



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 20 496 T2 2005.08.25

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 124 801 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 20 496.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB99/00231

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 945 671.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/037616

(86) PCT-Anmeldetag: 22.01.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 29.07.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 22.08.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 22.09.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 25.08.2005

(51) Int Cl.⁷: C07D 211/46

C07D 207/12, C07D 207/08, A61K 31/445,
A61K 31/40

(30) Unionspriorität:

9801398 22.01.1998 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Yissum Research Development Company of the
Hebrew University of Jerusalem,
Jerusalem/Jerušalajim, IL

(72) Erfinder:

Änggard, Erik Emil, Oxford, GB; Haj-Yehia,
Abdullah Ibrahim, Jerusalem 91120, IL

(74) Vertreter:

Witte, Weller & Partner, 70178 Stuttgart

(54) Bezeichnung: PIPERIDIN- UND PYRROLIDIN-DERIVATE ENTHALTEND EIN STICKSTOFFOXID DONOR ZUR BE-HANDLUNG VON STRESS

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die in der Lage sind, sowohl als Quellen von Stickstoffmonoxid (NO-Donoren) als auch als Fänger von Superoxidionen (O_2^-) (superoxiddismutase(SOD)-mimatisch) zu wirken.

[0002] Viele Krankheitszustände einschließlich von Diabetes mellitus und verschiedener Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit oxidativem Stress und endothelialer Fehlfunktion verbunden. Insbesondere ist die endotheliale Fehlfunktion sowohl das Merkmal des pathopsychologischen Vorgangs (Atherosklerose), der zu einem Spektrum von klinisch miteinander verwandten Krankheiten des Herz-Kreislauf-Systems (z.B. von stabiler Angina pectoris bis zum Myokardinfarkt (MI) und zur dekompensierten Herzinsuffizienz) führt, als dass sie auch der erste Vorfall in Pathologien ist, die andere Körpersysteme betreffen und die mit Superoxid und/oder anderen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) verbunden sind.

[0003] Seit über einem Jahrhundert ist Nitroglycerin (GTN) das Medikament der Wahl für die Behandlung von verschiedenen Typen von Myokardischämie (Angina) einschließlich des Myokardinfarkts und eine Hauptstütze in der Behandlung von anderen Herzkrankheiten mit ohne ischämischer Etiologie (dekomprimierte Herzinsuffizienz, isolierte systolische und resistente Hypertonie). Auf Grund seiner pathogenen Natur (Chronizität mit akuter Verschlimmerung) sind prophylaktische und akute Behandlungen notwendig, um Komplikationen mit möglicherweise tödlichen Ausgängen (> 25 % Sterblichkeit für akute MI) zu verhindern.

[0004] Das Phänomen der Toleranz gegenüber der Anti-Anginawirkung von GTN und gegenüber allen anderen existierenden organischen Nitraten ist jedoch von besonderer klinischer Bedeutung. Insbesondere die frühe Entwicklung einer Toleranz gegenüber dem Medikament ist bei weitem der schwerste Nachteil der Nitrattherapie, insbesondere während eines akuten Myokardinfarkts.

[0005] Es wurden Beweise geliefert, um einen Einfluss des Superoxidanions in dem (den) Mechanismus (Mechanismen) zu belegen, der (die) der Nitrattoleranz und der Kreuztoleranz zugrunde liegt (liegen) (Munzel et al., J. Clin. Invest. 95, 187-194 (1995)). Gemäß diesem Bericht wurde gefunden, dass erhöhte Level des Superoxidanions die Entwicklung einer Toleranz gegenüber GTN in Vasculärgebebe nach in vivo-Verabreichung des Arzneimittels begleiten. Die Behandlung mit Superoxiddismutase (SOD) erhöht die maximale Entspannung von Kontrollmuster und tolerantem vasculärem Gewebe gegenüber GTN und anderen exogenen und endogenen Vasodilatoren beträchtlich. Dies kann auf Basis eines erhöhenden Effekts von Superoxid auf die Induktion einer Toleranz (Pseudotoleranz) erklärt werden. Es wird davon ausgegangen, dass, wenn das normalerweise streng geregelt Gleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid (O_2^-) in der vasculären Wand gestört wird, erhöhte Level des Superoxidanions auftreten, die das NO deaktivieren und außerdem toxisches Peroxinitrit erzeugen. Die schützende Wirkung von Superoxiddismutase gegenüber Nitrattoleranz wurde in vitro gezeigt (Jia et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 267, 371-378 (1993) und Kowaluk et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 255, 109-144 (1990)). Da SOD ein Enzym ist, ist es jedoch praktisch nicht in der Lage, in Zellen einzudringen und kann daher nicht therapeutisch verwendet werden. Es verbleibt daher die Notwendigkeit einer nitratbasierten Therapie, die nicht unter dem Problem der Nitrattoleranz leidet.

[0006] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird eine chemische Verbindung geschaffen, die einen Stickstoffmonoxid(NO)-Donor und einen Superoxid(O_2^-)-Fänger aufweist.

[0007] Der Stickstoffmonoxid-Donor kann jede Gruppe aufweisen, die in der Lage ist, als Quelle für Stickstoffmonoxid (NO) zu wirken. Vorzugsweise ist der Stickstoffmonoxid-Donor eine ONO_2 -Gruppe. Der Superoxidfänger kann jede Gruppe aufweisen, die in der Lage ist, als Fänger von Superoxid (O_2^-) zu wirken. Vorzugsweise ist der Superoxidfänger eine freie Nitroxidradikal($N\rightarrow O.$)-Gruppe.

[0008] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können einen oder mehrere NO-Donoren und einen oder mehrere Superoxidfänger aufweisen.

[0009] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung stellen nicht nur eine Quelle von Stickstoffmonoxid bereit, sondern rufen, da sie als antioxidierender Fänger von Superoxidanionen wirken, sowohl einen direkten Vorteil, der aus dem Entfernen von schädlichen Superoxidanionen entsteht, als auch einen Vorteil hervor durch Schützen von sowohl von in der Umgebung vorliegendem als auch endogenem und befreitem exogenem NO vor der Inaktivierung durch das Superoxidanion.

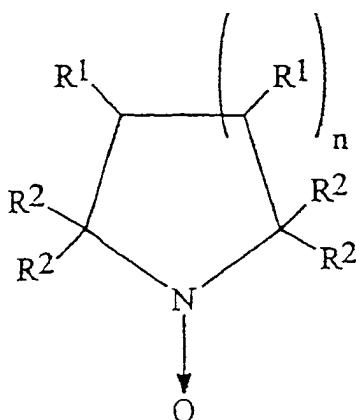
[0010] Ohne eine Beschränkung des Schutzbereichs der Erfindung wird davon ausgegangen, dass die oxi-

dative Schädigung durch intrazelluläre redoxaktive Metallreaktionen weitergeleitet wird, die durch hochreaktive Sauerstoffspezies (d.h. Hydroxylradikale) katalysiert werden. Die Erzeugung von solchen reaktiven Sauerstoffprodukten hängt von der Verfügbarkeit ihres gemeinsamen Vorläufers, des Superoxidanions, ab. von Mitochondrien, Microsomen und verschiedenen anderen Enzymsystemen ist bekannt, dass sie Superoxidanionen produzieren, die mit Stickstoffmonoxid mit oder beinahe mit diffusionsgesteuerten Geschwindigkeiten reagieren, um das starke Oxidans Peroxinitrit zu bilden. Bei pH 7,4 wird Peroxinitrit protoniert und bildet peroxisalpeitrige Säure (pK_a 6,6), die homolytisch zerfällt, um Hydroxil und Stickstoffdioxidradikale zusätzlich zu einer großen Menge anderer Ionen zu bilden. Der Umfang, in dem diese letztgenannten reaktiven Ionen und Radikale Zellschäden und Zelltod verursachen können, hängt von der Geschwindigkeit der Bildung ihres Peroxinitrit-Precursors ab. Unter Kontrollmuster(nicht erkrankten)-Bedingungen, bei denen die Level an NO sich im Gleichgewicht zwischen den Geschwindigkeiten der NO-Synthese und des NO-Abbaus befinden, wird davon ausgegangen, dass die Geschwindigkeit der Bildung dieses Peroxinitrit-Precursors allein von den Leveln des Superoxidanions abhängt. Dies ist insbesondere in Fällen wichtig, die mit „geringer als normalen“ Leveln von „biologisch aktivem“ NO verbunden sind, wie in Krankheiten, für die eine therapeutische Intervention mit exogenen NO-Donoren klinisch angezeigt ist. Als Konsequenz muss die extra- und intrazelluläre Aktivität des Enzyms SOD beim Erhalten des Zellüberlebens, der Gewebeintegrität und einer angemessen ausgeglichenen physiologischen Funktion eine Hauptrolle haben.

[0011] Da das Superoxidanion ein zugängliches und kontinuierlich gebildetes Nebenprodukt ist, das durch normale metabolische Vorgänge erzeugt wird, und da seine Eliminierung entweder durch Dismutation durch das Enzym SOD oder durch seine Reaktion mit NO geregelt ist, um das potenziell gefährliche Peroxinitrit zu bilden, wird jetzt davon ausgegangen, dass das ultimative Mittel, durch das eine Modifikation und/oder eine Behandlung der „pathologischen Vorgänge“, die mit einem unausgeglichenen Verhältnis von NO zu Superoxid verbunden sind, erreicht werden kann, eine Intervention mit therapeutischen Mitteln ist, die in der Lage sind, gleichzeitig und positiv beide Komponenten, das NO und das O_2^- zu beeinflussen.

[0012] Auf Grund dessen, dass die NO-Donor und Superoxid-Fängeraktivitäten physikalisch im gleichen Molekül verbunden sind, stellen die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sicher, dass ein Anstieg im NO-Level von einem reduziertem Level an Superoxid begleitet wird, wodurch hohe Level an Peroxinitrit und oxidierenden Metaboliten davon vermieden werden. Bevorzugte Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung sind die der Formel:

Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung sind die der Formel:



in der R^1 gleich oder unterschiedlich sein können und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff, Alkoyl-, Alkoxy-, Carboxy-, Hydroxy-, Amino-, Amido-, Cyano-, Nitro-, Thio-, Sulfonyl-, Sulfoxid-, Alkylgruppen und Gruppen, die einen NO-Donor aufweisen, vorausgesetzt, dass zumindest ein R^1 eine Gruppe ist, die einen NO-Donor aufweist, wobei der NO-Donor eine $-ONO_2$ -Gruppe ist;

in der R^2 gleich oder unterschiedlich sein können und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus den Alkylgruppen;

in der n eine ganze Zahl, nämlich 1, 2 oder 3 ist;
oder ein Salz davon.

[0013] Die R^1 -Gruppen können gleich oder unterschiedlich sein und sind unabhängig voneinander ausgewählt aus Wasserstoff, Alkoyl-, Alkoxy-, Carboxy-, Hydroxy-, Amino-, Amido-, Cyano-, Nitro-, Thio-, Sulfonyl-, Sulfoxid-, Alkylgruppen und Gruppen, die einen NO-Donorgruppe aufweisen, vorausgesetzt, dass zumindest eine R^1 -Gruppe eine Gruppe ist, die einen NO-Donor aufweist. R^1 -Gruppen, die keine NO-Donorgruppe aufweisen, sind vorzugsweise Wasserstoff oder Alkylgruppen. Die oder jede R^1 -Gruppe, die eine NO-Donorgrup-

pe aufweist, kann eine oder mehrere NO-Donorgruppen aufweisen. Vorzugsweise ist die oder jede NO-Donorgruppe eine -ONO_2 -Gruppe.

[0014] Die oder jede R¹-Gruppe, die eine NO-Donorgruppe aufweist, kann eine NO-Donorgruppe alleine aufweisen oder kann eine NO-Donorgruppe aufweisen, die über eine C₁ bis C₂₀ Alkylenkette verbunden ist, die gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome aufweist. Die Alkylenkette kann verzweigt oder unverzweigt, cyclisch oder acyclisch, gesättigt oder ungesättigt, sein, wobei die cyclische Alkylenkette vorzugsweise C₃ bis C₁₂, bevorzugter C₅ bis C₁₀ und besonders bevorzugt C₅ bis C₇ ist. Wenn die Alkylenkette acyclisch ist, ist sie bevorzugt C₁ bis C₁₆, bevorzugter C₁ bis C₆. Die Alkylenkette kann, wie hier nachstehend in Bezug auf Alkylgruppen definiert, substituiert oder unsubstituiert sein. Die Alkylenkette kann ein oder mehrere Heteroatome, z.B. Stickstoff-, Sauerstoff- oder Schwefelatome aufweisen, die die Alkylenkette unterbrechen oder die Alkylenkette mit der NO-Donorgruppe oder dem Rest des Moleküls verbinden können (so, dass die R¹-Gruppe, die die NO-Donorgruppe aufweist, mit dem Rest des Moleküls über ein Heteroatom wie einen Sauerstoff (z.B. eine Etherbindung), einen Stickstoff (z.B. eine Amino- oder Amidobindung) oder einen Schwefel (z.B. Thioetherbindung) verbunden ist).

[0015] Bevorzugte R¹-Gruppen, die NO-Donoren aufweisen, weisen Gruppen der folgenden Formel auf:



in der X abwesend oder O, NH oder S ist; und
in der Y eine C₁₋₂₀-Alkylenkette ist.

[0016] Vorzugsweise ist X O, NH oder S.

