

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 9/00
A61K 31/74 A61F 2/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817534.4

[43] 公开日 2004 年 12 月 8 日

[11] 公开号 CN 1553797A

[22] 申请日 2002.9.6 [21] 申请号 02817534.4
[30] 优先权
[32] 2001. 9. 6 [33] US [31] 09/948,505
[86] 国际申请 PCT/US2002/028693 2002.9.6
[87] 国际公布 WO2003/022218 英 2003.3.20
[85] 进入国家阶段日期 2004.3.8
[71] 申请人 辛西姆技术有限公司
地址 美国加利福尼亚州
[72] 发明人 夏任长 马 力

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司
代理人 程金山

权利要求书 4 页 说明书 28 页 附图 27 页

[54] 发明名称 羧酸门控的硝基氧 (CGN) 化合物和
组合物以及使用其的方法

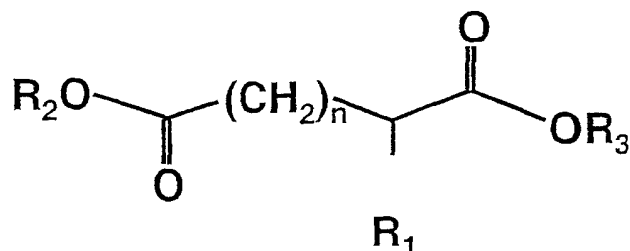
[57] 摘要

发现和作为组合物公开羧酸门控的硝基氧 (CGN) 化合物和它们的酯化衍生物, 并且显示治疗多种由活性氧物质 (ROS) 损伤导致的急性和慢性病和障碍的潜力。描述在适当的药物, 化妆品, 和诊断配方中用于治疗源于 ROS 损伤的组织损伤的包含 CGN 或其活性衍生物组合物。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 结构式 I 的化合物:

5



10 其中 R_1 是硝基氧;

其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自 Na, K, 氢, 烷基, 链烯基, 酰基, 芳烷基, 烷芳基和硝基氧; 并且

其中 “n” 为 0-18 的整数。

15 2. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自包含 1-4 个碳原子的烷基。

3. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自乙基, 叔丁基和氢, 并且 “n” 是 1-3 的整数。

4. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_2 是氢, R_3 是乙基, 并且 “n” 为 1。

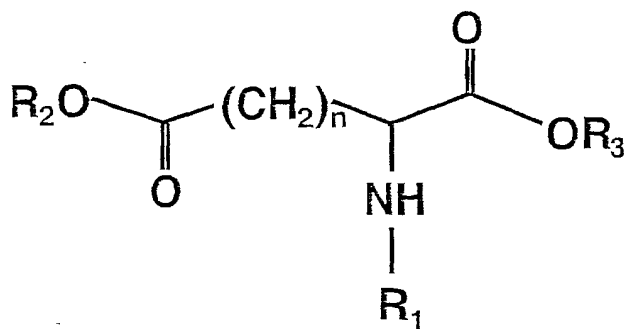
5. 权利要求 4 的化合物, 其中 R_1 是 2,2,6,6,四甲基-4-哌啶-1-氧基。

20 6. 权利要求 1 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 都是乙基, “n” 为 1, 并且 R_1 是 2,2,6,6,四甲基-4-哌啶-1-氧基。

7. 权利要求 1 的化合物, 其中所述硝基氧选自在氮原子周围具有至少一个不成对电子的直链, 支链, 环状硝基氧。

8. 结构式 II 的化合物:

25



30

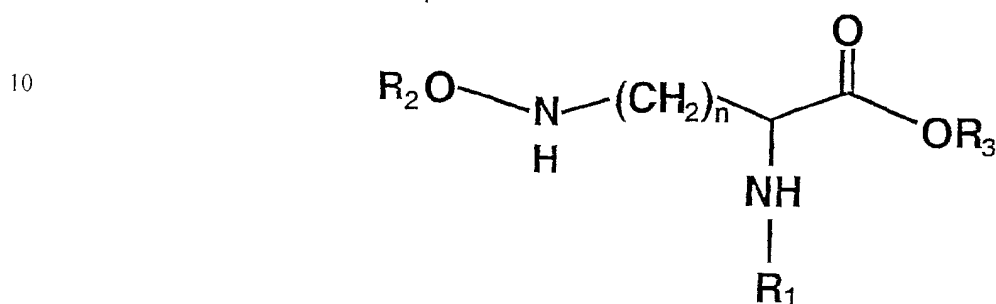
其中 R_1 是硝基氧；

其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自 Na, K, 氢, 烷基, 链烯基, 酰基, 芳烷基, 烷芳基和硝基氧；并且其中 “n” 为 1-6 的整数。

9. 权利要求 8 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自包含 1-4 个碳原子的烷基。

10. 权利要求 8 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自 Na, K, 乙基, 叔丁基和氢, 并且 “n” 为 1-4 的整数。

11. 结构式 III 的化合物:



15 其中 R_1 是硝基氧；

其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自 Na, K, 氢, 烷基, 链烯基, 酰基, 芳烷基, 烷芳基和硝基氧；并且

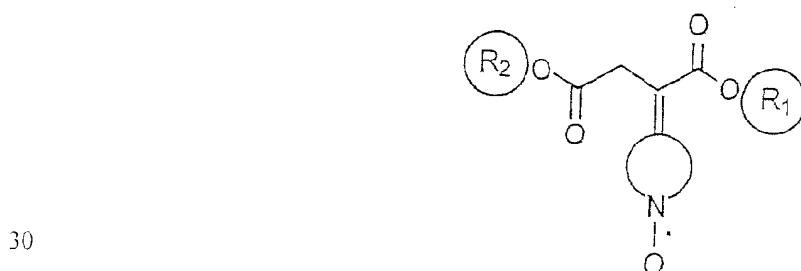
其中 “n” 为 1-6 的整数。

12. 权利要求 12 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自包含 1-4 个碳原子的烷基。

13. 权利要求 12 的化合物, 其中 R_2 和 R_3 各自独立地选自乙基, 叔丁基和氢, 并且 “n” 为 1-4 的整数。

14. 权利要求 11 的化合物, 其中 R_3 是乙基, “n” 为 1, 并且与 $-\text{OR}_2$ 基团连接的 $-\text{NH}-$ 与铜三肽结合。

25 15. 结构 IV 的硝基氧化合物:



其中 R_1 和 R_2 各自独立地为烷基，并且环是包含碳原子的环状部分。

16. 权利要求 15 的化合物，其中 R_1 和 R_2 各自为不同的 1-12 个碳原子的烷基，并且所述环为选自五元环和六元环的环状部分。

5 17. 权利要求 15 的化合物，其中 R_1 和 R_2 各自为相同的 1-4 个碳原子的烷基，并且所述环为六元环。

18. 权利要求 15 的化合物，其中 R_1 和 R_2 各自为乙基。

19. 权利要求 15 的化合物，其中 R_1 和 R_2 各自为叔丁基。

20. 一种组合物，其包含：

10 药用载体；和

权利要求 1 的化合物。

21. 权利要求 20 的组合物，其中所述药用载体选自凝胶，乳膏，软膏，乳剂，霜剂，固体惰性粉末和盐溶液。

22. 权利要求 20 的组合物，其另外包含：

15 多硝酰基清蛋白。

23. 权利要求 20 的组合物，其另外包含：

多硝酰基淀粉。

24. 权利要求 20 的组合物，其另外包含：

非甾体抗炎药。

20 25. 权利要求 20 的组合物，其另外包含：

抗生素。

26. 权利要求 20 的组合物，其另外包含：

铜三肽。

27. 一种治疗方法，其包含：

25 对哺乳动物细胞给药治疗有效量的用羧酸门控的硝基氧化合物；并且使硝基氧化合物调节氧化反应。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物是双酯化的硝基氧化合物，并且另外其中两个酯基团在给药后被去除，由此产生两个羧酸基团。

30 29. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为施用于人

的皮肤而配制的组合物中。

30. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为注射到人
中而配制的组合物中。

31. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为口服给药
5 而配制的组合物中。

32. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为眼部给药
而配制的组合物中。

33. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为气溶胶给
药而配制的组合物中。

10 34. 权利要求 27 的方法，其中所述硝基氧化合物存在于为直肠给药
而配制的组合物中。

羧酸门控的硝基氧（CGN）化合物和组合物以及使用其的方法

5

交叉引用

本申请是我们较早提出的美国专利申请序列号 09/948,505 的部分继续，所述较早的申请在此引入作为参考并且依据 35 U. S. C. §120 要求该申请的优先权。

