H, 9,60 N.

EKSEMPEL 23.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-  
 2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid.

I analogi med eksempel 4 omsættes 24,23 g (130,11 mmol) 2,2,-  
 5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre, 13,59 g (133,0  
 mmol) triethylamin, 14,87 g (133,0 mmol) chlormyresyreethyl-  
 ester, 21,44 g (133 mmol) 6-amino-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-  
 5-ol i 350 ml absolut tetrahydrofuran. Man får derved 24,83 g  
 (56,7% af det teoretiske) 2,2,5,5 - tetramethylpyrrolidin-1-  
 oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)-  
 amid, som omkrystalliseret fra diethylether har et smeltepunkt  
 på 190 - 191°C.

$C_{16}H_{29}N_2O_5$  (329,42).

Beregnet: 58,34 C, 8,87 H, 8,50 N.

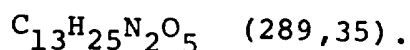
Fundet: 58,20 C, 8,99 H, 8,39 N.

EKSEMPEL 24.

-----

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-tri-  
 hydroxybut-2-yl)amid.

I analogi med eksempel 9 forsæbes 6,0 g (18,21 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid i 100 ml destilleret vand, hvori der er indeholdt 0,05 ml (1,8 mmol) koncentreret svovlsyre. Man får derved 4,83 g (91,7% af det teoretiske) 2,2-5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)amid som en orangefarvet sirup.



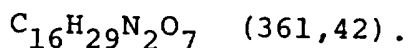
Beregnet: 53,96 C, 8,71 H, 9,68 N.

Fundet: 53,98 C, 8,91 H, 9,57 N.

EKSEMPEL 25.

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4-5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid.

I analogi med eksempel 4 omsættes 12,90 g (70 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre med 7,51 g (73,5 mmol) triethylamin og 8,22 g (73,5 mmol) chlormyresyreethyl-ester i 150 ml absolut tetrahydrofuran til anhydridet, som over et porcelænsfilter suges til 14,35 g (73,5 mmol) N-methylglucamin i 80 ml absolut pyridin. Man lader omrøre natten over, inddamper i vakuum, fjerner pyridinrester ved destillation sammen med ethanol og renser ved kromatografi på 800 g silicagel med ethylacetat/ethanol 2:1 som elueringsmiddel. Man får derved 16,11 g (63,7% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid som en orange sirup.



Beregnet: 53,17 C, 8,09 H, 7,75 N.

Fundet: 52,93 C, 8,22 H, 7,58 N.

## EKSEMPEL 26.

-----

5 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid.

I analogi med eksempel 4 omsættes 5,50 g (29,86 mmol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre, 3,27 g (32 mmol) triethylamin, 3,58 g (32 mmol) chlormyresyreethylester og 2,92 g (32 mmol) 2-amino-1,3-propandiol i 100 ml absolut tetrahydrofuran. Man får derved 5,27 g (68,6% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)-amid, som ved henstand bliver kry-

10 stallinsk og har et smeltepunkt på 151 - 153°C.

15



Beregnet: 56,01 C, 8,23 H, 10,89 N.

20 Fundet: 55,80 C, 8,49 H, 10,71 N.

## EKSEMPEL 27.

-----

25 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid.

En blanding af 1,00 g (5 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyremethylester og 0,68 g (7,5 mmol) 2-amino-1,3-propandiol opvarmes i 6 timer under argon til 120°C.

30 Efter afkøling optages i destilleret vand, ekstraheres med diethylether og ved behandling med ionbytteren Amberlite® IR 120, H<sup>+</sup>-form, bindes overskydende amin. Ionbytteren fra-

35 filtreres, vaskes med vand, og de forenede vandfaser inddampes til tørhed i vakuum. Man får derved 790 mg (60,8 % af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid som en orangefarvet olie.

$C_{12}H_{23}N_2O_4$  (259,33).