[0017] In einer bevorzugten Ausführungsform ist zumindest eine R¹-Gruppe eine polare oder ionisierbare Gruppe, wie eine Carboxyl- oder Aminogruppe, die die Löslichkeit der Verbindung erhöht.

[0018] Die R²-Gruppen können gleich oder unterschiedlich sein und sind ausgewählt aus den Alkylgruppen. Vorzugsweise sind die R²-Gruppen alle Methylgruppen. In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform sind eine oder mehrere der R²-Gruppen lipophile Gruppen wie substituierte oder unsubstituierte C₁- bis C₈-Alkylgruppen, die in der Lage sind, dem Transport der Verbindung über die Blut-Hirn-Schranke zu assistieren.

[0019] n kann 1, 2 oder 3 sein. Vorzugsweise ist n 1 oder 2, bevorzugter ist n 2.

[0020] Wie hierin verwendet, bedeutet die Bezugnahme auf Alkylgruppen einen verzweigten oder unverzweigten, cyclischen oder acyclischen, gesättigten oder ungesättigten (z.B. Alkenyl oder Alkinyl) Kohlenwasserstoffrest. Wenn sie cyclisch ist, ist die Alkylgruppe vorzugsweise C₃ bis C₁₂, bevorzugter C₅ bis C₁₀, besonders bevorzugt C₅ bis C₇. Wenn sie acyclisch ist, ist die Alkylgruppe vorzugsweise C₁ bis C₁₆, bevorzugter C₁ bis C₆, besonders bevorzugt Methyl. In der vorliegenden Beschreibung bedeutet eine Bezugnahme auf eine Alkoxygruppe eine Alkyl-O-Gruppe. Die Bezugnahme auf eine Alkoylgruppe bedeutet eine Alkyl-CO-Gruppe.

[0021] Die Alkylgruppen können substituiert oder unsubstituiert sein und sind bevorzugt unsubstituiert. Wenn sie substituiert sind, liegen im Allgemeinen 1 bis 3 Substituenten, vorzugsweise 1 Substituent, vor. Die Substituenten können Folgendes einschließen, nämlich Halogenatome und Halomethylgruppen, wie CF₃ und CCl₃; Sauerstoff enthaltende Gruppen, wie Oxo-, Hydroxy-, Carboxy-, Carboxyalkyl-, Alkoxy-, Alkoyl-, Alkoxyloxy-, Aryloxy-, Aryloyl- und Aryloyloxygruppen; Stickstoff enthaltende Gruppen, wie Amino-, Amido-, Alkylamino-, Dialkylamino-, Cyano-, Azid-, Nitrat- und Nitrogruppen; Schwefel enthaltende Gruppen, wie Thiol-, Alkylthiol-, Sulfonyl- und Sulfoxidgruppen; heterocyclische Gruppen die ein oder mehrere, vorzugsweise ein Heteroatom aufweisen, wie Thienyl-, Furanyl-, Pyrrolyl-, Imidazolyl-, Pyrazolyl-, Thiazolyl-, Isothiazolyl-, Oxazolyl-, Pyrrolidinyl-, Pyrrolinyl-, Imidazolidinyl-, Imidazolinyl-, Pyrazolidinyl-, Tetrahydrofuranyl-, Pyranyl-, Pyronyl-, Pyridyl-, Pyrazinyl-, Pyridazinyl-, Benzofuranyl-, Isobenzofuryl-, Indolyl-, Oxyindolyl-, Isoindolyl-, Indazolyl-, Indolinyl-, 7-Azaindolyl-, Isoindazolyl-, Benzopyranyl-, Cumaryl-, Isocumaryl-, Chinolyl-, Isochinolyl-, Naphthridinyl-, Cinnolinyl-, Chinazolinyl-, Pyridopyridyl-, Benzoxazinyl-, Chinoxadinyl-, Chromenyl-, Chromanyl-, Isochromanyl- und Carbolinylgruppen; Alkylgruppen, die selbst wieder substituiert sein können; und Arylgruppen, die selbst wieder substituiert sein können, wie Phenylgruppen und substituierte Phenylgruppen. Alkyl schließt substituierte und unsubstituierte Benzylgruppen ein.

[0022] Eine Bezugnahme auf Aminogruppen schließt substituierte und unsubstituierte Aminogruppen ein.

[0023] In der vorliegenden Erfindung bedeutet eine Bezugnahme auf Halogen einen Fluor-, Chlor-, Brom- oder Iodrest, vorzugsweise einen Fluor- oder Chlorrest.

[0024] Die vorliegende Erfindung erstreckt sich auch auf die Dimere und höhere Multimere der Verbindungen der vorliegenden Erfindung; z.B. Dimere der Verbindungen der vorliegenden Erfindung, die über R¹-Gruppen (z.B. über eine darin enthaltene Alkylenkette) verbunden sind.

[0025] Besonders bevorzugte Verbindungen gemäß der vorliegenden Erfindung schließen Folgendes ein, nämlich

freies 4-Nitro-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-4-mononitrat)

freies 3,4-Dinitro-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3,4-dinitrat)

freies 3,4,5-Trinitro-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3,4,5-trinitrat)

freies 4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal, (4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy) TEMPO)

1,3-di(4-Oxy-TEMPO)-2-nitratopropan

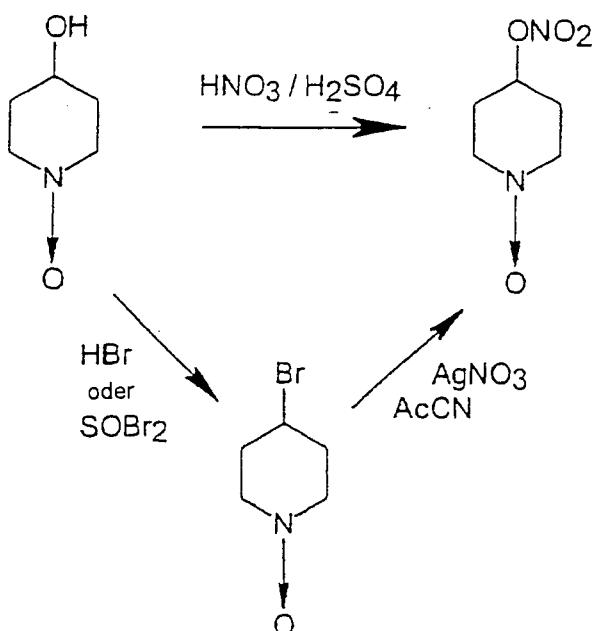
1,4-di(4-Oxy-TEMPO)-2,3-dinitratabutan

freies 3-Nitro-4-carboxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-4-carboxyl-3-nitrat)

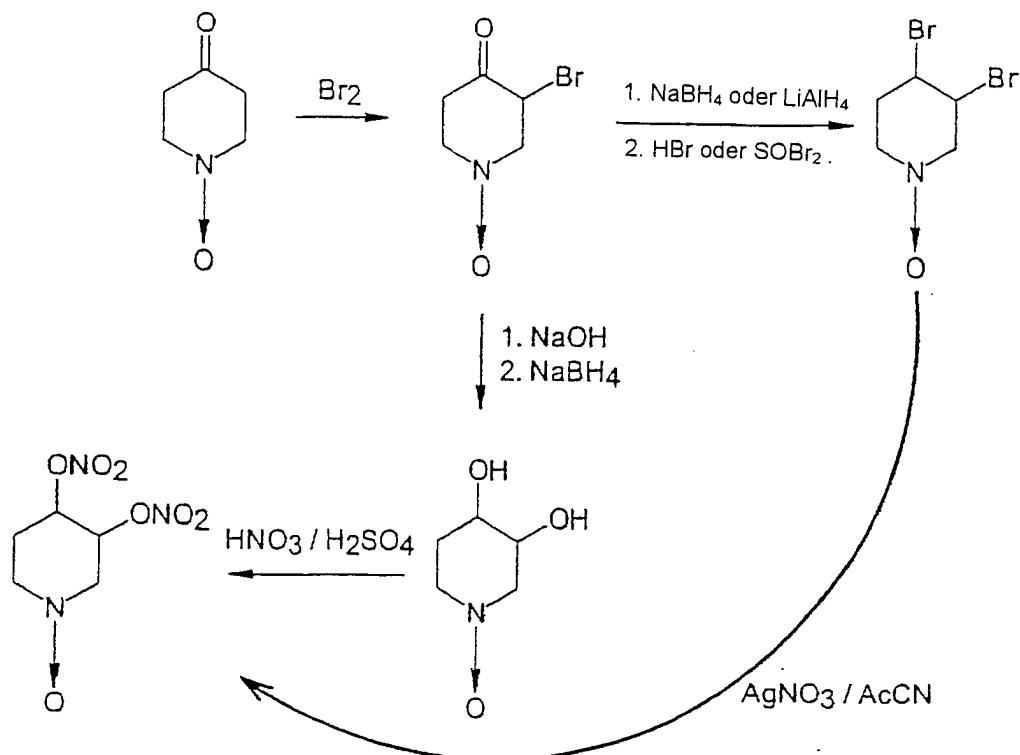
freies 4-Nitro-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-yloxyradikal (PROXYL-3-carbamoyl-4-nitrat).

[0026] Die vorliegende Erfindung erstreckt sich ferner auch auf Verfahren zum Synthetisieren der Verbindungen der vorliegenden Erfindung. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können gemäß den folgenden allgemeinen Reaktionsschemata synthetisiert werden. Es ist dabei verständlich, dass die Reaktionsschemata rein illustrativ für allgemein anwendbare Verfahren sind, die modifiziert werden können, wie dies geeignet ist, um die Verbindungen der vorliegenden Erfindung herzustellen. In den folgenden Reaktionsschemata ist die 2,2,6,6-tetra-Substitution, die z.B. in TEMPO-Verbindungen vorliegt, aus Gründen der Einfachheit nicht dargestellt.