10

发明领域

本发明涉及治疗和防止源于氧化应激的慢性和急性病以及障碍。新型化合物，组合物和它们的使用方法还涉及治疗和诊断药物领域。

15 发明背景

许多急性和慢性病以及障碍可归因于来自内源和外源产生的活性氧物质(reactive oxygen species) (“ROS”) 的损伤。当抗氧化酶和维生素的正常解毒能力被压制时，产生 ROS 损伤。包含治疗 ROS 损伤的重组抗氧化酶和维生素的添加物已经显示一些优点和局限性。氧化氮 ($\text{NO}\cdot$) 和过氧化物 ($\text{O}_2\cdot^-$) 两个都是生理的气体自由基，其单独或结合能够引发 ROS 级联和损伤。正在进行的药物开发计划以补充或去除 $\text{NO}\cdot$ 为目标。使用过氧化物歧化酶 (SOD) 作为模型，备选的药物开发策略是以去除 $\text{O}_2\cdot^-$ 和减弱后继的 ROS 级联为目标。后者的计划涉及分别在“金属-中心”或“不含金属”的合成分子如螯合过渡金属离子或硝基氧中模仿 SOD 的催化活性。在专利如美国专利 5,725,839; 5,741,893; 5,767,089; 5,804,561; 20 5,807,831; 5,817,632; 5,824,781; 5,840,701; 5,591,710; 5,789,376; 5,811,005; 6,048,967 中描述多硝酰基化的“金属中心”（即多硝酰基血红蛋白）和“不含金属”（即多硝酰基清蛋白）的血蛋白质作为血管 ROS 损伤的保护剂和显象剂的用途。然而，一般公认没有一种方法可以治疗所有的 ROS 损伤。实际上，已经要求连续的研究计划来致力于先前未预见的挑战。本

30

发明显示存在新型合成的活性中心“羧酸门控的硝基氧 (carboxylic-gated-nitroxide) (CGN)”的类似物。

本发明还显示 CGN 的合成和它酯化和非酯化形式的“金属-中心”和“不含金属”的新型化合物，以及它们在定向传递到所考虑的治疗位点中的效用。另外，通过与现有药物或导向分子 (targeting molecule) 共价连接和结合使用，增加它们的治疗应用。

发明概述

公开了羧酸门控的硝基氧 (CGN) 化合物，它们的酯化衍生物组合物以及治疗和防止源于 ROS 损伤的疾病和障碍的使用方法。本发明的组合物包含 CGN，并用于治疗暴露于不良高水平活性氧物质 (ROS) 的组织。除 CGN 以外，可以在适当的药物，化妆品，和用于静脉内，腹膜内，肌内，口服，局部，鼻，肺，或直肠给药的诊断配方中使用其活性衍生物。CGN 和它的衍生物的实例包括酯化的 CGN，酯化的二羧氨基酸 CGN，和酯化的羧基二氨基酸 CGN 以及它们的衍生物，其包括二硝基氧化物，三硝基氧化物衍生物，或共轭物，其单独或与现有药物或导向分子结合使用。描述硝基氧化物的药物配方和给药途径。具体地，本发明组合物的局部施用显示 CGN 在细胞内的定向传递是如何通过细胞酯酶将作为前药的疏水酯化的 CGN 裂解成其游离酸形式的亲水 CGN 来实现。

本发明的硝基氧化合物包含 3 个分子特征，其提供本发明的特征。首先，本发明的化合物包含含有直接键合在一起的氮和氧原子的分子的第一部分，并且包含不成对电子 ($\cdot\text{NO}$)。第二，本发明的化合物包含至少包含两个氧原子的分子的第二部分，其第二部分提供负电荷，例如一个，两个，三个或更多羧酸基团。可以构造第二部分以便在给定的反应，例如去除酯基团的烷基部分以后产生羧酸基团。第三，本发明的化合物包含位于第一和第二部分之间的连接基团，该连接基团允许第二部分的负电荷效应向第一部分“弯曲”，由此帮助维持 ($\cdot\text{NO}$) 部分在人体内各种环境中的稳定性。

在局部施用中描述 CGN 的组合物和给药途径以显示 CGN 在细胞内的定向传递是如何通过细胞酯酶将作为前药的疏水酯化的 CGN 裂解成其

亲水的游离酸形式的 CGN 来实现的。使用两种硝基氧化物的氮稳定的同位素和如通过顺磁共振光谱学检测它们共同给药 (co-administration) (气溶胶, 直肠, 和口服) 的分布, 代谢和消除研究, 明确地证明相对于 4-羟基-2,2,6,6-四甲基-哌啶-1-氧基(一种现有技术的化合物)的生物半衰期和胞内传递的改善。本发明显示酯酶水解的酯化 CGN 提供它们的羧酸部分作为“门”, 其保护分子的体内稳定性而不影响催化活性。提供的局部, 静脉内, 口服, 和肺给药的实例包括选择的 CGN 衍生物。提供在照射前和照射后施用 CGN 防止由 UVB 诱导的急性和慢性皮肤损伤功效的实例。

10

附图简述

图 1 显示酯化的羧酸门控的硝基氧 (CGN)和它们的衍生物的结构通式。

图 2 显示酯化的二羧氨基酸 CGN 的结构通式。

15

图 3 显示酯化的羧酸二氨基酸和它们的衍生物的结构通式。

图 4 显示在实施例部分示例的选择的化合物的通用结构。

图 5 显示通用化合物 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-哌啶-4-琥珀酸酯。

图 6 显示 R_2 被一个羟基 (-H) 取代的图 5 的半通用结构。

20

图 7 显示 R_2 和 R_3 被氢取代的图 5 的结构, 其被称为化合物 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-哌啶-4-琥珀酸酯 (TOPS)。

图 8 显示 R_2 和 R_3 分别 H 和乙基取代的图 5 的结构, 称为化合物 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-哌啶-4-琥珀酸二乙酯 (E-TOPS)。

图 9 显示其中 R_2 和 R_3 基团都是乙基的图 5 的结构, 即 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-4-哌啶-琥珀酸二乙酯 (DE-TOPS)。

25

图 10 显示其中 R_2 和 R_3 基团都是叔丁醇的图 5 的结构, 即 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-4-哌啶-琥珀酸二叔丁酯 (DB-TOPS)。

图 11 显示其中 R_2 是 Tempol 的图 5 的半通用结构, 即 TE-TOPS。

图 12 显示其中 R_2 和 R_3 都是 Tempol 的图 5 的结构, 即 TT-TOPS。

图 13 显示其中通用环为五元环的图 4 的结构。

30

图 14 显示液相色谱, 其鉴定 TOPS 和它的羧酸衍生物酯, E-TOPS

和 DE-TOPS。

图 15 显示在水相环境中通过氢氧化钠 (NaOH) 将 DE-TOPS 水解成 TOPS。水解前和水解后的 EPR 信号明显显示, 发生从 DE-TOPS 至 TOPS 的几乎完全转化。

5 图 16 显示液相色谱仪 HPLC 和 EPR 谱, 其描述从 ^{14}N E-TOPS 和 ^{15}N Tempol 合成 TE-TOPS 期间的结构变化。

图 17 (A 和 B) 显示 ^{14}N - ^{15}N TE-TOPS 体外和体内水解成两个单价基团。

10 图 18 显示当将两个腹膜内共同给药于小鼠中时, 与 ^{15}N Tempol 相比 ^{14}N E-TOPS 延长的体内血浆半衰期。

图 19 显示当将两个静脉内共同给药于小鼠中时, 与 ^{15}N Tempol 相比 ^{14}N E-TOPS 延长的体内血浆半衰期。

图 20 显示当将两个肌肉内共同给药于小鼠中时, 与 ^{15}N Tempol 相比 ^{14}N E-TOPS 延长的体内血浆半衰期。

15 图 21 显示当将两个口服共同给药于小鼠中时, 与 ^{15}N Tempol 相比 ^{14}N E-TOPS 延长的体内血浆半衰期。

图 22A-C 显示当将 ^{14}N -DE-TOPS 和 ^{15}N -Tempol 共同施用于无毛小鼠的皮肤上时, DE-TOPS 在 Franz Diffusion 细胞中的皮肤渗透和区室化: 22A-施用前; 22B-在受体细胞中; 和 22C 在 20 小时的皮肤中。