Beregnet: 55,58 C, 8,94 H, 10,80 N.

5 Fundet: 55,29 C, 9,22 H, 10,72 N.

EKSEMPEL 28.

-----

10 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid.

Til en opløsning af 1,61 g (10 mmol) 6-amino-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-5-ol i 100 ml dichlormethan dryppes under omrøring ved 0°C en opløsning af 2,563 g (10 mmol) blandet anhydrid af 15 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre og chlor-myresyreethylester i 20 ml dichlormethan. Man lader efterrøre i 60 minutter, vasker opløsningen med en mættet natriumbicarbonat-opløsning, fraskiller den organiske fase, tørrer den over 20 natriumsulfat og inddamper den i vakuum. Remanensen krystalliseres fra diethylether/hexan. Man får således 2,27 g (69,3% af det teoretiske) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)-amid med smeltepunkt 132 - 133°C.

25 EKSEMPEL 29.

-----

30 Ravsyre-(N-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]-N-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-piperidin-4-yl))diamid

Til en opløsning af 2,71 g (10 mmol) ravsyre-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxido-4-piperidyl)monoamid i 200 ml absolut tetrahydrofuran sættes under omrøring og under skylning med nitrogen 1,01 g (10 mmol) triethylamin. Man afkøler til -5°C og 35 tildrypper i løbet af 20 minutter 1,09 g (10 mmol) chlormyre-

syremethylester, opløst i 10 ml absolut tetrahydrofuran, under omrøring. Der omrøres i 30 minutter ved  $-5^{\circ}\text{C}$ . Derpå tilsættes portionsvis 1,61 g (10 mmol) 2-amino-1-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethanol. Efter 30 minutter fjernes kølingen, og der omrøres i 3 timer ved stuetemperatur. Derefter fortyndes med 200 ml absolut ether, og man frasuger det faste stof, som efter vask med absolut ether kasseres. Den organiske opløsning inddampes til tørhed i vakuum, remanensen optages i dichlormethan og vaskes med lidt iskold halvmettet natriumbicarbonatopløsning, og efter tørring over natriumsulfat inddampes den organiske fase påny til tørhed i vakuum. Man får 2,6 g (63% af det teoretiske) af en orangefarvet sirup.



Beregnet: 57,95 C, 8,75 H, 10,14 N.

Fundet: 57,86 C, 9,00 H, 10,20 N.

#### EKSEMPEL 30.

Ravsyre-[N-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-piperidin-4-yl)-N'-(2,3,4-trihydroxybutyl)]diamid.

I 50 ml vand, hvori der er indeholdt 0,1 ml koncentreret svovlsyre, suspenderes 2,05 g (5 mmol) ravsyre-([2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxylpiperidin-4-yl))diamid. Der opvarmes i 3 timer under omrøring til  $50^{\circ}\text{C}$ . Derefter afkøler man til stuetemperatur og neutraliserer opløsningen med ionbytteren Amberlite<sup>®</sup> IRA 410,  $\text{OH}^-$ -form. Ionbytteren frafiltreres, og opløsningen inddampes til tørhed i vakuum. Man får 1,67 g (90% af det teoretiske) af en orangefarvet sirup.

$C_{17}H_{32}N_3O_6$  (374,456).

Beregnet: 54,53 C, 8,61 H, 11,22 N.

Fundet: 54,44 C, 8,80 H, 11,02 N.

5

EKSEMPEL 31.

-----

10 2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-1-oxyl-4-carboxyl-  
syre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid.