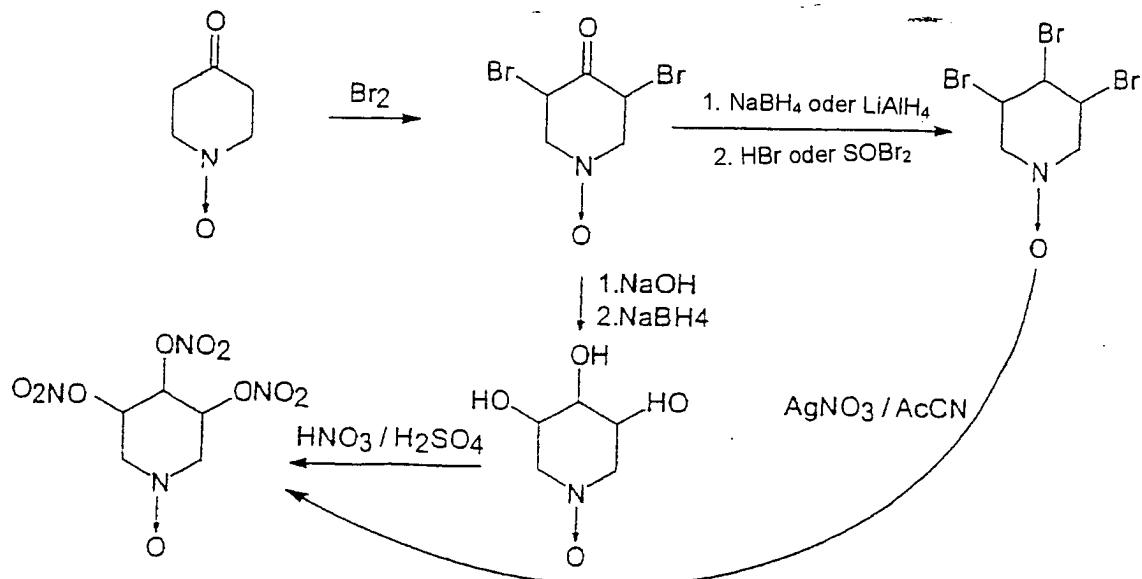
Reaktionsschema 1



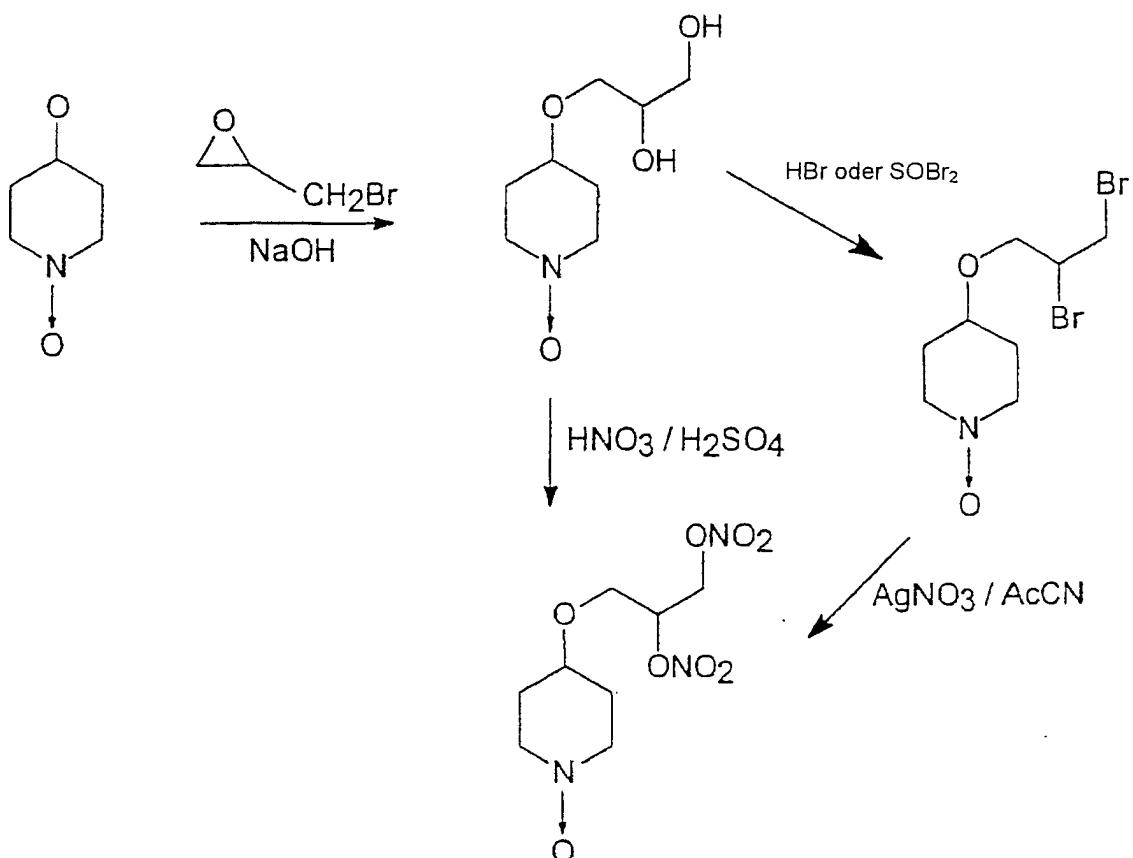
Reaktionsschema 2



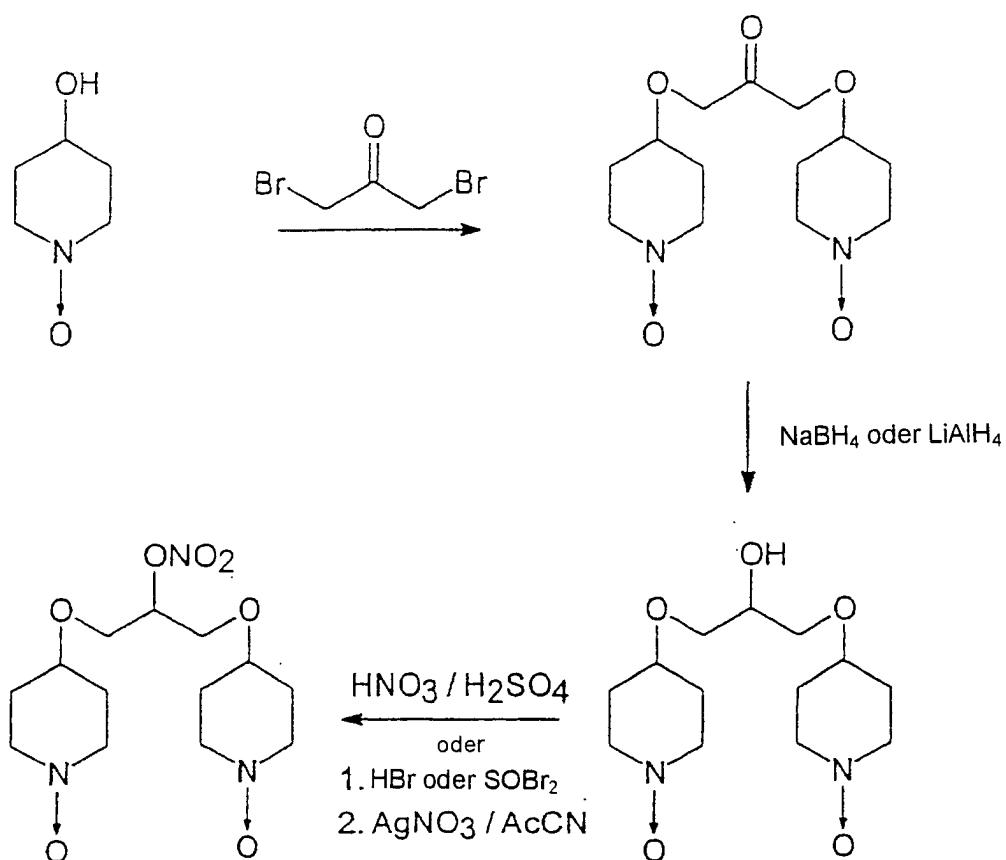
Reaktionsschema 3



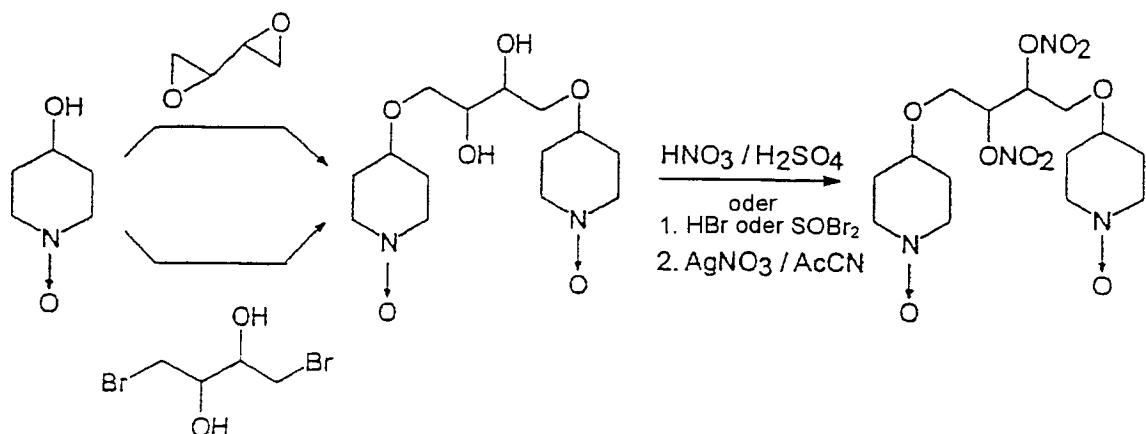
Reaktionsschema 4



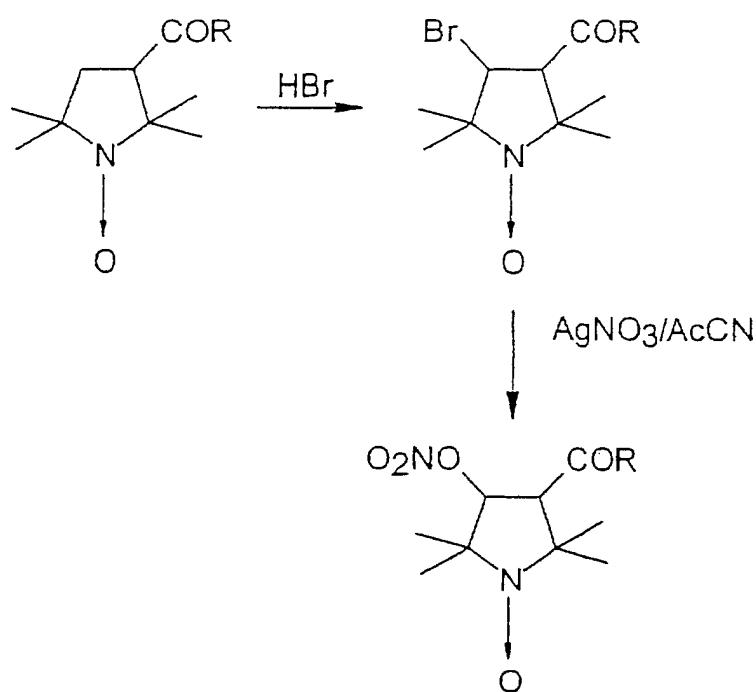
Reaktionsschema 5



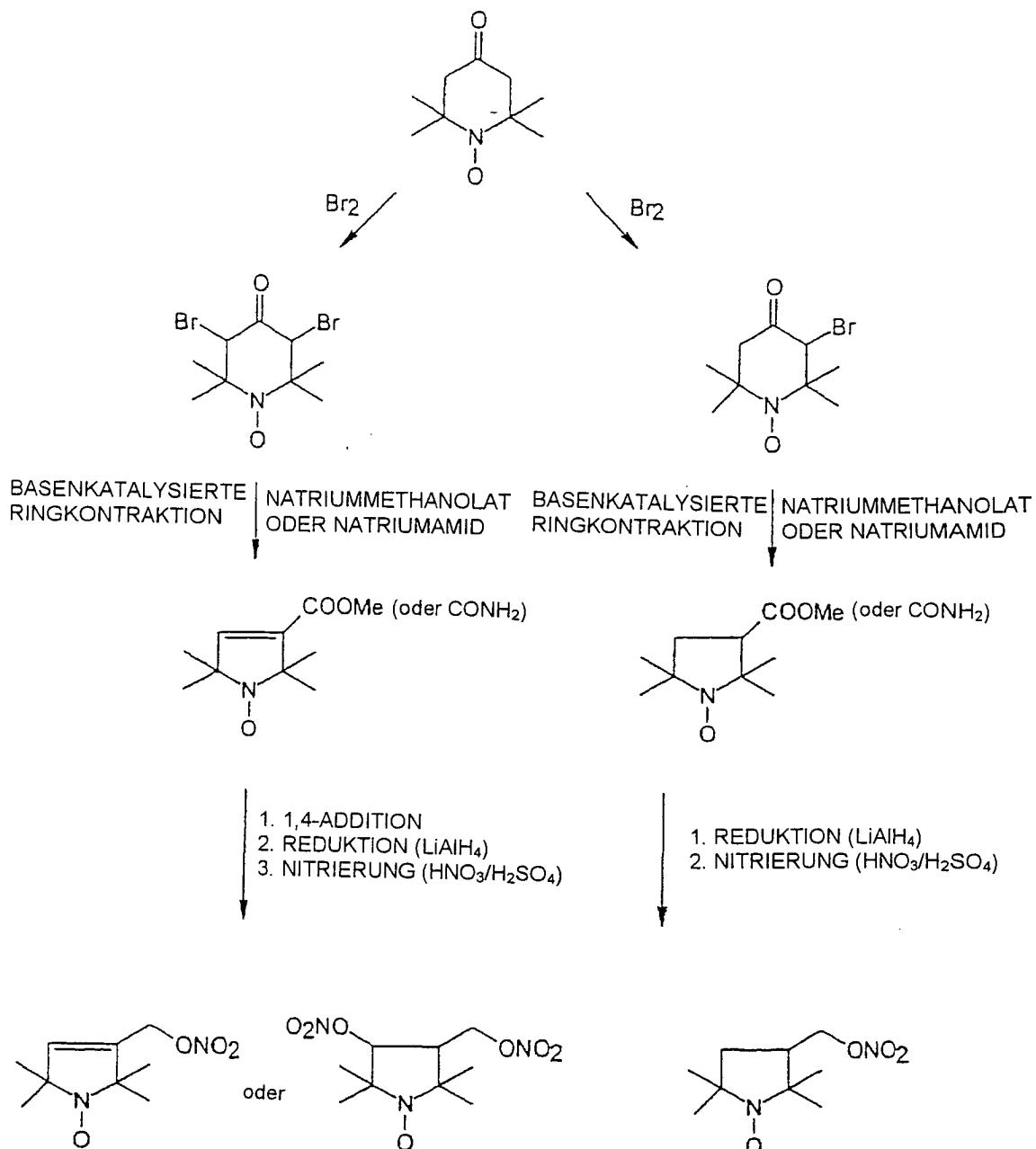
Reaktionsschema 6



Reaktionsschema 7



Reaktionsschema 8



[0027] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung zur Verwendung in einem Behandlungsverfahren bereitgestellt.

[0028] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in der Behandlung eines jeden Zustands eingesetzt werden, der mit endothelialer Fehlfunktion oder oxidativem Stress verbunden ist, einschließlich von Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankungen (wie ischämischen Herzerkrankungen, Angina pectoris, Myokardinfarkt, dekompensierter Herzinsuffizienz, Atherosklerose, Hypertonie und Arrhythmie), Asthma, Trauma, Schock (hypovolämischer, neurogener oder septischer), Neurotoxizität, neurodegenerativen und neurologischen Störungen (einschließlich von Alzheimer und Parkinsonscher Krankheit, amyotropischer Lateralsklerose, multipler Sklerose, konvulsiven (anfallsartigen) Störungen, AIDS-Demenz und Störungen, die mit Lern- und Gedächtnisvorgängen verbunden sind), Störungen der gastrischen Ausscheidungen, Entspannung und Peristaltik des Darmtrakts (einschließlich der Schließmuskeln), Arzneimittel und krankheitsinduzierten Nephropathien, pathologischen (verfrühten) und physiologischen Uteruskontraktionen, zellulären Verteidigungsbehinderungen, durch endothiale Fehlfunktion induzierten Krankheiten und Insulinresistenz bei Diabetes, schwangerschaftsinduzierter Hypertonie, Chemotaxis und phagozytischer Hinderung bei immunologischen Störungen, cerebrovasculären Erkrankungen, Aggregationsstörungen, Fruchtbarkeits- und Reproduktionsstörungen (z.B. Peniserektion und Behandlung von männlicher Impotenz).