20 图 23 显示通过 EPRI 的 DE-TOPS 人皮肤渗透和区室化。

图 24 显示在小鼠的 LD_{50} 研究中对于与 Tempol 相比的 E-TOPS, 生存率与剂量之间的关系。

图 25 显示在每日局部施用 10 天后 DE-TOPS 通过排泄在尿中的代谢和血浆中的减少。

25 图 26 显示通过 EPR 测定的 E-TOPS 的过氧化物歧化酶活性。

图 27 显示 DE-TOPS, E-TOPS, 和 TOPS 的剂量依赖性抑制血红蛋白诱导的皮层神经元的毒性。

图 28 显示 TOPS, E-TOPS, 和 DE-TOPS 的剂量依赖性抑制过亚硝酸盐诱导的皮层神经元的毒性。

30 图 29 显示 TOPS, E-TOPS, 和 DE-TOPS 以剂量依赖性的方式抑制

通过过亚硝酸盐的羟基苯乙酸（HPA）的硝化。

图 30 显示 E-TOPS 减少由肿瘤坏死因子 α （TNF- α ）在不同温育时间对 Y-79 细胞系诱导的编程性细胞死亡。

图 31 显示 DE-TOPS 的预先局部施用防止 LTVB 急性诱导的无毛小鼠上的皮肤损伤。

图 32 显示在对照或在照射前施用 DE-TOPS 的情况下，在 11 天 UVB 照射后无毛小鼠皮肤的组织病理学变化。

图 33 显示 DE-TOPS 的预先局部施用防止在 4 个月时 UVB 在无毛小鼠上慢性诱导皮肤损伤。

图 34 显示 DE-TOPS 的后局部施用防止 UVB 在无毛小鼠上急性诱导皮肤损伤。

图 35 显示在对照或在照射后施用 DE-TOPS 的情况下，在 11 天的 UVB 照射后无毛小鼠皮肤的组织病理学变化的分数。

图 36（A，B 和 C）当每次照射施加 10 分钟或 2 小时时比较 DE-TOPS 和 Tempol 对于 UVB 诱导的急性损伤的作用。

图 37（3 组）显示在用 DE-TOPS 处理和紫外照射 15 天后 DE-TOPS，空白对照剂，和 Retin A 的比较。

发明详述

在描述本发明的化合物，配方和用途之前，应当理解本发明不限于所述的具体结构，配方和用途，当然可以变化。还应当理解本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的，并不是为了限制，因为本发明的范围将仅由后附的权利要求限定。

在提供一个范围的值时，应当理解在范围的上限和下限之间，除非上下文另外明确规定，到下限单位的十分之一的每个居中值也被特别公开。每一个在所述范围中任何所述值或居中值与在该所述范围中其它任何所述或居中值之间的较小范围被包含在本发明内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括或排除在范围外，其中两者之一，两者都不或两者都被包括在较小范围中的每个范围也被包含在本发明内，使任何具体不包括的界限在所述范围中。在所述范围包括一个或两个界限处，不包

括包含界限的那些之一或两个的范围也被包括在本发明中。

除非另有规定，本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所述领域的普通技术人员通常理解相同的意义。尽管可以将与本文所述的那些类似或等效的任何方法和材料用于本发明的实施或检验中，现在描述优
5 选的方法和材料。本文提及的所有出版物在此作为参考引入以公开和描述与所引用出版物有关的方法和/或材料。

必须指出如这里和在后附权利要求中使用，单数形式“a”，“and”，和“the”包括复数对象(plural referent)，除非上下文另外明确规定。因此，例如提及“硝基氧(a nitroxide)”包括多种这样的化合物或官能团单元，提及“配方(the formulation)”包括提及一种或多种配方和本领域技
10 术人员已知的其等效物，等等。

提供这里讨论的出版物仅仅因为它们的公开内容在本发明的申请日之前。这里决不可被认为是承认本发明无权依靠先前的发明先于该出版物。另外，提供的公开日期可以不同于实际的公开日期，其需要独立地确认。

15 另外，可以构造本发明的化合物以便它与它被提供的生物有机体以化合物结构变化的方式反应，由此增强化合物定点传递至所需位置。

当施用于生物环境中时特别设计本发明的化合物以增加诊断和治疗效用，在所述生物环境中胞内保留是重要的，并且疏水屏障如皮肤，角质层，或其它这样的膜是选择性可渗透的。当传递至包含酯酶的细胞时这
20 些化合物特别有效。这些组合物可以用于减轻活体中由曝露于化学试剂和毒素，以及太阳，UV，或其它形式的电离照射引起的自由基的毒性效应。专用的方法和配方还使本发明的化合物能够诊断和治疗各种各样的生理疾病，并且使用测量硝基氧和它们反应性的成象技术分析体内反应。本发明还涉及新型硝基氧组合物，其允许将治疗量的硝基氧靶向
25 (targeting)或区室化在局部区域，特别是渗透和保留在皮肤中的皮内界面内。

本发明的化合物可以通过如图 1-13 的结构式来定义。例如可以以任何所需的方式配制这些化合物以产生任何所需的药物有效配方。可以将化合物混合，溶解和/或悬浮在药用载体中。可以基于预定用途选择该载
30 体。例如，乳膏，凝胶剂和洗剂可以用于对皮肤的局部施用。盐溶液可

以用作注射剂。

可以以任何所需方式施用本发明的化合物和组合物。通常，将化合物配制成适合于具体类型的给药的组合物，例如施用于人皮肤的洗剂，在嘴和上喉中漱口的水/乙醇配方，用于注射的盐水溶液。

5

发明主要内容

关于包括化合物，由在适当载体中的化合物组成的配方，和治疗方法的本发明，存在许多方面。构造化合物以提供 CGN 对于生物有机体（例如人）的抗氧化作用，并且在足够长的时期内提供作用以便获得所需治疗结果。以这样的方式即 NO 基团被相同分子内的羧化物“门控”来构造本发明的 CGN，以便它的氧化还原调节功能在体内被长期保持。CGN 的 NO 基团位置相对于 2 个羧化物基团可以是对称或不对称。

本发明的化合物（参见图 1-13）可以结合成各种各样的用于多种不同治疗的配方。治疗通常是调节生物化学反应或更具体地减少如这里进一步所述的氧化反应。获得的调节作用通常大于维生素如维生素 C 的抗氧化作用，而通常小于内源催化剂的作用。如以下通常所述人体对感染的过度反应通常产生调节氧化反应的需要。

血液由血浆，红细胞和白细胞组成。红细胞供氧运输用而白细胞提供针对感染的防御。白细胞包括包括 2 种类型-淋巴细胞和单核细胞的白细胞。白细胞还包括粒细胞，其分成 3 种类型-嗜碱性粒细胞，嗜酸性粒细胞（嗜酸性粒细胞）和嗜中性粒细胞。

嗜中性粒细胞是白细胞中的最丰富的并且是关于本发明特别感兴趣的。嗜中性粒细胞挤过毛细管来发现感染的组织或什么可能被错当成已经遭受创伤的感染组织。嗜中性粒细胞是从骨髓中释放，循环，并通过趋化性指向感染和炎症，所述趋化性使细胞向更高浓度的给定化学药品移动。一旦嗜中性粒细胞发现外源颗粒或细菌，嗜中性粒细胞吞没它，释放酶，来源于它的颗粒的过氧化氢和其它化学药品将它氧化，例如杀死细菌。感染处的脓是死的嗜中性粒细胞和其它细胞碎片。尽管该过程在抗感染中是健康的，身体通常过分反应和导致由于过度氧化的另外的炎症，参见美国专利 5,211,937，特别是其图 5。

本发明的化合物可以降低氧化的速率和/或总量，从而减少炎症。本发明的 CGN 化合物可以提供对于常规硝基氧如 4-羟基-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基 (Tempol) 的优点，如下列各项：

- 1) 靶向传递：在局部施用后 CGN 酯渗透角质层并优选被活的皮肤细胞吸收。在进入细胞后，前药的酯键被胞内脂酶裂解，将 CGN 转化成它的游离酸形式，使它膜可渗透性更差。该体内酶促转化有效地将 CGN 区室化在包含脂酶的皮肤细胞内。
- 2) 体内门控功能：在它水解的游离酸状态，作为“门”的羧化物将保护或保卫硝基氧的胞内催化活性。
- 3) 体内安全性：不同于 Tempol ($LD_{50}=375$ mg/kg)，在 2 g/kg 下检测不到 CGN 的急性毒性 (LD_{50})。

简而言之，本发明公开 CGN，其分子内羧化物部分“保卫”它的硝基氧部分的体内还原而不影响它的催化活性。

本发明公开化合物，配方和使用羧化物门控的硝基氧 (CGN) 的方法，所述羧化物门控的硝基氧 (CGN) 用于防止和治疗起因于活性氧物质 (ROS) 的疾病或损伤。本发明的化合物，配方和方法可以单独或与在美国专利 5,725,839; 5,741,893; 5,767,089; 5,804,561; 5,807,831; 5,817,632; 5,824,781; 5,840,701; 5,591,710; 5,789,376; 5,811,005; 6,048,967 中任何一个公开的化合物组合使用。

本发明包含普通种类的 CGN，其包括单功能 CGN 和双功能 CGN。单功能 CGN 指它单独的抗-ROS 损伤活性。双功能 CGN 指增加第二种活性，其来源于偶联的现有药物部分 CGN，不仅提供“羧化物门控”作用而且其确定形式还定向传递它的胞内抗 ROS 活性。CGN 的体内靶向传递和稳定性提高它的治疗指数和诊断效用。

公开单独的或在配方中的稳定的单和双功能 CGN 化合物，其包括它们的酯化衍生物及其前体，和这些的用途。至于单功能 CGN，可以通过酯化羧酸基团来调节氧化/还原活性和区室化。本发明的化合物包含一种或多种产生“门”功能的羧化物，其“前药”（例如酯）形式提供增加的 CGN 穿过细胞膜的通透性，而且导致增强的体内半衰期。可以用现有的药物通过酯或酰胺基团修饰 CGN 以形成双功能 CGN。

用于治疗源于 ROS 损伤的组织损伤的组合物包含 CGN，它的酯或其活性药物衍生物，其是在适当的药物，化妆品，和诊断配方中，用于静脉内，腹膜内，肌内，口服，局部，鼻，肺，阴道，经皮或直肠给药。