I analogi med eksempel 4 omsættes 7,93 g (40 mmol) 2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-1-oxyl-4-carboxylsyre med 4,3 g (42,5 mmol) triethylamin og 4,61 g (42,5 mmol) chlor-  
15 myresyreethylester i 100 ml absolut tetrahydrofuran til det blandede anhydrid, som over et porcelænsfilter suges til 8,3 g (42,5 mmol) N-methylglucamin i 50 ml absolut pyridin. Man lader omrøre natten over, inddamper i vakuum, fjerner pyridinrester ved destillation sammen med ethanol og renser ved  
20 kromatografi på 500 g silicagel med ethylacetat/ethanol 2:1 som elueringsmiddel. Man får således 9,19 g (61,2% af det teoretiske) 2,2,6,6-tetramethyl-1,2,5,6-tetrahydropyridin-1-oxyl-4-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]-amid som en orange sirup.

25

$C_{17}H_{31}N_2O_7$  (375,45).

Beregnet: 54,39 C, 8,32 H, 7,46 N.

Fundet: 54,12 C, 8,51 H, 7,30 N.

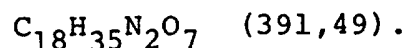
30

EKSEMPEL 32.

-----

35 (1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)eddikesyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid.

I analogi med eksempel 4 omsættes 8,57 g (40 mmol) (1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)eddikesyre med 4,3 g (42,5 mmol) triethylamin og 4,61 g (4,25 mmol) chlormyresyre-ethylester i 100 ml absolut tetrahydrofuran til det blandede anhydrid, som over et porcelænsfilter suges til 8,3 g (42,5 mmol) N-methylglucamin i 50 ml absolut pyridin. Man oparbejder som beskrevet i eksempel 25 og får således 9,36 g (59,8% af det teoretiske) (1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)-eddikesyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid som en orange sirup.



Beregnet: 55,23 C, 9,01 H, 7,16 N.

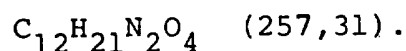
Fundet: 55,44 C, 9,18 H, 7,02 N.

#### EKSEMPEL 33.

-----

Ravsyre-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)monoamid.

Til en opløsning af 7,86 g (50 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-amin i 10 ml pyridin dryppes under afkøling en opløsning af 6,20 g (62 mmol) ravsyreanhydrid i 65 ml absolut tetrahydrofuran. Efter omrøring natten over aftrækkes opløsningsmidlet i vakuum, remanensen indrøres i 250 ml vand, og opløsningen ekstraheres med diethylether. Den vandige opløsning inddampes i vakuum til 30 ml og afkøles. Det udskilte faste stof frasuges og tørres i vakuum. Man får derved 9,62 g (74,8% af det teoretiske) ravsyre-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)monoamid.



Beregnet: 56,02 C, 8,23 H, 10,89 N.

Fundet: 56,18 C, 8,22 H, 11,00 N.

## EKSEMPEL 34.

-----

5 Ravsyre-[N-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-N'-methyl-N'-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)]diamid.

10 I analogi med eksempel 4 omsættes 10,29 g (40 mmol) ravsyre-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)monoamid med 4,3 g (42,5 mmol) triethylamin og 4,61 g (42,5 mmol) chlormyresyre-ethylester i 100 ml absolut tetrahydrofuran til anhydridet, som gennem et porcelænsfilter suges til 8,3 g (42,5 mmol) N-methylglucamin i 50 ml absolut pyridin. Man oparbejder som beskrevet i eksempel 25 og får 10,53 g (62,6% af det teoretiske) ravsyre-[N-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-N'-methyl-N'-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)]diamid som en orange-  
15 farvet sirup.

$C_{19}H_{36}N_2O_8$  (420,51).

20 Beregnet: 54,27 C, 8,63 H, 6,66 N.  
Fundet: 54,09 C, 8,47 H, 6,49 N.

## EKSEMPEL 35.

-----

25

Opløsning af 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-2,3-dihydroxypropylamid.

30 258,317 g (1 mol) 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-2,3-dihydroxypropylamid bliver under opvarmning opløst i 600 ml vand pro injectione. Man tilsætter 1,2 g tro-methamin, opfylder med vand pro injectione til 1000 ml og aftapper den sterilt filtrerede neutrale opløsning i flasker.  
35 Middel til NMR-diagnostik.