[0029] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung einer Verbindung gemäß der vorliegenden Erfindung zur Verwendung in der Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Zustands bereitgestellt, der mit oxidativem Stress oder endothelialer Fehlfunktion verbunden ist, vorzugsweise von Diabetes mellitus oder einer Herz-Kreislauf-Erkrankung.

[0030] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung einer Verbindung der Erfindung in der Behandlung einer Krankheit bereitgestellt, die mit oxidativem Stress oder endothelialer Fehlfunktion verbunden ist (wie Diabetes mellitus oder einer Herz-Kreislauf-Erkrankung), die das Verabreichen einer effektiven Dosis einer Verbindung der vorliegenden Erfindung an einen Patienten aufweist, der eine solche Behandlung benötigt.

[0031] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine pharmazeutische Zusammensetzung bereitgestellt, die eine Verbindung der vorliegenden Erfindung in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten aufweist.

[0032] Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können in einer Form verabreicht werden, die für Folgendes geeignet ist, nämlich zur oralen Verwendung, z.B. als Tablette, Kapsel, wässrige oder ölige Lösung, Suspension oder Emulsion; zur topischen Verwendung einschließlich von transmucosaler und transdermaler Verwendung, z.B. als Creme, Salbe, Gel, wässrige oder ölige Lösung oder Suspension, Balsam, Patch, Pflaster oder Bestandteil eines Gleitmittels für ein Kondom; zur nasalen Verwendung, z.B. als Schnupftabak, Nasenspray oder Nasentropfen, zur vaginalen oder rektalen Verwendung, z.B. als Zäpfchen; zur Verabreichung durch Inhalation, z.B. als fein vermahlenes Pulver oder flüssiges Aerosol; zur sublingualen oder buccalen Verwendung, z.B. als Tablette oder Kapsel oder zur parenteralen Verwendung (einschließlich von intravenös, subkutan, intramuskulär, intravasculär oder durch Infusion), z.B. als sterile wässrige oder ölige Lösung oder Suspension oder in ein biodegradierbares Polymer eingearbeitet. Im Allgemeinen können die zuvor genannten Zusammensetzungen auf konventionelle Weise hergestellt werden, wobei konventionelle Exzipienten und Standardtechniken verwendet werden, die dem Fachmann auf dem Gebiet der Pharmazie bekannt sind. Vorzugsweise wird die Verbindung oral oder topisch verabreicht.

[0033] Zur oralen Verabreichung werden die Verbindungen der Erfindung allgemein in Form von Tabletten oder Kapseln oder als wässrige Lösung oder Suspension bereitgestellt werden.

[0034] Tabletten zur oralen Verwendung können den aktiven Inhaltsstoff vermischt mit pharmazeutisch annehmbaren Exzipienten, wie inerten Verdünnungsmitteln, Sprengmitteln, Bindemitteln, Gleitmitteln, Süßmitteln, Geschmacksmitteln, Färbemitteln und Konservierungsstoffen, einschließen. Geeignete inerte Verdünnungsmittel schließen Folgendes ein, nämlich Natrium- und Calciumcarbonat, Natrium- und Calciumphosphat, und Laktose, während Maisstärke und Alginsäure als Sprengmittel geeignet sind. Bindemittel können Stärke und Gelatine einschließen, während das Gleitmittel, wenn es vorhanden ist, im Allgemeinen Magnesiumstearat, Stearinsäure oder Talk sein wird. Wenn gewünscht, können die Tabletten mit einem Material wie Glycerinmonostearat oder Glycerindistearat beschichtet werden, um die Absorption im Magen-Darm-Trakt zu verzögern.

[0035] Kapseln zur oralen Verwendung schließen harte Gelatinekapseln, in denen die aktive Zutat mit einem festen Verdünnungsmittel vermischt ist, und weiche Gelatinekapseln ein, in denen die aktive Zutat mit Wasser oder einem Öl, wie Erdnussöl, flüssigem Paraffin oder Olivenöl, vermischt ist.

[0036] Zur intramuskulären, intraperitonealen, subkutanen oder intravenösen Verwendung werden die Verbindungen der Erfindung im Allgemeinen in sterilen wässrigen Lösungen oder Suspensionen bereitgestellt und auf einen geeigneten pH und eine geeignete Isotonizität gepuffert werden. Geeignete wässrige Vehikel schließen Folgendes, nämlich Ringer-Lösung und isotonisches Natriumchlorid, ein. Wässrige Suspensionen gemäß der Erfindung können Suspensionsmittel, wie Zellulosedervate, Natriumalginat, Polyvinylpyrrolidon, und Tragacanth-Gummi und ein Netzmittel wie Lecithin einschließen. Geeignete Konservierungsmittel für wässrige Suspensionen schließen Ethyl und n-Propyl-p-hydroxybenzoat ein. Die Verbindungen der Erfindung können auch in einem biodegradierbaren Polymer bereitgestellt werden, z.B. zur Verwendung in Verbindung mit Stents bei der Angioplastie (z.B. auf einen Stent absorbiert oder direkt auf dem Ort der Prozedur aufgebracht für ein langsames Abgeben des aktiven Mittels).

[0037] Es ist verständlich, dass die Dosislevel in Abhängigkeit von Folgendem in einem weiten Bereich variieren können, nämlich, der verwendeten Verbindung, der Schwere der durch den Patienten gezeigten Symptome und dem Gewicht des Patienten. Ohne Einschränkung der vorliegenden Erfindung können typische Do-

sen z.B. für die Behandlung von Angina im Bereich von 1 bis 100 mg, vorzugsweise 5 bis 40 mg, die zwei- oder dreimal täglich gegeben werden, oder 1 bis 200 mg, vorzugsweise 20 bis 50 mg, in Sustained-Release-Formulierungen, die einmal oder zweimal täglich gegeben werden, variieren. Typische Dosen z.B. für einen akuten Myokardinfarkt können im Bereich von 0,1 bis 10 mg, vorzugsweise 1 bis 2 mg, sublingual; 0,5 bis 50 mg, vorzugsweise 5 bis 10 mg oral oder 1 bis 100 µg, vorzugsweise 10 bis 20 µg pro Minute intravenös liegen.

[0038] Die Erfindung wird jetzt in Bezug auf die Figuren beschrieben, in denen:

[0039] [Fig. 1](#) die Inhibition der Reduktion von Ferricytochrom C durch eine Xanthinoxidase/Hypoxanthinsuperoxidanion generierendes System in vitro durch TEMPO-4-mononitrat darstellt. Die Werte sind der Durchschnitt ± SEM.

[0040] [Fig. 2](#) die Relaxationsantwortkurven von Kontrollmuster RARs auf GTN und NO-TEMPO darstellt;

[0041] [Fig. 3](#) die Relaxationsantwortkurven von Kontrollmuster RARs auf SNAP (n=8) und NO-TEMPO (n=11) darstellt;

[0042] [Fig. 4](#) die Relaxationsantwortkurven von Kontrollmuster und GTN-toleranten RARs auf GTN darstellt;

[0043] [Fig. 5](#) Relaxationsantwortkurven von Kontrollmuster (n=11) und GTN-toleranten (n=7) RARs auf NO-TEMPO darstellt;

[0044] [Fig. 6](#) Relaxationsantwortkurven von NO-TEMPO-vorbehandelten RARs (0,44 mM NO-TEMPO) auf GTN und NO-TEMPO darstellt;

[0045] [Fig. 7](#) die Relaxationsantwortkurven von RARs auf NO-TEMPO vor und nach der Vorbehandlung mit 0,44 mM NO-TEMPO darstellt; und

[0046] [Fig. 8](#) Relaxationsantwortkurven von RARs (n=8) auf GTN vor und nach einer Vorbehandlung mit 0,44 mM NO-TEMPO darstellt.

[0047] Es ist verständlich, dass die Erfindung nur anhand von Beispielen beschrieben ist und dass Veränderungen von Details vorgenommen werden können, ohne dabei den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

EXPERIMENTALTEIL

Synthese der Verbindungen

Freies 4-Nitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-4-mononitrat) – (Reaktionsschema 1)

[0048] Die Titelverbindung wurde durch Nitrieren von kommerziell erhältlichem 4-Hydroxy-TEMPO hergestellt. 4-Hydroxy-TEMPO (Aldrich Chemical Co.) (20 mmol) wurde portionsweise zu einer gekühlten (0-5°C) Mischung aus rauchender Salpetersäure (3 ml) und konzentrierter Schwefelsäure (3 ml) zugegeben. Nachdem die Zugabe beendet war, wurde die Mischung auf Raumtemperatur gebracht und weitere 15 Minuten kräftig gerührt. Die Mischung wurde kontinuierlich und tropfenweise unter heftigem Rühren zu einer gekühlten (5°C) Mischung aus Diethylether-Acetonitril:Wasser (150 m1:50 m1:25 ml) zugegeben. Natriumchlorid (5 g) wurde zugegeben, um die Abtrennung der organischen Schicht zu erleichtern, die dann unter reduziertem Druck zur Trockne eingedampft wurde. Der Rückstand wurde in Diethylether (50 ml) gelöst und zweimal mit Eiswasser (20 ml) und einmal mit 2%igem wässrigen Natriumcarbonat (20 ml) gewaschen, bevor er getrocknet ($MgSO_4$) und zur Trockne eingedampft wurde.

[0049] Als Alternative kann die Nitrierung von 4-Hydroxy-TEMPO (und die Nitrierung aller anderen in dieser Erfindung beschriebenen Hydroxy-Vorstufen) leicht durch direktes Aussetzen der Verbindung an das gasförmige Nitrierungsmittel Distickstofftetroxid (N_2O_4) erreicht werden. Hierzu wurde N_2O_4 (1,25 Äquivalente) bis zum gewünschten Gewicht in einen gewogenen vorgekühlten (-20°C) Rundkolben eingefüllt, der 50 ml einer trockenen Tetrahydrofuran-Hexan-Mischung (1:1) enthielt. 4-Hydroxy-TEMPO (1 Äquivalent), das in trockenem Tetrahydrofuran (25 ml, -20°C) gelöst war, wurde tropfenweise unter Rühren zu der Nitrierungslösung zugegeben. Die Reaktionstemperatur wurde während des gesamten Zeitraums der Zugabe unter -10°C gehalten und danach innerhalb von einer Stunde auf Raumtemperatur ansteigen gelassen. Stickstoffgas wurde in die

Reaktionsmischung eingeblassen, bis kein rotes Gas mehr im oberen Teil des Kolbens austretend sichtbar war. Die organischen Lösemittel wurden bis fast zur Trockne eingedampft und der Rückstand in Methyltertbutylether (100 ml) gelöst, einmal mit Wasser (50 ml) und zweimal mit eiskalter 2%iger Natriumbicarbonatlösung gewaschen. Der Ether wurde abgetrennt, getrocknet ($MgSO_4$) und zu Trockne eingedampft.

[0050] Der rote Rückstand wurde durch Säulenchromatographie unter Verwendung von Kieselgel (60) gereinigt und mit Diethylether:Petrolether (20:80) eluiert, um die Titelverbindung in einer Ausbeute von 90 bis 95 % zu ergeben. Die Identität des Produkts wurde durch NMR- und ESR-Spektroskopie und durch Dünnschichtchromatographieanalyse durch Reaktion mit Diphenylamin bestätigt, welches nach Erhitzen auf 80°C für eine Minute eine dunkelgrüne Farbe ergibt, die typisch für nitrierte Nitroxide ist.

[0051] Alternativ wurde die Titelverbindung durch Auflösen von 3,44 g (20 mmol) 4-Hydroxy-TEMPO in 50 ml Dichlormethan hergestellt. Die Mischung wurde in einem Eisbad gekühlt und 6 ml Thionylbromid in 25 ml Dichlormethan wurden tropfenweise über 30 Minuten zugegeben. Nach Abschluss davon wurde die Reaktion für weitere drei Stunden gerührt, während der sie Raumtemperatur erreichte. Das Lösemittel wurde wiederholt mit Wasser (75 ml) und 10 % Natriumcarbonatlösung (75 ml) gewaschen, getrocknet ($MgSO_4$) und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde auf Kieselgel chromatographiert und mit Petrolether:Dichlormethan (80:20) eluiert, um 4,71 g (94 %) reines 4-Brom-TEMPO zu ergeben. Das Produkt wurde in 50 ml Acetonitril gelöst, das 4,25 g (25 mmol) Silbernitrat enthielt. Die Reaktionsmischung wurde für 4 Stunden auf 60°C erwärmt. Das Präzipitat wurde durch Filtration entfernt und mit 30 ml kaltem Acetonitril gewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde unter reduziertem Druck zur Trockne eingedampft und wie zuvor beschrieben durch Chromatographie getrennt, um 4.2 g (87 %) der Titelverbindung zu ergeben.

[0052] Die folgenden Verbindungen wurden unter Verwendung von ähnlichen Verfahren und in Übereinstimmung mit den zuvor dargelegten Reaktionsschemata hergestellt:

freies 3,4-Dinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3,4-dinitrat)

freies 3,4,5-Trinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3,4,5-trinitrat)

freies 4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal, (4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy)TEMPO)

1,3-di(4-Oxy-TEMPO)-2-nitratopropan

1,4-di(4-Oxy-TEMPO)-2,3-dinitrobutan

freies 4-Nitrato-3-carboxyl-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3-carboxyl-4-nitrat).