5 化合物合成：

在图 1，2 和 3 中显示 CGN 的 3 种结构通式。结构 I 是在图 1 中描述的 CGN。它是由任何酮或醛硝基氧与酯化的二羧酸反应合成。结构 II 是在图 2 中描述的单氨基 CGN。它是由羧基或乙酰氨基硝基氧与二酯化的二羧基 α -氨基酸反应合成。结构 III 是二氨基酸 CGN（参见图 3）。它是由羧基或乙酰氨基硝基氧与酯化和酰氨基二氨基酸反应合成，其中酯化基团是具有 OH 官能团的任何化合物，包括现有的药物。在结构 II 中 2 个氨基用来连接硝基氧和最佳地，其它具有羧基的部分。因此，CGN 的实例包括酯化的二羧化物 CGN，酯化的一氨基酸 CGN，和二氨基酸 CGN 以及其它衍生物，其包括二硝基氧，三硝基氧衍生物，或偶联物，单独或
10 15 或与现有的药物或导向分子组合使用。

描述 CGN 的组合物和给药途径。在多个实施例中本发明组合物的局部施用显示 CGN 在细胞内的定向传递是如何通过细胞酯酶将作为前药的疏水酯化的 CGN 裂解成游离酸形式的亲水 CGN 来实现的。已经测试 CGN 的第二个实例如 E-TOPS 与现有技术硝基氧，Tmopol 相比在共同给药中的血浆半衰期。当给药（腹膜内，静脉内，肌内，和口服）E-TOPS 和 Tempo
20 时观察到相对 Tempol 的 E-TOPS 延长的半衰期。已经在 UVB-诱导皮肤损伤的无毛小鼠模型中测试 CGN 的第 3 个实例如 DE-TOPS。

定义

25 这里使用术语“硝基氧(nitroxide)”来描述包含彼此直接相连的氧和氮原子的分子。硝基氧可以是电子给体或受体。硝基氧可以包含稳定的硝酰基自由基，其包含前体（如 N-H 形式）及其衍生物，所述衍生物包括它们对应的羟胺衍生物（N-OH），其中氧原子被羟基取代并且以卤化氢的形式存在。可以将本发明的硝基氧给药于系统如人，并且通过给予
30 或接受电子起调节氧化和还原反应的作用。通过被强供电子团取代的两

个相邻的碳原子在氮核处提供硝基氧化物不成对电子的稳定性。在 N-O 键的氧上具有部分负电荷，2 个相邻碳原子一起将不成对电子定位在氮核上。硝基氧通常可以具有杂环或线性结构。本发明的硝基氧可以含有一个，两个或多个羧基或可以容易地变成羧基的基团如酯基团，羧基帮助维持使硝基氧化物作为电子给体的自由电子。在体内环境中硝基氧可以与第一个过氧化物反应形成氧铵（oxoammonium）（作为电子给体），然后与第二个过氧化物反应重新形成硝基氧（作为电子受体）。如果将硝基氧还原成羟胺，它失去它调节反应的能力。通过将硝基氧定位在两个羧酸基团之间获得“门控”作用，即硝基氧受到保护，并且与缺乏羧酸基团的分子相比，在更多样的体内环境中它调节反应的能力在更长的时期内被保持。

这里使用的术语“医治”，“治疗”等通常指获得期望的药理和/或生理效果。治疗是获得有益或期望的临床结果的方法，所述临床结果包括但不限于减少活性氧物质（ROS）的不良作用。在完全或部分抑制疾病和/或其症状方面，效果可以是防止性的，并且/或者在部分或完全治愈疾病和/或起因于疾病的副作用方面可以是治疗性的。通常，本发明的方法包括治疗通常与炎症反应有关的疾病并且可以施用于多种不同区域，特别是膜表面，包括皮肤，包括在 GI 道，鼻，喉，嘴，阴道腔中的那些的粘膜，眼表面，以及肺表面和血管系统表面。这里使用的“治疗”包含在哺乳动物，特别是人中该症状或疾病的任何治疗，并且包括：（a）防止或诊断受试者中的疾病和/或症状，所述受试者易患疾病和/或症状但还未诊断为患有该疾病；（b）抑制疾病，即阻止它的发展；和/或（c）减轻疾病和/或它的症状，即导致疾病和/或由疾病导致的症状的消退。

本发明目标在于调节炎症反应，特别是调节过度氧化。多种身体损伤，包括将细胞经受形形色色的包括紫外线和核照射的照射以及钝伤可导致炎症反应和与其伴随的过度氧化。治疗可以与其它辅助治疗如使用抗炎药或抗生素药物结合以调节炎症和防止感染。

使用本发明的化合物和组合物可能进行的治疗类型包括对皮肤施用化合物和/或组合物以便在它发生以前治疗晒斑和/或在晒斑已经发生以后治疗与晒斑有关的炎症反应。另外，在施用用于治疗癌症的照射或 X 线透

射检查之前和/或之后可以治疗患者的皮肤。类似地，可以使患者漱口包含本发明的化合物的漱口药以便治疗照射对嘴和喉内表面的副作用。可以将本发明的化合物直接施用于骨髓以便提供保护，防止骨髓的过度氧化。可以将本发明的化合物注射给患者以便调节血管系统中的炎症反应和过度氧化。当被包括在施用于皮肤的化妆品配方中时本发明的化合物可以用于治疗。此外，当将皮肤进行整容外科和/或激光磨皮（laser resurfacing）时，可以在激光磨皮之前和/或激光磨皮之后施用本发明的化合物和配方以调节免疫反应。经阅读本公开内容后本领域技术人员将想起这些和其它类型的治疗。

10 术语“有效量”是足以产生有益的或期望结果的量，所述结果包括临床结果，同样地“有效量”取决于其被施用的环境。可以以单或多剂量给药有效量。有效量可以是足以获得治疗，例如调节不良高水平的活性氧物质的量。

“包含”和它的类似表述指“包括。”

15

分子特性

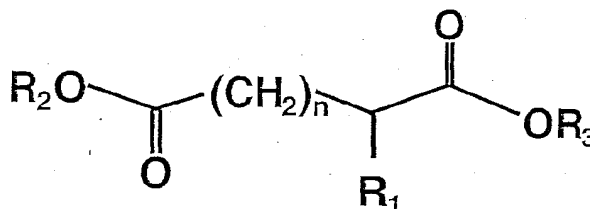
通过几种独立的化学结构或分子改性可以实现按照本发明的 CGN 的生理区室化或定点传递。按照这里公开的标准来设计分子以提供选择的渗透性和反应性特性。可以将改性的 CGN 化合物局部施用并以特定的细胞，例如活表皮细胞为目标。通过将 CGN 转化成如本文所述的改性形式改变硝基氧的膜溶解度。例如，增加酯基团，使分子具有更多脂溶性。通过由细胞脂酶催化的反应去除这些基团，使 CGN 具有更多水溶性并且更小脂溶性（例如在人脂质中溶解性低 1 个对数，2 个对数或 3 个对数或更多）。一旦改性的 CGN 已经进入细胞，内源脂酶的普通胞内水解机制产生 CGN 的衍生物，其具有降低的膜渗透性。因此，这些化合物容易进入细胞（当脂溶性时），但抵抗离开细胞（当具有更大水溶性和更小脂溶性时），结果，显示关于跨膜进入活细胞的增加的渗透性。减少的脂溶性和增加的水溶性还提供硝基氧例如通过常规的生理清除过程渗出活体细胞或组织的降低的趋势。该特征产生可选择的体内优选区室化和持续治疗或诊断的潜力。

如本文所述, 通过酯化可以增强 CGN 的积累和隔离或区室化。局部施用优选二酯, 其可以是不对称的, 并且使其中一个酯化基团比另一个更不稳定。例如, BE-TOPS 的叔丁酯比乙酯更容易水解, 因为它比乙酯更不稳定。包含这两种酯的不对称硝基氧的水解因而将首先产生较小膜渗透性的一羧酸 E-TOPS。具体二羧酸酯衍生物, 例如琥珀酸酯的选择决定区室化和胞内积累的特性, 因此可以被设计成较高或较低以适合具体的诊断或治疗指示。同样, 天然存在的二羧酸氨基酸 (例如天冬氨酸, 谷氨酸) 的二酯的制备将允许胞内增加的积累和隔离, 并且具有增加的优势, 因为天然存在的氨基酸在给药, 分布, 代谢和排泄 (ADME) 研究中众所周知。

可以用于本发明的 CGN 在结构上是多样的, 因为 CGN 的必要性能是它被酯化的能力。因此, 可以使用它一羧基, 二羧基, 或多羧基状态的 CGN。本发明所选实施方案具有下列结构, 尽管本发明考虑衍生物, 异构体, 取代, 聚合物, 和保持其中官能度的其它常规化学改性。

本发明的化合物包括由结构通式 I 包含的那些:

图 1:



其中 R_1 是任何硝基氧(nitroxide)或更具体地任何硝酰基自由基 (NO), 其包含含有一个位于氮原子周围的不成对电子的基团, 或更具体地另外包含碳和氢原子的线性 (直链或支链) 或环状硝酰基自由基。 R_1 的一个实例是 2,2,6,6-四甲基-4-哌啶-1-氧基:

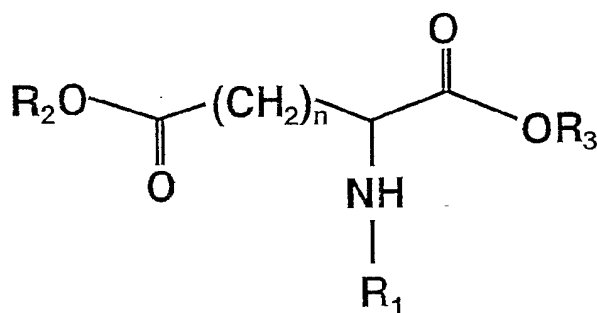
其中 R_2 和 R_3 各自独立地为氢, 烷基, 链烯基 (alkenyl), 芳基, 芳烷基, 烷芳基 (alkaryl) 或硝基氧, 特别是可以独立地为氢, 或乙基, 应当指出当 R_2 和/或 R_3 为 H 时形成羧酸基团, 并且该酸在适当的环境中例如人体中可以转化为盐。可以形成任何盐, 特别是可以形成 Na 和 K 盐;

其中 “n” 是 0-18 的整数 (例如 1-6 或 1-4), 特别是可以为 “1,” “2”

或“3。”

在上述结构 I 中可以通过-NH-基团与“R₁,”基团结合以提供如以下式 II 所示的本发明的结构:

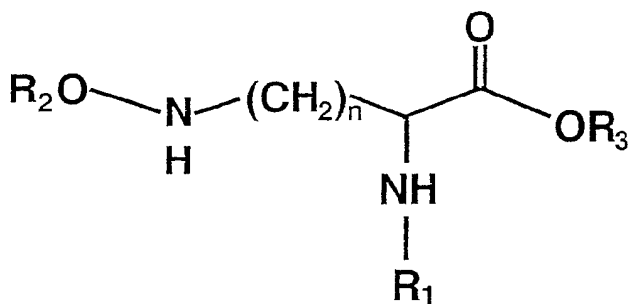
图 2



其中变量 R₁, R₂, R₃ 和 n 如上定义, 特别是“n”可以是 1, 2 或 3。另外, 当“R₁”是单环的环状部分时, 所述单环部分包含一个不成对电子位于氮原子周围的“NO”基团, 例如 R₁ 可以是 2,2,6,6-四甲基-4-coboxyl-哌啶(piperidene)-1-氧基, n 可以为“1”。

在上述结构 I 或 II 中“R₂”或“R₃”可以不与“O”但与“NH”连接部分结合。但“R₂”和“R₁”各自通过“NH”连接, 获得如下所述的产生的结构 III。

图 3

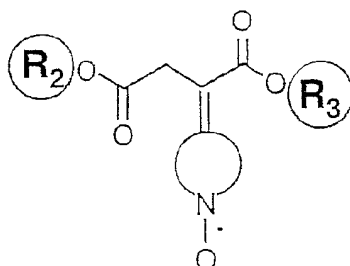


当变量 R₁, R₂, R₃ 和“n”是如对于 I 和 II 的上述定义时, 上述结构 III 包含本发明的化合物。

在结构 I, II 和 III 中, R₁ 部分被定义为可以是含有一个不成对电子的硝酰基自由基, 硝酰基自由基可以是如下述结构 IV 所示的环状硝酰基。

通过结构通式 IV 举例本发明的化合物:

图 4



其中 R_2 和 R_3 是结构 I, II 或 III 相关的如上定义的各自独立的部分, 特别地 R_2 和 R_3 可以是甲基, 乙基, 或可以为叔丁基的丁基。

如这里使用环可以是在至少一个位置含有 NO 基团的-N-的任何环状部分。环可以是如图 5 的 6 元环, 如图 13 的 5 元环或其它环和/或稠环结构。

在图 7 中其中 $R_2=R_3=H$ (TOPS) 的一个结构中是在胞内产生硝基氧功效的酯酶裂解后活细胞内的结构。在一个实施方案中, R_2 和 (或) R_3 它们本身是如每个图 11 和图 12 的结构, 图 6 描述不对称结构, $R_2=H$ 并且 R_3 每个是关于结构 I, II 和 III 的如上定义的任何部分。图 8 给出图 6 的实例, 其中 $R_3=$ 乙醇 (E-TOPS)。图 9 和图 10 提供图 5 的对称结构的实例, 其中 $R_2=R_3=$ 乙醇 (DETOPS) 或者 $R_2=R_3=$ 叔丁醇 (DTTOPS)。图 11 给出二自由基结构的实例, 其中 $R_2=$ Tempol (TETOPS)。

在本发明化合物的任何结构中 R_2 和 R_3 可以用来将分子与其它原子, 分子, 或生物物质结合。例如, 在结构 III 中 R_2 可以用来将分子与其它反应活性部位结合, 如在美国专利 5,725,839; 5,741,893; 5,767,089; 5,804,561; 5,807,831; 5,817,632; 5,824,781; 5,840,701; 5,591,710; 5,789,376; 5,811,005; 6,048,967 中任何一个所述。另外, 与 OR_2 基团连接的 NH 可以用来与其它分子如铜三肽 (copper tri-peptide) 结合。

因为本文所述的化合物提供抗氧化硝基氧的定向治疗量, 它们在防止和减轻氧化应激效应中是高度有效的。发现与 Tempol 相比, 通过以 200 mg/kg 静脉内给药, 肌内, 口服, 和腹腔内给药 E-TOPS 具有增加的体内

半衰期。参见图 18, 19, 20, 和 21。还已经证明与 Tempol 相比 E-TOPS 在小鼠 LD₅₀ 模型中具有极低的急性毒性曲线 (profile) (参见图 24)。

在经皮施用中, 当在小鼠中照射之前和之后施用时 DE-TOPS (图 32, 35) 配方减少 UVB 光诱导的皮肤加厚, 出血, 炎症。DE-TOPS 还显示对由 UVB 照射诱导的慢性损伤的效果 (图 33)。这些制剂在减少皱纹方面比 Retin A 有利 (参见图 37)。如以下更详细地描述, 本发明 CGN 化合物的主要优势是以多种途径给药生理相容的溶液的能力。此外, 取决于靶细胞和诊断或治疗目的, 通过同时皮下给药多硝基氧 (polynitroxide) 可以增强这些化合物的活性。

本发明的组合物可以用于皮肤病学/化妆品可接受的用于经皮的载体如软膏, 洗剂, 或凝胶剂, 和其它作为稀释剂, 分散剂或载体的溶剂或载体。载体可以包含通常用在护肤品中的物质如水, 液体或固体润肤剂, 硅油, 乳化剂, 溶剂, 湿润剂, 增稠剂, 粉剂, 推进剂等。

如上所述, 不成对的硝酰基电子为硝基氧提供除了抗氧化活性以外的其它有用性能。特别是, 硝基氧在它们自由基形式中是顺磁探针, 其 EPR 信号可以反映生物系统中的代谢信息, 例如氧张力或组织的氧化还原态。因为天然存在的不成对电子在体内基本上没有, EPR 成象具有另外的优点, 即基本上没有背景噪声。硝基氧还减少氢核的驰豫时间, 可在质子或核磁共振成象中用作造影剂。硝基氧还可以作为造影剂将代谢信息增加到已经从 MRI 获得的形态数据。例如, 通过取代硝基氧上的各种官能团, 可以操纵包括松弛性 (relaxivity), 溶解度, 生物分布 (biodistribution), 体内稳定性和耐受性的性能。通过区分等强度的, 但在组织学上不相似的组织和通过促进损伤如血脑屏障的损伤, 脓肿和肿胀的定位和鉴定, 从硝基氧获得的对比度增强可以改善 MRI 的性能。

配方

鉴于硝基氧稳定的化学性质, 可以通过各种途径对患者给药本文公开的组合物。为了本发明的目的, 通过已知的技术配制无毒的“药物”或“药物可接受的”组合物, 当需要时与批准用于对人给药的载体或添加剂一起使用。如以下实施例所述, 给药途径包括任何类型的注射, 包括

肌内，皮下或腹膜内；静脉内，眼或眼内；口；任何类型的跨粘膜传递，包括颊，鼻，肛门，和阴道；局部或经皮的；和肺内的。该组合物可以包括本领域技术人员已知的缓冲液，盐，或其它溶剂以保持疫苗在溶液中的活性。

- 5 本发明的组合物或配方可包含在药用赋形剂或载体中的有效量的本发明的硝基氧。载体通常为相对惰性的物质，其促进以适于传递至患者如人的剂量形式给药药物有效物质。

包括的适当赋形剂不限于稳定剂，润湿剂和乳化剂，用于改变同渗容摩的盐，包封剂（encapsulating agents），缓冲液，透皮促进剂，润肤霜，
10 和凝胶剂。药用赋形剂的实例在在此引入以公开和描述载体和配方的 Remington's Pharmaceutical Sciences (Alfonso R. Gennaro 编辑，第 19 版 1995) 中描述。