## EKSEMPEL 36.

-----

5 Fremstilling af liposomer ladet med nitroxylforbindelser.

Ved den i Proc.Nat.Acad.Sci., USA 75, 4194, beskrevne fremgangs-  
måde fremstilles en lipid-blanding af 50 dele ægge-phosphati-  
dylcholin og 50 dele cholesterol som tørstof. Heraf opløses  
10 500 mg i 30 ml peroxidfri diethylether, og i et ultralydbad  
tilsættes dråbevis 3 ml af en 1M opløsning af 2,2,5,5-  
tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)-  
amid i vand pro injectione. Efter endt tilsætning fortsætter  
man ultralydbehandlingen i 5 minutter og inddamper så i en  
15 rotationsinddamper. Den fremkomne mikroemulsion fortyndes  
med en fysiologisk kogsaltopløsning og befries for ikke-indkapsle-  
de kontrastmiddelbestanddele ved 0°C ved gentagen centrifuge-  
ring (20.000 g/20 minutter). Derefter frysetørres liposomerne  
i multiflasker. Applikationen sker som dispersion i fysiolo-  
gisk kogsaltopløsning, som ved intravenøs injektion i en dosis  
20 på 2,5 - 5,0 ml/kg giver en god kontrastfremstilling af lever  
og milt.

## EKSEMPEL 37.

-----

25

Fremstilling af en opløsning af et nitroxyl-protein-konjugat.

77,1 mg (0,5 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-car-  
30 carboxylsyre opløses i 10 ml dimethylsulfoxid. Opløsningen afkøles, og  
under omrøring tilsættes dråbevis en opløsning af 57,6 mg (0,5 mmol)  
N-hydroxysuccinimid i 2,0 ml dimethylsulfoxid, og derpå dråbevis  
en opløsning af 92,9 mg (0,45 mmol) dicyklohexylcarbodiimid  
i 2,5 ml dimethylsulfoxid. Efter omrøring natten over filtre-  
35 res, og en tilstrækkelig del med det ønskede molekylforhold

sættes langsomt til en opløsning af IgG i 0,1 molær natrium-phosphat/natriumchlorid-buffer (pH 0,8). IgG-koncentration: 2,6 - 3,4 mg/ml. Man lader omrøre i 2 timer ved stuetemperatur, fraskiller proteinfraktionen over en bio-gel P 30-søjle og dialyserer den efter hinanden ved 4°C i 24 timer over for 800 ml 0,9% natriumchlorid - 0,02% natriumazid-opløsning og over for 800 ml af en 0,1 M natriumcitrat-buffer (pH 5,0). Ved frysetørring og lagring ved lav temperatur fås et stabilt tørpræparat, som efter behov opløses i vand pro injectione.

### Eksempel 38

Konjugat af okseserumalbumin (BSA) og 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre.

12,0 g (179,1  $\mu$ mol) BSA opløses ved 0°C i 200 ml destilleret vand. Derefter tilsætter man 20 ml 1N natriumhydroxid og fortynder med 200 ml tetrahydrofuran. Af 2,17 g (11,65 mmol) 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre, 1,774 ml (12,68 mmol) triethylamin og 1,83 ml (12,68 mmol) isobutylchlorformiat fremstilles i 100 ml absolut tetrahydrofuran ved -10°C en opløsning af det blandede anhydrid, og den sættes portionsvis til BSA-opløsningen, således at en temperatur på +2°C ikke overskrides. Man efterrører i to timer ved denne temperatur og inddamper skånsomt materialet til tørhed i vakuum ved en badtemperatur på 15°C. Efter fortynding til 300 ml ultrafiltreres opløsningen over en YM 30-membran (denne operation udføres ved +4°C). Derefter frysetørres opløsningen.

Man får 10,5 g lyofilisat som et løst, hvidt pulver.