Freies 3,4-Dinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal TEMPO-3,4-dinitrat) – (Reaktionsschema 2)

[0053] Zu 4,26 g (25 mmol) freies 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyradikal (4-Oxo-TEMPO, Aldrich Chemical Co.), die in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) gelöst waren, wurden portionsweise unter Röhren 4,895 g (27,5 mmol) trockenes feines Pulver von N-Bromsuccinimid über 25 Minuten zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht stehen gelassen und filtriert. Das Präzipitat wurde mit 20 ml CCl_4 gewaschen und das vereinigte Filtrat wurde unter reduziertem Druck zur Trockne eingedampft. Der rote ölige Rückstand (der sich nach einem Stehenlassen von einem Tag zu einem wachsartigen Produkt verfestigt) wurde auf Kieselgel chromatographiert und mit Chloroform:Hexan (60:40) eluiert, um 5,42 g (87 %) 3-Brom-4-oxo-TEMPO zu ergeben. Das Produkt wurde in 50 ml trockenem Diethylether gelöst und auf einmal zu 25 ml einer eiskalten 1,0 M Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether zugegeben. Nach 30 Minuten Röhren in einem Eisbad wurden 25 ml Methanol tropfenweise zugegeben, um überschüssiges Hydrid zu zerstören.

[0054] Das Lösemittel wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rohrückstand wurde in Dichlormethan (50 ml) gelöst und bei Raumtemperatur 5 Stunden mit Thionylbromid (6 ml) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde zweimal mit gleichen Volumen Wasser und zweimal mit 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen und die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde das gewünschte Dibromderivat durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60) nach Elution mit Petrolether isoliert. Das rote ölige Produkt wurde in 50 ml Acetonitril, das 30 mmol Silbernitrat enthielt, gelöst und die Nitrierung und Abtrennung des gewünschten dinitrierten Derivats wie zuvor für das mononitrierte TEMPO beschrieben durchgeführt.

Freies 3,4,5-Trinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (TEMPO-3,4,5-trinitrat) – (Reaktionsschema 3)

[0055] Zu 4,26 g (25 mmol) freies 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyradikal (4-Oxo-TEMPO, Aldrich Chemical Co.), die in 150 ml Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) gelöst waren, wurden portionsweise unter Röhren 98 g (55 mmol) trockenes feines Pulver von N-Bromsuccinimid über 25 Minuten zugegeben. Die Reaktion wurde

über Nacht stehen gelassen und filtriert. Das Präzipitat wurde mit 25 ml CCl₄ gewaschen und das vereinigte Filtrat wurde unter reduziertem Druck zur Trockne eingedampft. Der rote ölige Rückstand wurde auf Kieselgel chromatographiert und mit Chloroform:Hexan (30:70) eluiert, um 6,75 g (82%) 3,5-Dibrom-4-oxo-TEMPO zu ergeben. Das Produkt wurde in 100 ml trockenem Diethylether gelöst und auf einmal zu 50 ml einer eiskalten 1,0 M Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether zugegeben. Nach 20 Minuten Rühren in einem Eisbad wurden 25 ml Methanol tropfenweise zugegeben, um überschüssiges Hydrid zu zerstören.

[0056] Das Lösemittel wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der Rohrückstand wurde in Dichlormethan (50 ml) gelöst und bei Raumtemperatur 5 Stunden mit Thionylbromid (6 ml) behandelt. Die Reaktionsmischung wurde zweimal mit gleichen Volumen Wasser und zweimal mit 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen und die organische Phase wurde abgetrennt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Entfernen des Lösemittels unter reduziertem Druck wurde das gewünschte Dibromderivat durch Säulenchromatographie (Kieselgel 60) nach Elution mit Heptan isoliert. Das rote ölige Produkt wurde in 150 ml Acetonitril, das 0,1 M Silbernitrat enthielt, gelöst und die Nitrierung und die Abtrennung des gewünschten dinitrierten Derivats wie zuvor für das mono- und dinitrierte TEMPO beschrieben durchgeführt.

Freies 4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (4-[2,3-Dinitratorprop-1-oxy]TEMPO) – (Reaktionsschema 4)

[0057] 4,3 g 4-Hydroxy-TEMPO (25 mmol) wurden in 50 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. 0,66 g (27,5 mmol) metallisches Natrium wurden auf einmal zugegeben und die Reaktionsmischung wurde für 40 Minuten kräftig gerührt. 25 ml THF, das 3,76 g (27,5 mmol) Epibromhydrin enthielt, wurde tropfenweise über 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Rühren zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde zur Trockne eingedampft und der Rückstand 3 Stunden bei 55°C mit 20%iger Natriumhydroxidlösung behandelt. Nach dem Abkühlen wurde die Reaktionsmischung dreimal mit je 50 ml Essigester extrahiert.

[0058] Die organische Schicht wurde abgetrennt und die vereinigten Extrakte getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der viskose ölige Rückstand wurde zu einer gekühlten (0°C) Mischung aus rauchender Salpetersäure und Schwefelsäure (je 3,7 ml) zugegeben und 30 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 1-ml-Portionen in 300 ml einer kalten Wasser:Acetonitril:Diethylether-Mischung (10:20:70) gegossen und 10 Minuten gerührt, wobei Stickstoffgas in die gerührte Lösung eingeleitet wurde. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser und 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der rötliche ölige Rückstand wurde über Kieselgel getrennt und mit Chloroform eluiert, um 5,1 g (61 % bezogen auf 4-Hydroxy-TEMPO) des gewünschten Produkts freies 4-(2,3-Dinitratorprop-1-oxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal (4-[2,3-Dinitratorprop-1-oxy]TEMPO) zu ergeben.

1,3-Di-(4-oxy-TEMPO)-2-nitratopropan – (Reaktionsschema 5)

[0059] 8,6 g (50 mmol) 4-Hydroxy-TEMPO wurden in 80 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. 1,44 g (60 mmol) metallisches Natrium wurde auf einmal zugegeben und die Reaktionsmischung 40 Minuten kräftig gerührt. 25 ml THF, das 5,4 g (25 mmol) Dibromacetone enthielt wurde unter Rühren über eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde in einem Eisswasserbad gekühlt und 30 ml einer 1,0 M Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether wurden auf einmal zugegeben. Nach 20 Minuten Rühren in einem Eisbad wurden 25 ml Methanol tropfenweise zugegeben, um überschüssiges Hydrid zu zerstören. Das Lösemittel wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der viskose ölige Rückstand wurde zu einer gekühlten (0°C) Mischung aus rauchender Salpetersäure und Schwefelsäure (je 3,7 ml) zugegeben und 30 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 1-ml-Portionen in 300 ml einer kalten Wasser:Acetonitril:Diethylether-Mischung (10:20:70) gegossen und 10 Minuten gerührt, wobei Stickstoffgas in die gerührte Lösung eingeleitet wurde. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser und einer 5%igen Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der rötliche ölige Rückstand wurde über Kieselgel getrennt und mit Dichlormethan:Diethylether (80:20) eluiert, um 6,45 g (57 % bezogen auf 4-Hydroxy-TEMPO) des gewünschten Produkts 1,3-Di-(4-oxy-TEMPO)-2-nitratopropan zu ergeben.

1,4-Di-(4-oxo-TEMPO)-2,3-dinitratopropan – (Reaktionsschema 6)

[0060] 8,6 g (50 mmol) 4-Hydroxy-TEMPO wurden in 80 ml trockenem Tetrahydrofuran (THF) gelöst und in einem Eisbad gekühlt. 1,44 g (60 mmol) metallisches Natrium wurde auf einmal zugegeben und die Reaktionsmischung wurde 40 Minuten kräftig gerührt. 25 ml THF, das 2,15 g (25 mmol) (\pm)-1,3-Butadiendiepoxid enthielt wurde unter Rühren tropfenweise über 5 Stunden bei Raumtemperatur zugegeben. Die Reaktionsmischung

wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der viskose ölige Rückstand wurde zu einer gekühlten (0°C) Mischung aus rauchender Salpetersäure und Schwefelsäure (je 5,8 ml) zugegeben und 30 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 1-ml-Portionen in 300 ml einer kalten Wasser:Acetonitril:Diethylether-Mischung (10:20:70) gegossen und 10 Minuten gerührt, wobei Stickstoffgas in die gerührte Lösung eingeleitet wurde. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser und 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft.

[0061] Der rötliche ölige Rückstand wurde über Kieselgel getrennt und mit Dichlormethan:Diethylether (60:40) eluiert, um 5,59 g (43 % bezogen auf 4-Hydroxy-TEMPO) des gewünschten Produkts 1,4-Di-(4-oxo-TEMPO)-2,3-dinitropropan zu ergeben.

4-Nitrato-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-yloxyradikal (PROXYL-3-carbamoyl-4-nitrat) – (Reaktionsschema 7)

[0062] 3,6 g (20 mmol) freies 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-yloxyradikal, das kommerziell von der Aldrich Chemical Co. erhältlich ist, wurde portionsweise zu 6 ml einer kalten konzentrierten Bromwasserstofflösung zugegeben, die 50 mg 1,1'-Azobis(cyclohexancarbonitril) enthielt, und über Nacht gerührt. Die resultierende Lösung wurde mit 14 ml eiskaltem Wasser verdünnt und fünfmal mit je 50 ml Ether extrahiert. Die vereinigten Etherextrakte wurden zweimal mit Wasser und zweimal mit je 30 ml 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen. Das organische Lösemittel wurde getrocknet (Natriumsulfat) und zur Trockne eingedampft. Das resultierende rohe 4-Brom-3-carboxyderivat wurde in 50 ml Acetonitril gelöst, 6 g Silbernitrat wurden zugegeben und die Lösung wurde zwei Stunden unter Rückfluss erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die anorganischen Salze durch Filtration entfernt und die organischen Lösemittel wurden entfernt. Der Rückstand wurde mit einer Mischung einer Hexan-Ether-Lösung (1:1) verrieben und das Lösemittel abgezogen. Der Rückstand wurde dann durch Flash-Chromatographie (Dichlormethan:Essigester 4:1) getrennt, um die reine Titelverbindung zu ergeben.

3-Nitratomethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidinyloxyradikal (3-Nitratomethyl-PROXYL) – (Reaktionsschema 8)

[0063] Zu 4,26 g (25 mmol) freies 4-Oxo-2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxyradikal (4-oxo-TEMPO), die in 50 ml Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) gelöst waren, wurden unter Röhren portionsweise 4,895 g (27,5 mmol) getrocknetes feines Pulver von N-Bromsuccinimid über 25 Minuten zugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht stehen gelassen und filtriert. Das Präzipitat wurde mit 20 ml CCl_4 gewaschen und das vereinigte Filtrat unter verminderter Druck zur Trockne eingedampft. Der rote ölige Rückstand (der sich nach einem Stehenlassen für einen Tag zu einem wachsartigen Produkt verfestigt) wurde auf Kieselgel chromatographiert und mit Chloroform:Hexan (60:40) eluiert, um 5,42 g (87 %) 3-Bromo-4-oxo-TEMPO zu ergeben. Das Produkt wurde in 20 ml Methanol gelöst und tropfenweise zu 30 ml einer eiskalten, frisch hergestellten Lösung von Natriummethanolat (60 mmol) zugegeben. Nach dem Ende der Zugabe wird die Reaktionsmischung bei Raumtemperatur 5 Stunden gerührt, nach deren Ende die Reaktion 30 Minuten unter Rückfluss erwärmt wird. Nach dem Abkühlen wurde das Lösemittel filtriert und unter reduziertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 ml trockenem Diethylether gelöst und tropfenweise zu 30 ml einer 1,0 M Lösung von Lithiumaluminiumhydrid in Diethylether zugegeben. Nach 20 Minuten Röhren in einem Eisbad wurden 25 ml Methanol tropfenweise zugegeben, um überschüssiges Hydrid zu zerstören. Das Lösemittel wurde filtriert und zur Trockne eingedampft. Der viskose ölige Rückstand wurde zu einer gekühlten (0°C) Mischung aus rauchender Salpetersäure und Schwefelsäure (je 3,7 ml) zugegeben und 30 Minuten gerührt. Die Reaktionsmischung wurde in 1-ml-Portionen in 300 ml einer kalten Wasser:Acetonitril:Diethylethermischung (10:20:70) gegossen und 10 Minuten gerührt, wobei Stickstoffgas in die gerührte Lösung eingeleitet wird. Die organische Phase wurde abgetrennt, mit Wasser und 5%iger Natriumcarbonatlösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und zur Trockne eingedampft. Der gelborange ölige Rückstand wurde über Kieselgel getrennt und mit Dichlormethan:Hexan (80:20) eluiert, um die Titelverbindung freies 3-Nitratomethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidinyloxyradikal (3-Nitratomethyl-PROXYL) in 63 % Ausbeute zu ergeben.

Biologische Tests

Bewertung der Superoxidfänger-Aktivität in vitro

[0064] Die Superoxidfänger-Aktivität von TEMPO-4-mononitrat (0,003-3 mM) und der Referenzverbindung Superoxiddismutase (SOD, 200 U/ml) wurden unter Verwendung eines photometrischen Mikroassays in vitro bestimmt (Laight et al., Environ. J. Toxicol. Pharmacol., 3, 65-68, 1997) der aus dem Assay von McCord & Fridovich (J. Biol. Chem., 244, 6059-55, 1969) entwickelt wurde. Die Assaymischung bestand aus (Endkonzent-

ration): 50 µl Ferricytochrom c (100 µM); 10 µl Xanthinoxidase (20 mU/ml); 20 µl Hypoxanthin (100 µM); und 20 µl Probe, die in isotonischer phosphat-(10 mM)-gepufferter Salzlösung (PBSm pH 7,4) gelöst war, um ein Gesamtvolumen von 100 µl in einer 96-Well-Platte zu ergeben. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und durch die Zugabe von Hypoxanthin gestartet. Der Anstieg der optischen Dichte (OD) bei 500 nm wurde über einen Zeitraum von 3 Minuten in 30-Sekunden-Intervallen gemessen und die anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeiten zumindest dreifach bestimmt.