对皮肤施用的局部配方可以包含硝基氧，载体，和滤光剂(sun block)或 UV 吸收剂。如在美国专利 6,235,271; 6,224,854 ; 6,071,501; 5,976,513;
15 5,972,316; 和 5,968,485 中任何一个和在这些专利中引用的专利和出版物中所公开，已知大量的 UV 吸收剂。UV 吸收剂可以是任何已知的油溶性 UV 吸收剂，特别是已经批准并销售的用于化妆品用途那些。例如在 “Sunscreens”, Development, Evaluation and Regulatory Aspects, Eds.: N. J. Lowe 和 N. A. Shaath, M. Dekker Inc., New York and Basel, 1990; 和 Ken
20 Klein, Encyclopedia of UV absorbers for sunscreen products, Cosmetics & Toiletries 107 45-64 (1992)中描述该油溶性的有机 UV 吸收剂。

油溶性，非微粉化的 UV 吸收剂例如可以是对氨基苯甲酸衍生物如对氨基苯甲酸的酯，盐或胺-改性（amine-modified）的衍生物；水杨酸衍生物如它的酯或盐；二苯甲酮衍生物；二苯甲酰甲烷衍生物；二苯丙烯酸
25 酯衍生物；苯并呋喃衍生物；包含一个或多个有机硅残基的聚合紫外吸收剂；肉桂酸酯；樟脑衍生物；三苯胺基-s-三嗪衍生物；苯基苯并咪唑磺酸及其盐；尿刊酸(3-咪唑-4-基-丙烯酸)或其乙酯；薄荷基邻氨基苯甲酸盐（或酯）；苯并三唑；羟基苯基三嗪衍生物；或双间苯二酚二烷基氨基三嗪。

30 二苯甲酮衍生物的具体实例包括二苯甲酮-3-(2-羟基-4-甲氧基二苯甲

酮), 二苯甲酮-4(2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮-5-磺酸)和二苯甲酮-8-(2,2'-二羟基-4-甲氧基二苯甲酮)。

二苯甲酰甲烷衍生物的具体实例是丁基甲氧基二苯甲酰甲烷[1-(4-叔丁基)-3-(4-甲氧基)-1,3-丙烷-1,3-二酮]。

5 二苯丙烯酸酯衍生物的具体实例包括 奥克立林(2-氰基-3,3'-二苯丙烯酸 2-乙基己基酯)和依托立林(2-氰基-3,3'-二苯丙烯酸乙酯)。

苯并呋喃衍生物的具体实例包括在美国专利 5,338,539 或 EP582189 中描述的 3-(苯并呋喃基)-2-氰基丙烯酸酯, 在美国专利 5,518,713 中描述的 2-(2-苯并呋喃基)-5-叔丁基苯并噁唑和在美国专利 5,362,481 中描述的
10 2-(对氨基苯)苯并呋喃。

包含一个或多个有机硅残基的聚合紫外吸收剂的具体实例是在欧洲专利 EP709080 中公开的丙二酸亚苄酯聚硅氧烷衍生物, 其中 $R_{sub.15}$ 是 H 或 OMe 并且 r 约为 7; 和在 WO 94/06404 中描述的苯并三唑聚硅氧烷类型的聚合物。

15 肉桂酸酯的具体实例包括甲氧基肉桂酸辛酯 (4-甲氧基肉桂酸 2-乙基己基酯), 二乙醇胺甲氧基肉桂酸酯 (4-甲氧基肉桂酸的二乙醇胺盐), 对甲氧基肉桂酸异戊酯 (4-甲氧基肉桂酸 2-异戊酯), 甲基肉桂酸 2,5-二异丙酯, 在美国专利 5,601,811 中公开的肉桂酸衍生物和在 WO 97/00851 中公开的肉桂酸衍生物。

20 樟脑衍生物的具体实例是 4-甲基-苯亚甲基樟脑[3-(4'-甲基)苯亚甲基-苄烷-2-酮], 3-苯亚甲基樟脑 (3-苯亚甲基-苄烷-2-酮), 聚丙烯酰胺基甲基苯亚甲基樟脑{N-[2(和 4)-2-oxyborn-3-亚基-甲基]苄基}丙烯酰胺聚合物}, 三甲基铵苯亚甲基樟脑硫酸酯[3-(4'-三甲基铵)-苯亚甲基-苄烷-2-酮硫酸二甲酯], 对苯二亚甲基二樟脑磺酸{3,3'-(1,4-苯二亚甲基)-双-(7, 7-二
25 甲基-2-氧代-二环-[2.2.1]庚-1-甲烷磺酸}及其盐和苯亚甲基樟脑磺酸[3-(4'-磺基)苯亚甲基-苄烷-2-酮]及其盐。

三苯胺基-s-三嗪衍生物的具体实例包括辛基三嗪[2,4,6-三苯胺基-(对羰-2'-乙基-1'-氧)-1,3,5-三嗪, 在美国专利 5,332,568 中公开的三苯胺基-s-三嗪衍生物, 在欧洲专利 517104 中公开的三苯胺基-s-三嗪衍生物, 在欧洲
30 专利 EP 570838 中公开的三苯胺基-s-三嗪衍生物, 在美国专利 5,252,323

中描述的二苯胺基-s-三嗪衍生物，在 WO93/17002-A1 中描述的二苯胺基-s-三嗪衍生物和在 WO97/03642-A1 中公开的二苯胺基-s-三嗪衍生物。

苯并三唑的具体实例是 2-(2-羟基-5-甲基-苯基) 苯并三唑。

羟基苯基三嗪衍生物的具体实例包括例如在 EP-A1-775,698 中描述的那些，如 2,4-双-{[4--(2-乙基-己氧基)-2-羟基]-苯基}-6-(4-甲氧苯基)-1,3, 5-三嗪。

双间苯二酚二烷基氨基三嗪的具体实例是例如在 EP-A1-780,382 中描述的那些。

无机微细颜料 UV 吸收剂，新防晒剂的任选组分 b) 可以是例如镀有氧化铝或二氧化硅的二氧化钛，镀有氧化铝或二氧化硅的氧化锌，或云母。

聚合的空心球体组分，按照本发明的新防晒剂的组分 c) 可以是例如在 EP-A-761,201 中描述的那些。

15 方法

公开一种治疗方法，由此对患者给药治疗有效量的硝基氧化合物。硝基氧化合物由包含直接结合在一起的氮原子和氧原子和不成对电子 ($\cdot\text{NO}$) 的第一部分，和提供负电荷的第二部分组成。第一部分和第二部分通过位于两者之间的连接基团直接或间接连接，并且与第一部分和第二部分以这样的方式结合以致当硝基氧存在于患者中时第二部分的负电荷稳定第一部分的 $\cdot\text{NO}$ 。通过稳定分子的 $\cdot\text{NO}$ 部分允许硝基氧与活性氧物质长时间反应和调节那些活性氧物质的不良作用。

公开一种方法，由此对可以是人的患者的皮肤施用配方。该配方由载体和具有第一脂溶性和第一水溶性的化合物组成。允许该化合物渗透患者的皮肤和到达活细胞并在细胞的酶的存在下反应。反应产生具有显著小于第一脂溶性的第二脂溶性的化合物，并且还获得显著大于第一水溶性的第二水溶性，因此允许化合物渗透到活细胞和保持与那些细胞接触。化合物可以是硝基氧，其帮助调节活性氧物质的不良作用。

30 实施例

提出下列实施例以便为本领域普通技术人员提供如何制备和利用本发明的完全的公开内容和描述，而不是打算限制本发明人认为的它们的发明的范围，它们也不是表示以下的实验是进行的全部或唯一的实验。已经努力确保关于所用数字（例如量，温度等）的准确度，但应当考虑一些实验误差和偏差。除非另外指出，份是重量份，分子量是重均分子量，温度是摄氏度数，压力是在大气压下或接近大气压。

实施例 1

一和二羧酸和酯化的硝基氧物质的合成和制备

下列化学合成方案产生稳定的硝基氧自由基，其作为膜渗透性和体内清除的函数的生理隔室化被带负电荷的阴离子如一或二羧酸调节。关于酯衍生物局部施用是特别有利的，所述酯衍生物提供跨越疏水屏障的差别渗透性，第一种硝基氧物质具有相对于第二种物质增加的膜渗透性，在通过胞内脂酶水解后第二种物质具有增加的胞内保留和抗氧化治疗效用。