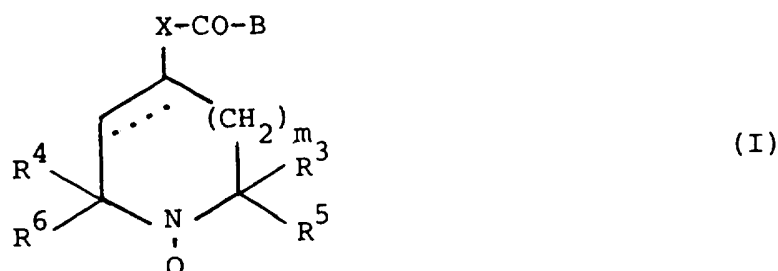
Aminogruppebestemmelse efter Hobeek viste en besættelse af proteinmolekylet på 49,5 aminogruupper, svarende til 95,1% af det teoretiske.

Konjugatet viste ved ascorbinsyreprøven en overraskende høj stabilitet af nitroxylgrupperne.

## P a t e n t k r a v

-----

1. Diagnostisk middel, k e n d e t e g n e t ved, at det indeholder en forbindelse med den almene formel



5 hvor B er en protein-, sukker- eller lipidrest eller en gruppe



..... er en enkeltbinding eller dobbeltbinding, X er gruppen  $-(CH_2)_n-$  eller, hvis ..... er en enkeltbinding, også gruppen  $-NHCO(CH_2)_n-$ , hvor n betyder 0-4, m er tallet 0, 1 eller 2, 15  $R^1$  er en med 1-5 hydroxygrupper, 1-5 acyloxygrupper med 2-6 C-atomer og/eller 1-3 alkylidendioxygrupper med 1-6 C-atomer substitueret alkylgruppe med 2-8 C-atomer,  $R^2$  har samme betydning som  $R^1$  eller betyder et hydrogenatom eller en  $C_1$ - $C_4$ -alkylgruppe,  $R^3$  og  $R^4$  er  $C_1$ - $C_4$ -alkylgrupper, og  $R^5$  og  $R^6$  20 betyder eventuelt med 1-3 hydroxygrupper substituerede alkylgrupper med 1-4 C-atomer.

2. Diagnostisk middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at B er en sukkerrest.

3. Diagnostisk middel ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t 25 ved, at B er en proteinrest.

4. Diagnostisk middel indeholdende 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2-hydroxyethyl)amid.
5. Diagnostisk middel indeholdende 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid.
- 5 6. Forbindelser med den i krav 1 angivne formel I med undtagelse af 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-3-oxyl-3-carboxylsyre-(2-hydroxyethyl)amid, 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid og forbindelser, hvor B er en sukker- eller phospholipidrest;
- 10  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  er alkylgrupper, m og n er 0, og ..... er en dobbeltbinding.
7. Forbindelse ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at den er
- 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydro-
- 15 xy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid,
- 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid,
- 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl-methyl)amid,
- 20 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl-methyl)-N-methyl]amid,
- 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(2,3-dihydroxypropyl)-N-methylamid,
- 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3,4-
- 25 trihydroxybutyl)amid,
- 2,2,5,5-tetraethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid,

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3-dihydroxypropyl)amid,

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-bis-(2-hydroxyethyl)amid,

5 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl-methyl)-N-methyl]amid,

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-N-(2,3-dihydroxypropyl)-N-methylamid,

10 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)ethyl]amid,

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(2,3,4,-trihydroxybutyl)amid,

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-85-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid,

15 2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)amid,

2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid,

20 2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3,4-trihydroxybut-2-yl)amid,

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid,

1,1,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(1,3-dihydroxyprop-2-yl)amid,

2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-1-oxyl-3-carboxylsyre-(5-hydroxy-2,2-dimethyl-1,3-dioxepan-6-yl)amid,

ravsyre-N-[2-hydroxy-2-(2,2-dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)etyl]-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-piperidin-4-yl)diamid,