[0065] Es gab eine lineare Beziehung zwischen der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit und der Konzentration an Xanthinoxidase (5-20 mU/ml) ($r=0,9982$, $p<0,002$, $n=4$). Blindkontrollmuster, bei denen entweder das Enzym oder das Substrat fehlte, zeigten keine Aktivität. Xanthinoxidase mit 20 mU/ML, die eine anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit von $28,3\pm1,7$ mOD/min ($n=4$) ergab, wurde für die anschließenden Inhibitionsstudien verwendet (siehe McCord & Fridovich, 1969). Die anfängliche Reaktionsgeschwindigkeit wurde durch SOD (200 U/ml) um $95,3\pm1,1$ % ($n=4$, $P<0,01$) und durch TEMPO-4-mononitrat (siehe [Fig. 1](#)) vermindert. TEMPO-4-mononitrat zeigte einen pIC_{50} -Wert von $2,89\pm0,03$ ($n=5$, $p<0,001$).

Vasorelaxation und toleranzinduzierende Eigenschaften

[0066] Materialien: Männliche Sprague-Dawley-Ratten (250-300 g) wurden von der Tierbetreuungsanstalt der Hebräischen Universität erworben und in den Rattenortaringen(RARs)-Relaxationsstudien in vitro und den Blutdruckbeobachtungs- und cGMP-Studien in vivo verwendet.

[0067] In vitro-Vasorelaxation: Thoratische Aorten wurden im Anschluss an eine Anästhesie durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylacina (50 bzw. 10 ml/kg) entfernt. Das paraadvententiale Gewebe, das die Gefäße umgibt, wurde vorsichtig entfernt. Die Aorten wurden in Ringe von 4-5 mm geschnitten und an dem Gewebepfad angebracht. Der Pfad-Puffer (Krebs-Bicarbonat) wurde konstant mit Carbogen begast und bei 37°C gehalten. Die Ringe wurden unter 2 g Spannung vorgeladen und für 90 Minuten equilibriert, wobei der Puffer alle 15 Minuten gewechselt wurde. Nach der Stabilisierung wurden die Ringe mit Epinephrin (1 µM) kontrahiert. Kummulative Konzentrationsantwortkurven (CCRC) wurden für NO-TEMPO, Glyceryltrinitrat (GTN) und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) konstruiert. [Fig. 2](#) und [Fig. 3](#) stellen den vasorelaxierenden Effect von NO-TEMPO im Vergleich zu den konventionellen NO-Donoren GTN und SNAP dar. Diese Figuren zeigen die Überlegenheit von NO-TEMPO gegenüber diesen beiden NO-Donoren.

[0068] In vitro-Induktion von GTN-Toleranz: Die Aortaringe wurden wie für die Kontrollstudien behandelt, außer dass die Ringe eine Stunde an 0,44 mM GTN ausgesetzt wurden. Am Ende dieses toleranzinduzierenden Zeitraums wurden die Ringe für die folgende Stunde alle 15 Minuten gewaschen. Die versuchte Induktion einer Toleranz gegenüber NO-TEMPO wurde unter den gleichen Bedingungen wie für GTN durchgeführt, wobei die Ringe einer 0,44 mM Lösung von NO-TEMPO ausgesetzt wurden. CCRC wurden für NO-TEMPO und GTN konstruiert. [Fig. 4](#) zeigt den vasorelaxierenden Effekt von GTN auf Ringe vor und nach dem Aussetzen an 0,44 mM des Arzneimittels und zeigt klar die Entwicklung einer GTN-Toleranz unter diesen Bedingungen. Diese Toleranz kreuzt ebenfalls zu NO-TEMPO über, wie dieses aus [Fig. 5](#) ersichtlich ist, in der ein merklicher Unterschied zwischen den Effekten von NO-TEMPO auf Ringe vor und nach der Vorbehandlung mit GTN besteht. wenn die vasorelaxierenden Aktivitäten von NO-TEMPO und GTN jedoch unter Verwendung von NO-TEMPO-vorbehandelten RARs untersucht wurde, ergaben sich zwischen Kontrollmuster-RARs ([Fig. 2](#)) und NO-TEMPO-vorbehandelten RARs ([Fig. 6](#)) keine merklichen Unterschiede für die Wirksamkeiten dieser Arzneimittel. Diese Beobachtung zeigt, dass sich unter den angewendeten Bedingungen keine Toleranz gegenüber NO-TEMPO entwickelt. Diese Schlussfolgerung wird weiter durch das evaluieren des vasorelaxierenden Effekts jedes dieser Arzneimittel auf kontrollmuster- und NO-TEMPO-vorbehandelte RARs unterstützt. So wurde, wie dieses aus [Fig. 7](#) ersichtlich ist, kein merklicher Unterschied in der vasorelaxierenden Wirksamkeit von NO-TEMPO zwischen kontrollmuster- und NO-TEMPO-vorbehandelten RARs beobachtet. In ähnlicher Weise besteht kein merklicher Unterschied in der Wirksamkeit von GTN zwischen Kontrollmuster und NO-TEMPO-vorbehandelten RARs ([Fig. 8](#)). Diese Ergebnisse zeigen, dass, während GTN Toleranz gegenüber sich selbst und gegenüber NO-TEMPO induziert, NO-TEMPO weder Toleranz gegenüber sich selbst, noch gegenüber GTN induziert.

In vivo-Vasorelaxation und Induktion von GTN-Toleranz

[0069] Die Ergebnisse, die aus dem Evaluieren der hypotensiven Effekte von NO-TEMPO in vivo erhalten wurden, zeigten ebenfalls die Überlegenheit dieses Arzneimittels gegenüber GTN und SNAP. Die vasculären cGMP-Messungen im Anschluss an eine in vivo-Gabe von NO-TEMPO zeigten außerdem dessen überlegene Aktivität im Vergleich zu GTN in Kontrollmusterratten und das Fehlen einer Toleranzinduktion gegenüber seiner

Wirkung in NO-TEMPO-vorbehandelten Ratten.

[0070] In den in vivo-Experimenten wurden Ratten mit einer intraperitonealen Injektion einer Kombination aus Ketamin und Xylacina (50 bzw. 10 mg pro kg) anästhesiert. Ein Katheter wurde in der rechten externen Jugularvene platziert und auf den Level des rechten Atriums eingeführt. Ein zweiter arterieller Katheter wurde in der linken Carotis platziert und auf dem Level der ansteigenden Aorta eingeführt. Die Spitze des arteriellen Katheters wurde mit einem Drucktransducer verbunden, der mit einem weiteren elektrischen Transducer verbunden ist, der mit einem computerisierten Experimeta-System verbunden ist. Der Blutdruck (durchschnittlicher Arteriendruck = MAP) wurde vor (basal) und nach der Arzneimittelgabe aufgenommen. NO-TEMPO wurde durch den venösen Katheter injiziert und induzierte eine merkliche Abnahme im MAP, die für 5 bis 10 Minuten anhielt. Die Werte für den basalen MAP lagen bei 130 ± 15 und bei 60 ± 10 mm Hg im Anschluss an eine 1-mg-Injektion von NO-TEMPO. Anders als bei GTN und SNAP, bei denen sich eine Abmilderung ihrer Wirkung auf den MAP entwickelt, war die hypotensive Wirkung von NO-TEMPO auf den MAP konsistent und war im Anschluss an aufeinander folgende Verabreichungen von NO-TEMPO wiederholbar, was das Fehlen einer Entwicklung einer Toleranz gegenüber dem Arzneimittel anzeigen.

Die Auswirkung auf cGMP und die Toleranz gegenüber organischen Nitraten

[0071] Die Verabreichung von TEMPO-4-mononitrat resultierte in einem merklichen Anstieg des cGMP-Gehalts in vasculärem Gewebe. Obwohl es nur eine Nitratgruppe aufweist, ist, wenn beide Arzneimittel intravenös in equimolaren Dosen an Kontrollmusterratten verabreicht werden, die Wirkung von TEMPO-4-mononitrat auf das vasculäre cGMP mit der von GTN vergleichbar, obwohl letztere 3 solche Gruppen enthält.

[0072] Experimente wurden in wie zuvor beschriebenen anästhetisierten Ratten durchgeführt. Im Anschluss an eine i.v.-Verabreichung von NO-TEMPO (0,1, 0,2, 0,5 mg usw.) wurde der Thorax geöffnet und die Aorta sofort entnommen (innerhalb von 30 Sekunden nach der Verabreichung). Nach den üblichen Verarbeitungsprozeduren wurde der cGMP-Gehalt in dem vasculären Gewebe durch einen Radioimmunoassay (RIA) unter Verwendung von kommerziell erhältlichen Kits (d.h. Kit 500 TRK von Amersham) gemessen. Typische Basalwerte von cGMP in Aortagewebe lagen bei 46 ± 10 gegenüber 197 ± 18 pmol/g Gewebe, die im Anschluss an die Gabe von 1 mg NO-TEMPO erhalten wurde (ein vier- bis fünffacher Anstieg des vasculären cGMPs).

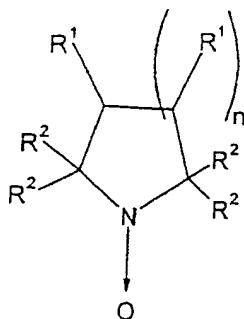
[0073] Wenn es subkutan (30 mg/kg t.i.d. für drei aufeinander folgende Tage) verabreicht wird, induziert NO-TEMPO weder Toleranz gegenüber sich selbst, noch gegenüber GTN, wobei GTN, das auf gleichem Weg verabreicht wird, eine Toleranz gegenüber sich selbst und gegenüber NO-TEMPO induziert.

Zusammenfassung

[0074] Es ist klar, dass die Verbindungen der vorliegenden Erfindung sowohl eine superoxidfangende als auch eine Vasodilatoraktivität zeigen, und somit die kombinierten Rollen von organischen Nitraten und Antioxidanzien erfüllen. Ferner wirken sie als wirksame Superoxidanionenfänger in Konzentrationen, die therapeutische Mengen an NO freisetzen. Zusätzlich dazu induzieren die Verbindungen der vorliegenden Erfindung keine Toleranz gegenüber sich selbst oder konventionellen organischen Nitraten. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung haben somit außergewöhnlichen therapeutischen Nutzen, insbesondere unter Bedingungen mit negativer Empfänglichkeit gegenüber organischen Nitraten.

Patentansprüche

1. Chemische Verbindung nach Anspruch 1 der Formel:



in der

R¹ gleich oder unterschiedlich sein können und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus Wasserstoff, Alkoyl-, Alkoxy-, Carboxy-, Hydroxy-, Amino-, Amido-, Cyano-, Nitro-, Thio-, Sulphonyl-, Sulphoxid-, Alkylgruppen und Gruppen, die einen NO-Donor aufweisen, vorausgesetzt, dass zumindest ein R¹ eine Gruppe ist, die einen NO-Donor aufweist, wobei der NO-Donor eine -ONO₂-Gruppe ist;
R² gleich oder unterschiedlich sein können und unabhängig voneinander ausgewählt sind aus den Alkylgruppen;
n eine ganze Zahl, nämlich 1, 2 oder 3 ist; oder ein Salz davon.

2. Chemische Verbindung nach Anspruch 1, in der R² Methylgruppen sind.

3. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, in der n 1 oder 2 ist.

4. Verbindung nach Anspruch 3, in der n gleich 2 ist.

5. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, in der zumindest ein R¹ eine Gruppe der folgenden Formel ist: -X-Y-ONO₂ in der
X abwesend oder O, NH oder S ist; und
Y eine C₁-C₂₀-Alkylenkette ist.

6. Verbindung ausgewählt aus den folgenden Verbindungen:

freies 4-Nitrito-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal;
freies 3,4-Dinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal;
freies 3,4,5-Trinitrato-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal;
freies 4-(2,3-Dinitratoprop-1-oxy)-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyradikal;
1,3-Di(4-oxy-TEMPO)-2-nitratopropan;
1,4-Di(4-oxy-TEMPO)-2,3-dinitratobutan;
freies 4-Nitrito-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-yloxyradikal; und
freies 3-Nitratomethyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin-1-yl-oxyradikal.

7. Freies 4-Nitrito-2,2,6,6-tetramethylpiperidenyloxyradikal.

8. Freies 4-Nitrito-3-carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidin-1-yloxyradikal.

9. Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, zur Verwendung in einem Behandlungsverfahren.