(a) 2,2,6,6-四甲基-1-氧基-4-哌啶基琥珀酸一乙基酯(E-TOPS)和二乙基酯(DE-TOPS)的合成。

在氮气气氛下将装备回流冷凝器和磁搅拌器的干燥双颈烧瓶充满 45 ml 无水叔丁醇和 6.72 g 叔丁醇钾。在回流下煮沸和加热混合物直至所有固体溶解。然后冷却烧瓶并加入 6.8 g 4-氧代-[TPO]，12 ml 琥珀酸二乙酯和 15 ml 叔丁醇。然后将反应混合物加热 10 分钟。在用冰冷却和用稀 HCL 中和后，在减压下将大部分醇蒸馏掉。将残渣倒入 350 ml 冰水中并用稀盐酸酸化至 pH 3，用二氯甲烷萃取。用 1%氨溶液将合并的萃取液洗涤几次。溶液用冰冷却，酸化并再次用二氯甲烷萃取。然后用硫酸钠干燥产生的萃取液。在蒸发二氯甲烷后，用己烷研制剩余的红色油状液体。在多孔瓷板上压滤单酯结晶，并从乙醚和己烷的混合物中再结晶。产物是黄色棱晶，熔点为 103℃，预期产率为 60-70%。

图 14 显示通过液相色谱分离 TOPS，E-TOPS，和 DE-TOPS。

实施例 2

DE-TOPS 水解成 TOPS

参考图 15，当硝基氧化合物暴露于酯酶或任何胞内酶或其它裂解酯基团的生物化学反应时，DE-TOPS 水解成非酯化 TOPS 形式，将产生选择性的细胞膜渗透性和增加的胞内保留。将 DE-EOPS 作为疏水的前药施用将角质层（死细胞）渗透到代谢活性的基底膜层。DE-TOPS 的酶促水解将允许产物 TOPS 保留在水相中并且主要在胞内体积中。为了示范该反应，显示 DE-TOPS 的化学水解以产生化合物，与辛醇比较其优选分配在水中。

将 20 mg DE-TOPS 样品加入 1 ml 水和 1 ml 辛醇的混合物并使其分配。在 15 分钟后，取 40 μ l 水或油样品用于 EPR 光谱分析。紧接着，将 20 mg DE-TOPS 混合在 1 ml 10 mM NaOH 中并允许在室温下温育过夜。用盐酸中和溶液并加至 1 ml 水和 2 ml 辛醇。允许混合物分离，在 15 分钟后，取 40 μ l 水或油样品用于 EPR 光谱分析。使用 Varian E9 分光光度计获得 EPR 光谱。扫描宽度为 100 G，频率为 9.535 GHz，微波功率为 2 mW 并且调制频率为 100 Hz。

在水解前，优选将 DE-TOPS 分配在辛醇中。发现 DE-TOPS 的分配系数 (LogP) 为 1.7。在水解后，假定产物 TOPS 分配在水相中。发现 TOPS 的分配系数 (LogP) 为 0.9。这显示在水解后，如此形成的产物是显著亲水的并且将更容易胞内区室化。

20

实施例 3

TE-TOPS 的合成

该试验性研究是合成作为 Tempol 证明的 TE-TOPS，裂解的化合物可以结合到 TOPS-酯前药构建体中。从 ^{14}N -E-TOPS 和 ^{15}N -Tempol 合成 TE-TOPS。合成是多步过程，包括氧代-Tempo（4-氧代-2,2,6,6-四甲基-哌啶-1-氧基）与琥珀酸二乙酯的缩合，接着 ^{14}N -E-TOPS 与 ^{15}N -Tempol 或乙醇的酯化，分别产生 ^{14}N -DE-TOPS 或 ^{14}N -, ^{15}N -TE-TOPS。通过 HPLC 和 EPR 监视形成双游离基 ^{14}N , ^{15}N -TE-TOPS 的反应。 ^{14}N -E-TOPS 产生三重峰的 EPR 光谱，如图 16A 左图所示。它的 HPLC 洗脱时间为 6.3 分钟，如图 16B 左图所示。 ^{15}N -Tempol 的 HPLC 洗脱时间为 5.3 分钟，如图 16B 右图

30

所示。在 3 小时反应后，在 5.3 和 6.3 分钟处的 HPLC 峰的高度减小而在 13.9 分钟处的新峰出现（参见图 16C，右图）。在反应 6 小时后， ^{15}N -Tempol 和 ^{14}N -E-TOPS 峰几乎消失（图 16D，右图）。为了确保在 13.9 分钟处的 HPLC 峰由 ^{14}N -, ^{15}N -TE-TOPS 组成，收集该峰然后通过 EPR 分析。EPR 光谱在图 16D，左图中显示。新峰的加宽和出现是由于双游离基之间自旋-自旋和自旋-自旋偶极相互作用。

实施例 4

TE-TOPS 水解成 TOPS 和 Tempol

10 将 20 mg ^{14}N - ^{15}N -TE-ToPS 混合在 1 ml 10 mM KOH 中并允许在室温下温育过夜。用盐酸中和溶液。使用 Varian E9 分光光度计获得 EPR 光谱。扫描宽度为 100 G，频率为 9.535 GHz，微波功率为 2 mV 并且调制频率为 100 Hz。图 17A 中更尖锐的 EPR 光谱显示，与图 16D 作图的宽谱相比 TE-TOPS 完全水解。将局部乳膏中的 ^{15}N - ^{14}N -TE-TOPS 施用在小鼠皮
15 肤上。尿样显示体内酯酶裂解，参见图 17B。

实施例 5

DE-TOPS 和 Tempol 的体内血浆半衰期

如上所述，现有基于硝基氧的组合物用于体内治疗或诊断用途的主要
20 缺点是这些分子有限的半衰期和它们迅速的体内生物还原（bioreduction）和清除。Tempol 比较短的半衰期的结果是需要给药越来越大的剂量以产生深刻的治疗或诊断效果。如以下图 24 所示，增加的硝基氧剂量可以产生急性和慢性毒性。然而，在化合物的血浆半衰期增加的地方，可以减小急性和慢性征候（indication）的总剂量。

25 通过每分钟收集光谱共 60 至 90 分钟测量血浆半衰期。从每个光谱计算 ^{15}N Tempol 或 ^{14}N E-TOPS EPR 信号的峰高。如图 18-21 所示分别对腹膜内，静脉内，肌内，和口服画出 Tempol 或 E-TOPS 的峰高对时间的曲线。图 18 显示 i. p. 给药 125 mg/kg E-TOPS 和 Tempol 的体内血浆半衰期的测量。对于化合物整个半衰期 ^{14}N E-TOPS（上线）被显著提高。尽管
30 ^{15}N Tempol（下线）具有超过 40 分钟的可测量的半衰期，E-TOPS 具

有至少 80 分钟显著更高的活性。剂量是摩尔比率 1:1 的 125 mg/kg E-TOPS 和 80 mg/kg Tempol。

图 19 显示静脉内给药 125 mg/kg E-TOPS 和 Tempol 的体内血浆半衰期的测量。在静脉输注实施例中，Tempol（下线）在体内迅速减少，以致通过

在输注后 5 分钟标记，极少的活性 Tempol 残留在血管内部。

如图 20 所示，在肌内共同给药后，除了开始数分钟以外 E-TOPS 的体内血浆半衰期显著延长，超过 Tempol 至少 60 分钟。

参考图 21，显示当口服给药两种化合物时与 Tempol 相比 E-TOPS 的体内血浆半衰期延长。如图 18-21，剂量是摩尔比率 1:1 的 125 mg/kg E-TOPS 和 80 mg/kg Tempol。

实施例 6

在人皮肤中的渗透和区室化

参考图 22，将石油基中的 DE-TOPS（100 mM）施用在新鲜的人皮肤上。受体缓冲液是含有 0.01%叠氮化钠的 PBS。持续搅拌缓冲液。用循环水浴将细胞保持在 37°C。图 22 显示皮肤渗透的程度。小鼠皮肤（或供体人皮肤）覆盖受体的顶部，将细胞 DE-TOPS 施用在皮肤之上。在皮肤之下，施用 PBS 缓冲液以保持皮肤活着。24 小时后收集缓冲液用于 EPR 分析。清洗皮肤表面并检验皮肤样品的 EPR 信号。尽管在施用前 Tempol 和 DE-TOPS 具有相同的信号强度，在施用 24 小时后在缓冲液化合物中存在比 DE-TOPS 更强的 Tempol 信号。然而，在皮肤中 E-TOPS 信号强于 Tempol。因此，与 Tempol 相比 DE-TOPS 局限在皮肤中。DE-TOPS 将渗透到表皮和真皮细胞中，在那它将被酶促水解和变成区室化。与易溶解的 Tempone 相比，这将导致 DETOPS 在这些皮肤层中更均匀的分布。

在人志愿者的皮肤上进行使用 DETOPS 的预备 S-带 EPR 光谱学和成像实验。用乙醇充分洗涤人志愿者的前臂皮肤，约 6 mm 直径的圆点，典型地在腕的月面（lunar surface），并将 3 μ L 100 mM DE-TOPS 溶液（约 2×10^{17} spins）施用到标记的皮肤区域。5 分钟后，当沉积的溶液干燥时，将特别设计的具有 7 mm 直径孔的定位支架和锁定在共振器盖的孔中的底盘附着在皮肤上以将该皮肤区域固定于表面共振器。参见“人皮肤中硝