5 ravsyre-[N-(2,2,6,6-tetramethyl-1-oxyl-piperidin-4-yl)-N'-(2,3,4-trihydroxybutyl)]diamid,

(1-oxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-4-yl)eddikesyre-[N-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)-N-methyl]amid eller

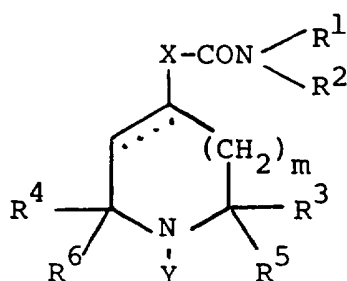
10 ravsyre-[N-(1-oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-3-yl)-N'-methyl-N'-(2,3,4,5,6-pentahydroxyhexyl)]diamid.

8. Diagnostisk middel indeholdende en forbindelse ifølge krav 7.

9. Diagnostisk middel indeholdende en forbindelse ifølge krav 7 som indslutningsforbindelse i liposomer.

15 10. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser ifølge krav 6, hvor B betyder en  $\text{-NR}^1\text{R}^2$ -gruppe, kendet efter net ved, at man

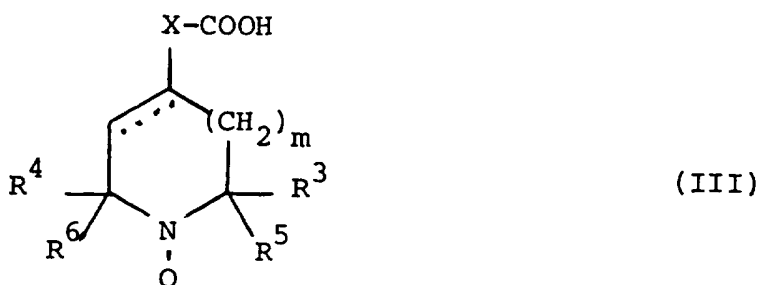
a) på i og for sig kendt måde oxiderer en forbindelse med den almene formel II



(II)

hvor ....., m,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de ovenfor angivne betydninger, og Y er et hydrogenatom eller en hydroxygruppe, eller

b) kondenserer en carboxylsyre med den almene formel III



5 hvor ....., m, X,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de ovenfor angivne betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en amin med den almene formel IV

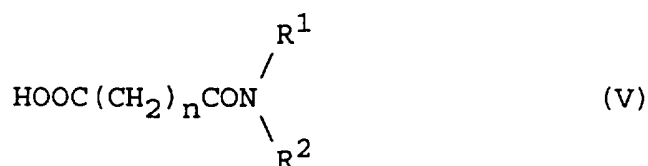
10



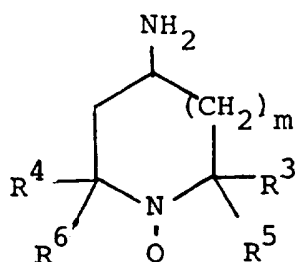
hvor  $R^1$  og  $R^2$  har de ovenfor angivne betydninger, eller

c) kondenserer en carboxylsyre med den almene formel V

15



20 hvor n,  $R^1$  og  $R^2$  har de ovennævnte betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en amin med den almene formel VI



(VI)

hvor  $m$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de ovenfor angivne betydninger, og om ønsket hydrolytisk spalter tilstedeværende ketalgrupper eller acylgrupper.

11. Fremgangsmåde til fremstilling af forbindelser ifølge krav 6, hvor B betyder en protein-, sukker- eller lipidrest, k e n d e t e g n e t ved, at man på i og for sig kendt måde omsætter en carboxylsyre med den i krav 10 angivne formel III, hvor .....,  $m$ ,  $X$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$  og  $R^6$  har de i krav 6 anførte betydninger, eller et reaktionsdygtigt derivat af denne carboxylsyre med en nukleofil gruppe i et protein, en sukkerart eller et lipid.