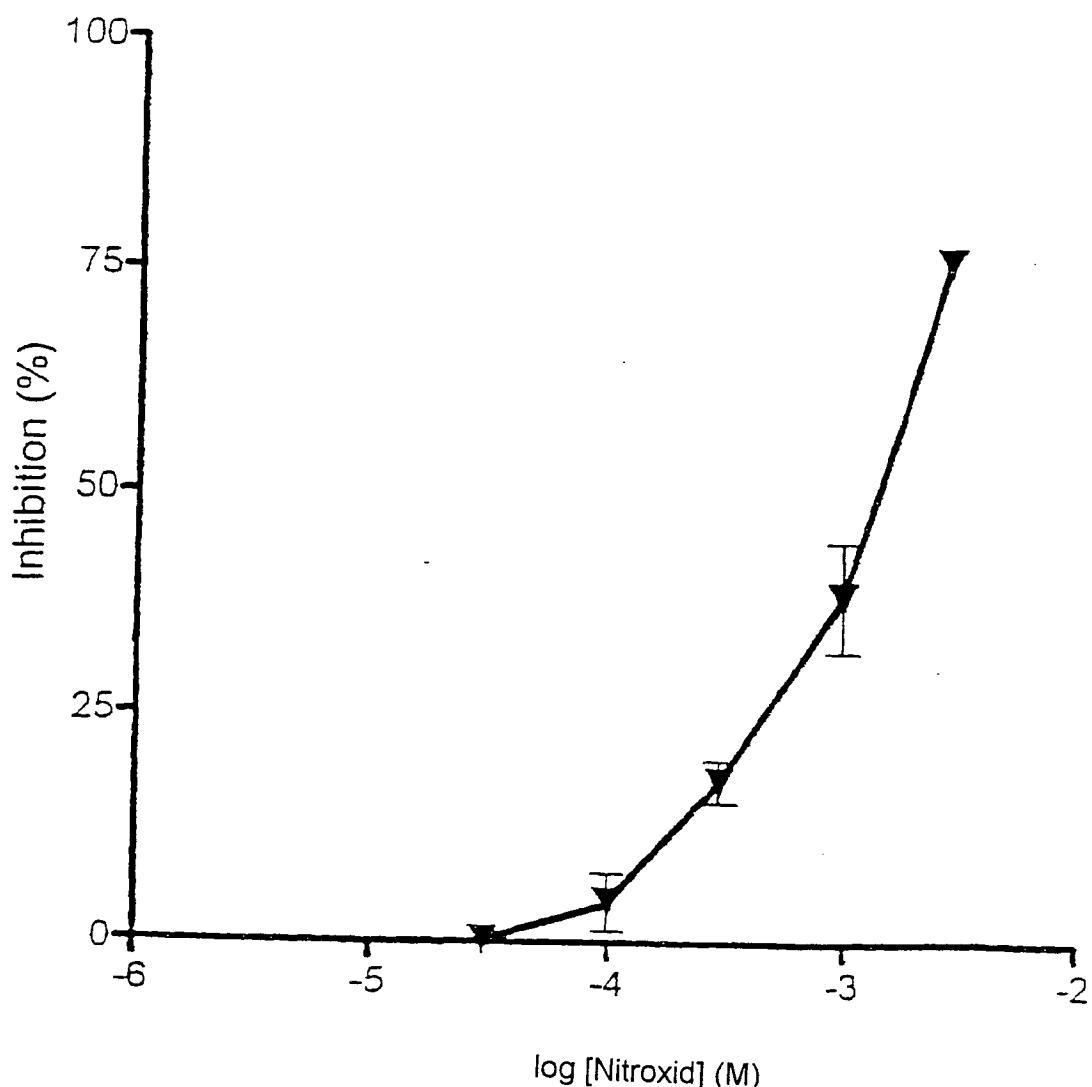
10. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 in Kombination mit einem pharmazeutisch akzeptablen Exzipienten aufweist.

11. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung eines Zustandes, der mit oxidativem Stress oder endothelialer Fehlfunktion verbunden ist.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Zustand Diabetes mellitus oder eine Herz-Kreislauf-Erkrankung ist.

13. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Zustand ausgewählt ist aus Diabetes mellitus, Herz-Kreislauf-Erkrankung, neurodegenerativen oder neurologischen Störungen und Reproduktionsstörungen.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

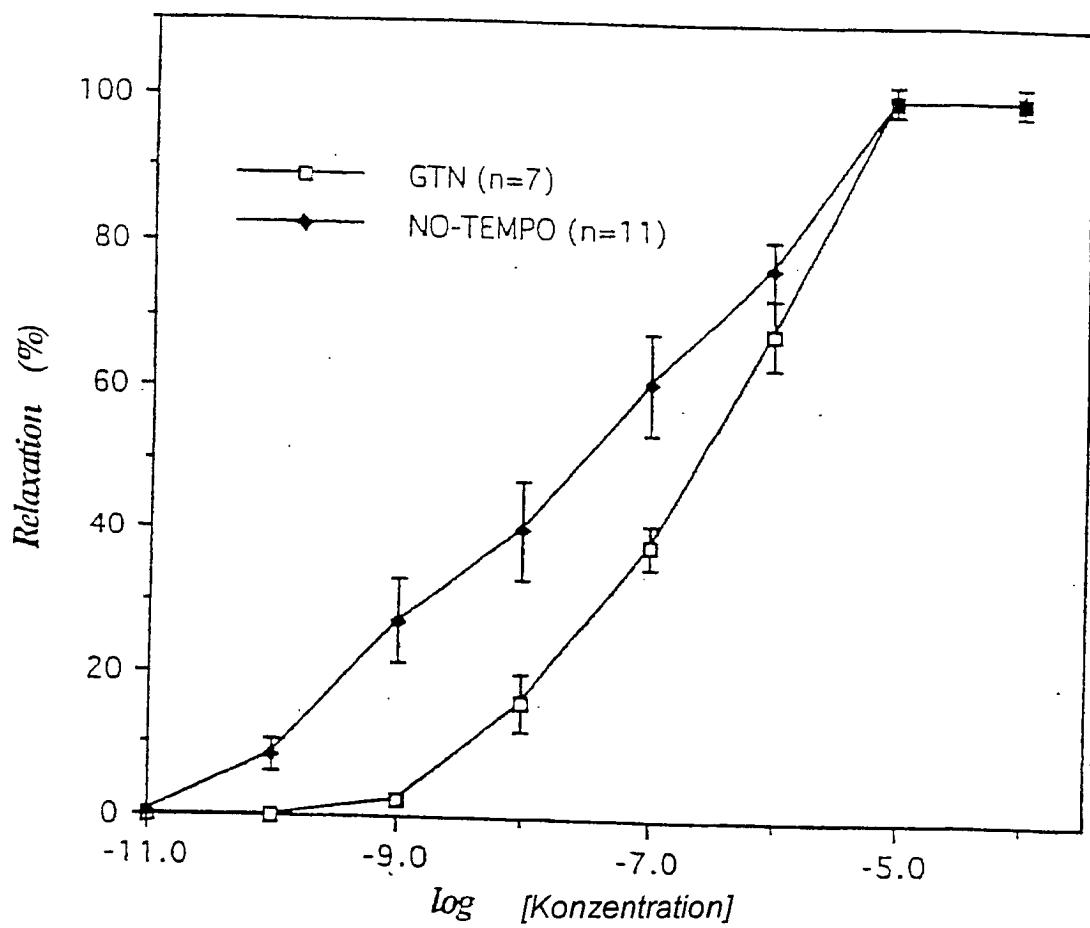


FIG. 2

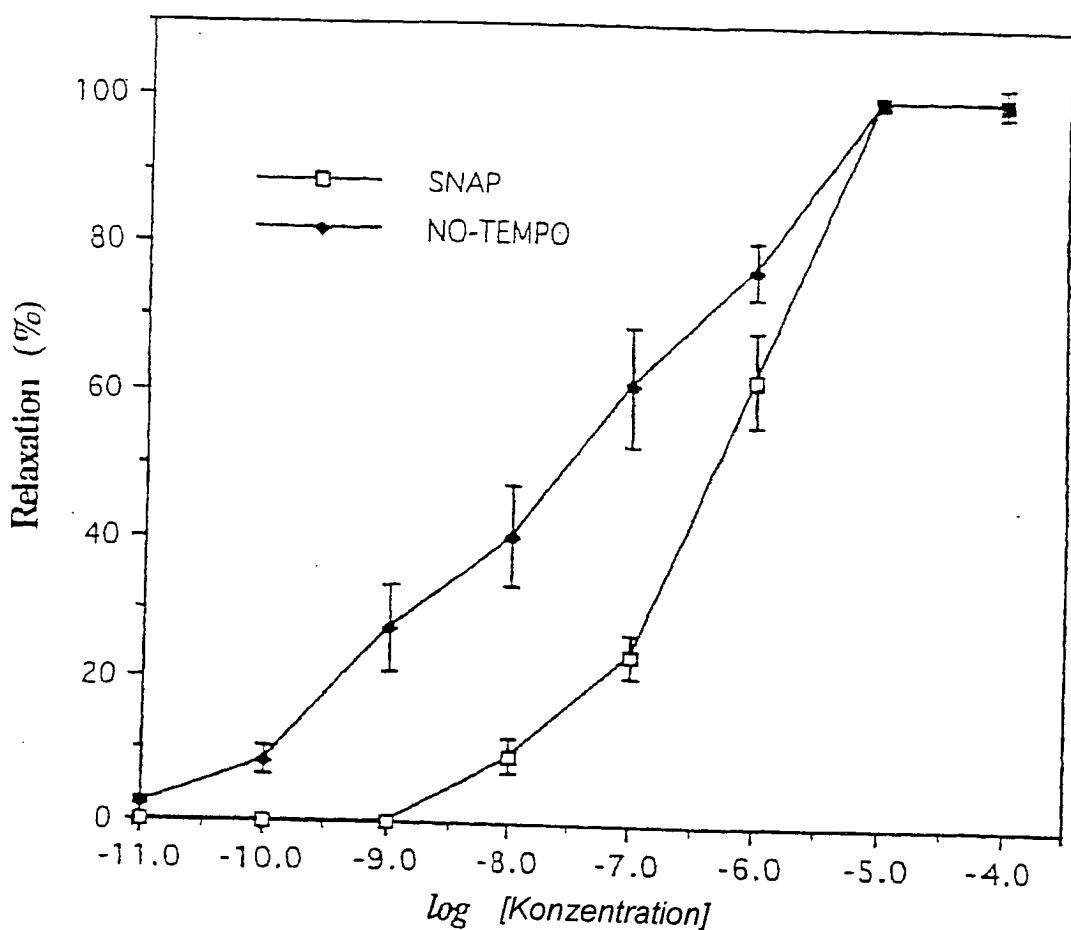


FIG. 3

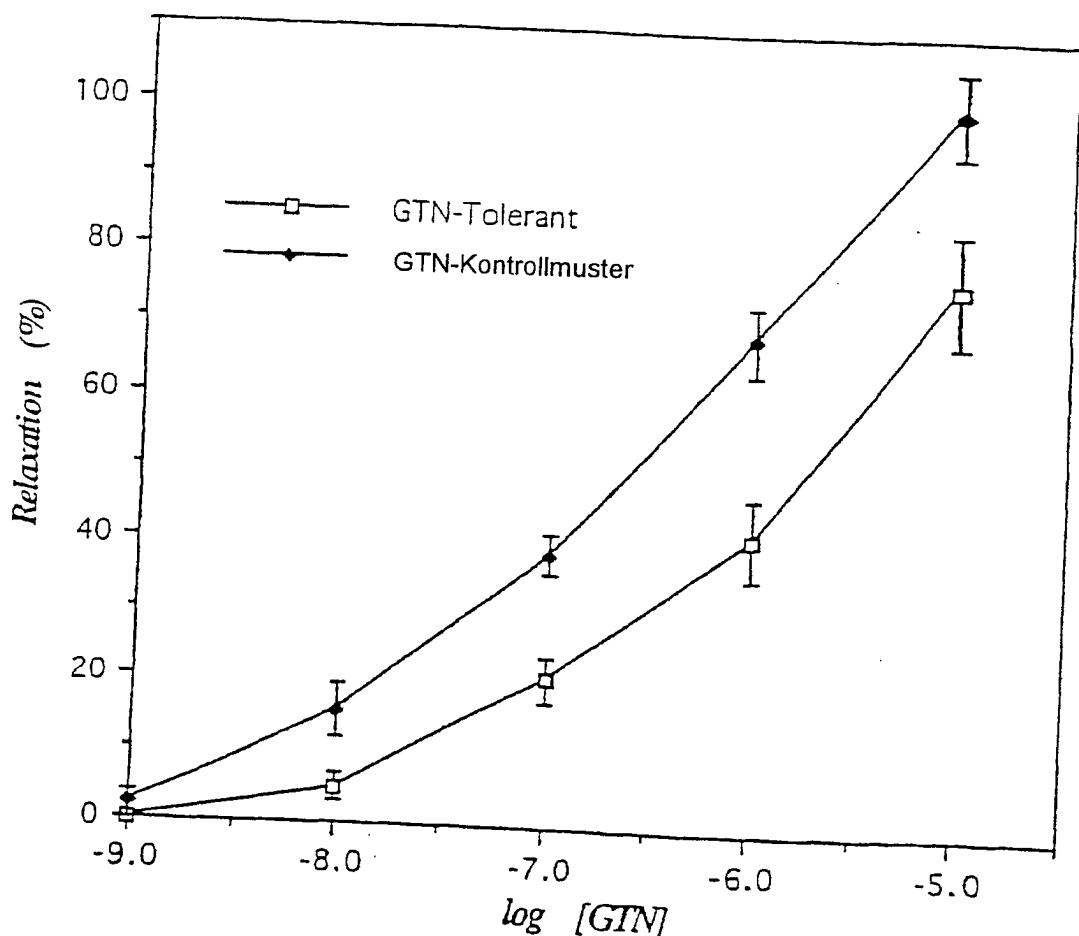


FIG. 4

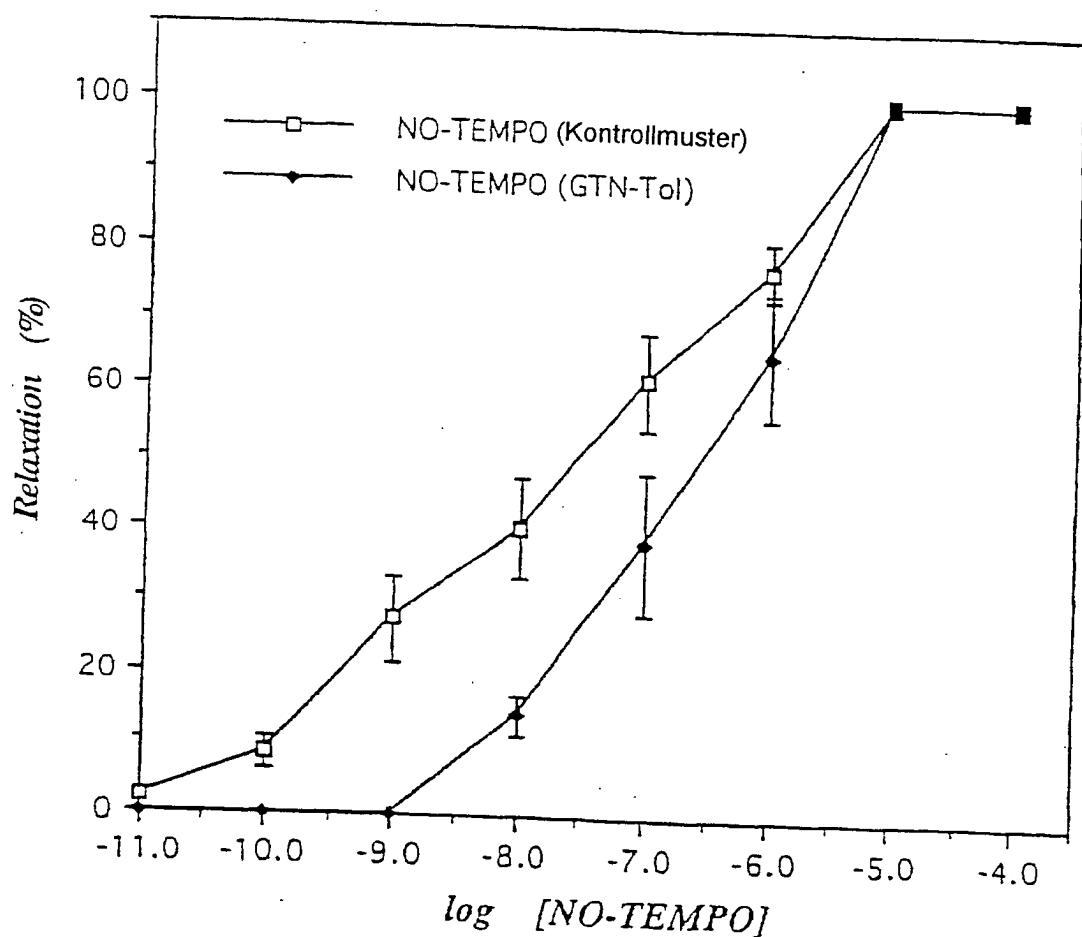


FIG. 5

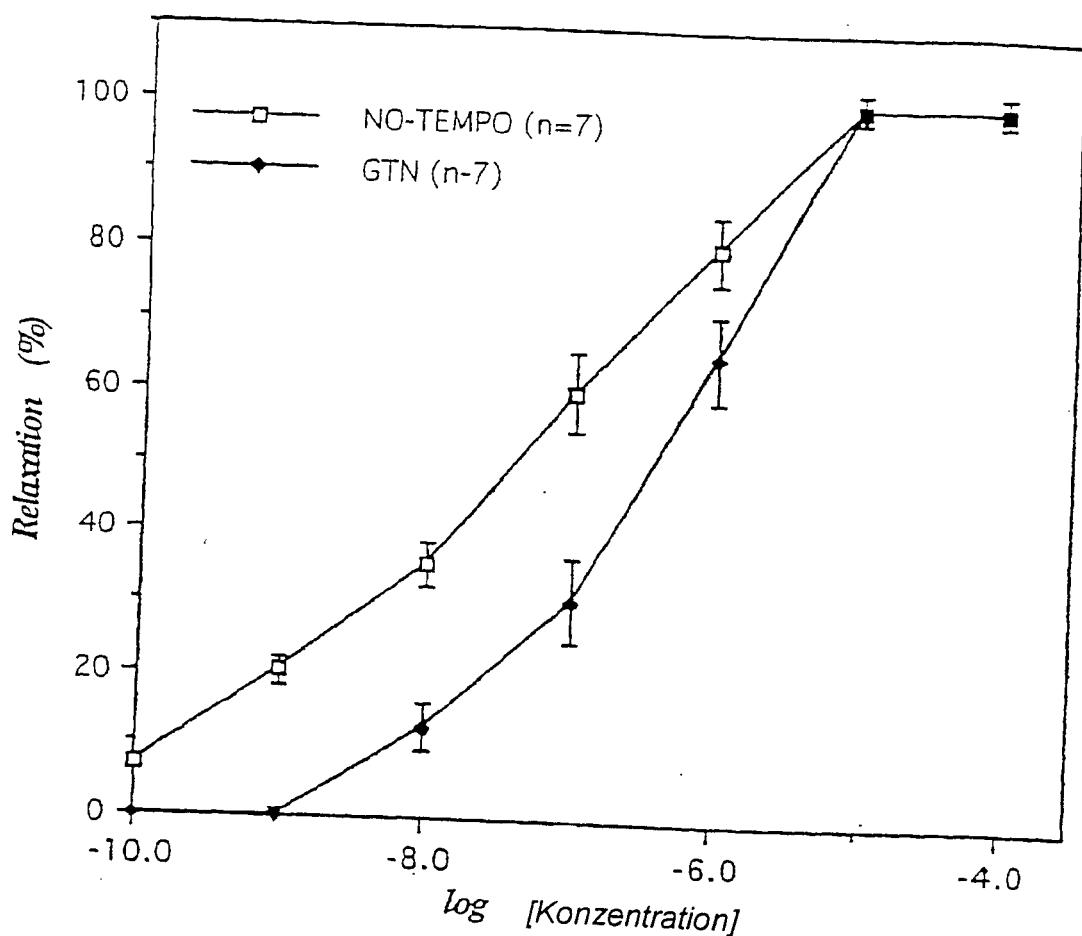


FIG. 6

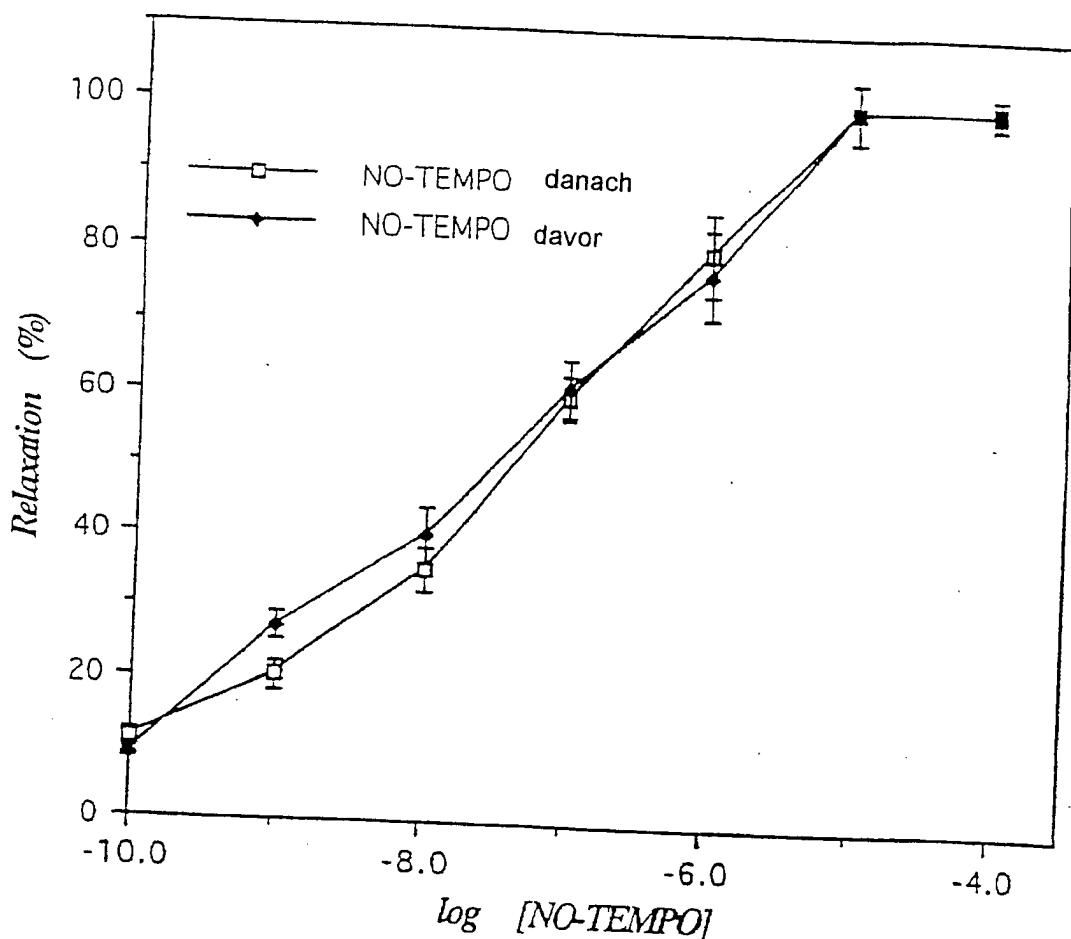


FIG. 7

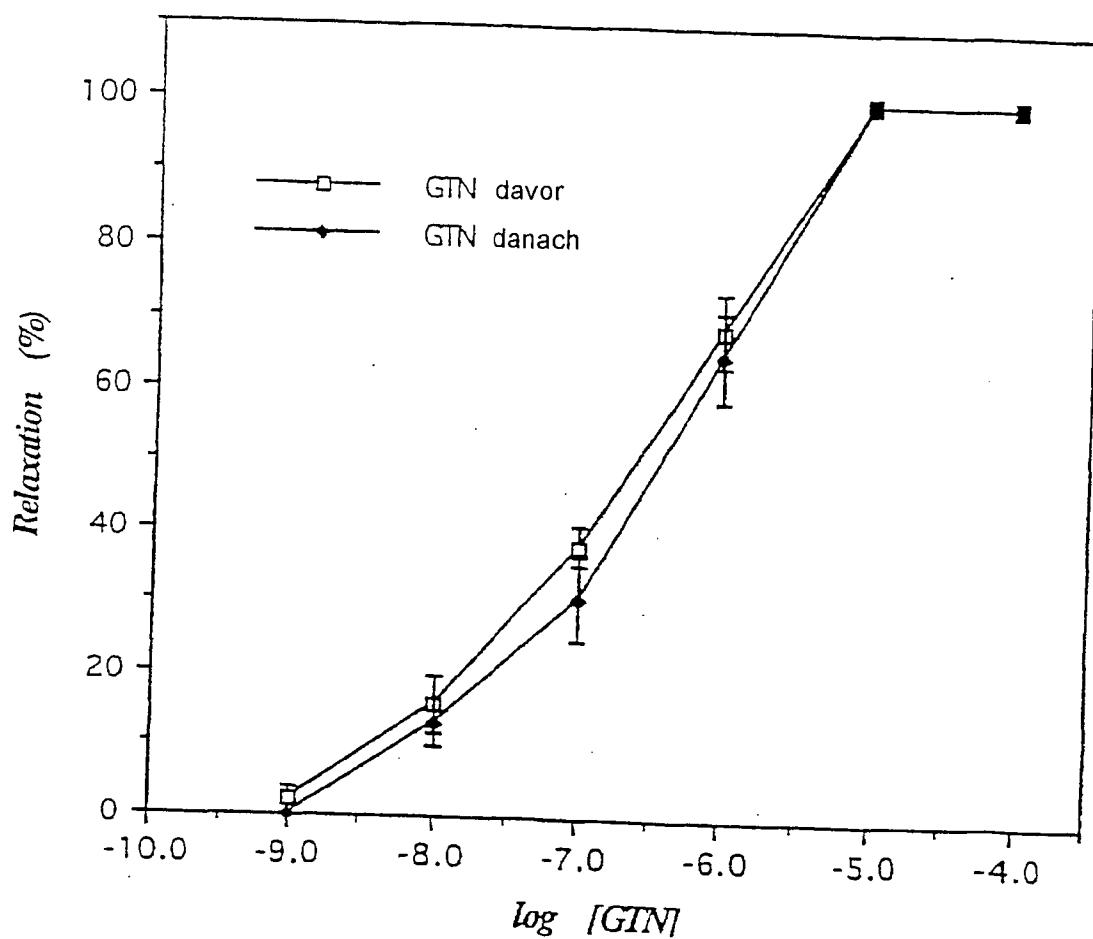


FIG. 8