基氧自由基分布和代谢的体内 EPR 成象,"He 等, J. of Magnetic Resonance 148,155-164 (2001)。然后开始 EPR 和 EPRI 测量。进行在志愿者上的测量 15 至 20 分钟,其后有 30 分钟的休息期,其中志愿者将臂从共振器和磁铁移开。该支架固定皮肤定位并确保加载共振器恒定的填充系数。在持续达 8 小时的全部系列的测量中让定位支架附着在臂上。

参考图 23,显示 CNO 渗透和区室化的彩色-编码图象。在局部施用 3 μ L 或 DE-TOPS (DMSO 中 100 mM) 后 1 小时和 8 小时,从相同的人志愿者的前臂皮肤获得 1-D 空间图象。使用带有如 He 等, J. of Magnetic Resonance 148,155-164 (2001)中所述的特别设计的表面共振器的 S-带 (2.2 GHz) EPR 成象系统进行测量。虚线表示皮肤表面。估计的皮肤深度标记为表皮,真皮和皮下层。区室化导致 DE-TOPS 贯穿皮肤层的更扩散的分布。经过 8 小时,与 tempone 相比,DE-TOPS 的 1-D EPR 空间图象显示增强的贯穿真皮和表皮的视觉分布。

15 实施例 7

Tempol 和 E-TOPS 的急性毒性 LD₅₀ 以及 E-TOPS 的代谢。

如上所述,未结合的小分子硝基氧的实际的,临床应用已经受体内减小的活性和比较短的体内半衰期限制。体内减小的半衰期的结果是需要给药更大的剂量以获得相同的治疗或诊断效果。用 LD₅₀ 模型测定在不同剂量下小鼠的存活率可以测量 Tempol 的毒性。图 24 显示关于 Tempol 的急性毒性曲线作为随着增加的剂量生存率的函数。E-TOPS 配方在可达 3.5 mmol/kg 的剂量下基本上未显示存活率的减小,而 Tempol 在 2.0 mmol/kg 的较低剂量下显示零存活率。在 2.0-2.5 mmol/kg 的剂量之间出现存活率的显著差异。图 25 显示来源于 6 小时后对于血浆尿化合物中 DE-TOPS 的更强的 EPR 信号 (与浓度成比例),显示通过正常代谢的排泄和清除。

实施例 8

E-TOPS 过氧化物歧化酶活性的抑制

图 26 显示与 Tempol 相比的 E-TOPS 过氧化物歧化酶活性。通过电子顺磁共振测量 E-TOPS 和 Tempol 的 SOD-模拟活性。随时间监测高磁场

EPR 峰。不含 NADH (-NADH)的 E-TOPS 和 Tempol 曲线显示硝基氧与过氧化物催化反应。含有 NADH (+NADH)的 E-TOPS 和 Tempol 曲线显示从氧铵至羟胺的 2 个电子的还原。结果显示 E-TOPS 具有与 Tempol 类似的 SOD 活性。

5

实施例 9

培养的大鼠皮层神经元中的血红蛋白毒性

E-TOPS 在中风中的出血性转化模型中是神经保护性的。初级神经元培养物是从胎大鼠崽（胚胎期第 15 天）的前脑制备的。通过在补充谷氨酰胺（2 mM），青霉素-链霉素（50 单位/ml-0.05 mg/ml），热失活的马血清（10%），胎牛血清（10%），葡萄糖（0.5%或 28 mM）的神经元培养基（MEM Eagle（Sigma, M4526））中重复机械研制分散细胞。在离心（900 g；5 分钟）后，将细胞以 5×10^6 个细胞/孔的密度放置在聚赖氨酸包被的 96 孔平板上。以 10 mM 的终浓度加入血红蛋白，以 10 μ M, 1 μ M 和 0.1 μ M 的终浓度加入 ETOPS。在温育 24 小时后使用比色 MTT 定量测定神经元的生存力。将 MTT 加入每个孔以使染料的终浓度为 0.15 mg/ml。然后将平板返回至培养箱 1 小时，此时去除未结合的 MTT，让平板风干。然后通过加入酸化的异丙醇（里面含有 0.1 N HCl）溶解存在于活细胞中的紫色产物，并使用 96 孔平板读出器测量吸光强度（540 nm）。%对照=（测试 A_{540} /对照平均值）X 100%。图 27 显示 E-TOPS 样品增加的神经元生存力。

10

15

20

实施例 10

暴露于过硝酸盐发生器（generator）SIN-1 的皮层神经元的 TOPS 或 TOPS-酯神经保护。

25

基于过硝酸盐的产生在培养的大鼠皮层神经元中研究 SIN-1 的毒性。在该模型中 TOPS 或 TOPS-酯是神经保护性的证明表现为硝基氧依赖性地阻断由 SIN-1 导致的 EGFR 激活。

初级神经元培养物是从胎大鼠崽（胚胎期第 15 天）的前脑制备的。通过在补充谷氨酰胺（2 mM），青霉素-链霉素（50 单位/ml-0.05 mg/ml），

30

热失活的马血清（10%），胎牛血清（10%），葡萄糖（0.5%或 28 mM）的神经元培养基（MEM Eagle（Sigma, M4526））中重复机械研制分散细胞。在离心（900 g；5 分钟）后，将细胞以 5×10^6 个细胞/孔的密度放置在聚赖氨酸包被的 96 孔平板上。按照公开的方法（Carroll 等 2000）在细胞中诱导细胞毒性。刚好在使用前将 SIN-1（3-吗啉基悉尼酮亚胺，Sigma），PN 发生器加入每个孔以产生 1 mM 的终浓度。在 SIN-1 之前 15 分钟以指示的浓度将 TOPS, E-TOPS 或 DE-TOPS 加入每个培养物。使用比色 MTT 定量测定神经元的生存力。将 MTT 加入每个孔以使染料的终浓度为 0.15 mg/ml。然后将平板返回至培养箱 1 小时，此时去除未结合的 MTT，让平板风干。然后通过加入酸化的异丙醇（里面含有 0.1 N HCl）溶解存在于活细胞中的紫色产物，并使用 96 孔平板读出器测量吸光强度（540 nm）。%对照=（测试 A_{540} /对照平均值） $\times 100\%$ 。

参考图 28，TOPS 或 TOPS-酯以剂量依赖的方式防止 SIN-1 的毒性。通过防止受体的共价二聚化和随后的自磷酸化，神经保护浓度的这些化合物将防止依赖过硝酸盐的 EGFR 激活。

实施例 11

通过抑制硝化的抗氧化活性

为了证明 DE-TOPS, E-TOPS 和 TOPS 的体外抗氧化活性，将这些化合物与作为金标准的 Tempol 相比较。显示 Tempol 防止体内通过过硝酸盐的 4-羟基苯乙酸（HPA）的硝化。在该预备实验中，测量通过 Tempol, DE-TOPS, E-TOPS 或 TOPS 的过硝酸盐依赖的 HPA 硝化的%抑制。

通过先前所述的方法制备过硝酸盐。在 100 mM 磷酸钠 pH 6.5 中制备 1 mM 4-羟基苯乙酸（HPA, Sigma）溶液。将一定量的 TOPS, E-TOPS 和 DE-TOPS 加入 1 ml 上述 HPA 溶液以产生 0.98, 3.91, 15.5, 62.5 和 250 M 的硝基氧终浓度。以 1 mM 的终浓度加入过硝酸盐开始硝化。还使用非活性过硝酸盐作为空白和零硝基氧作为阳性对照进行反应。硝化后接着在 405 nm 下分光光度测量。在用 NaOH 将反应混合物的 pH 增加到 10-11 以后分光光度测定 4-羟基-3-硝基苯乙酸酯的浓度。

参考图 29，通过 1 mM 过硝酸盐的 40%-60%的 HPA 硝化被 3 μ M 本

发明的硝基氧抑制。通过硝基氧的抑制机制是催化的。因为过硝酸盐被提示在照射诱导的细胞损伤中起重要作用，TOPS-酯具有作为暴露于活性氧物质如过硝酸盐的皮肤治疗的功效。

5 实施例 12

通过暴露于 TNF- α 测量细胞编程性细胞死亡

通过其中通过暴露于肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导编程性细胞死亡的模型可以测量紫外光诱导的编程性细胞死亡。如图 30 所示，针对对照测量关于细胞随时间的编程性细胞死亡严重性的测量结果。将培养的人 Y-79 细胞保持在 pH 7.4 下培养瓶中的两性霉素/青霉素/链霉素处理的(1% v/v) RPMI 1640 培养基与 L-谷氨酰胺和 10%胎牛血清的混合物中，在 10%-CO₂/90%-空气的孵育条件下 37 摄氏度和 20%湿度的培养箱中。将 E-TOPS 制备成 10 mg/ml 配方。从该原液，将 10 μ l 加入 1 ml 细胞悬浮液以使 ETOPS 的终浓度为 100 μ g/ml ETOPS。使用人 TNF- α (10 μ g/ml) 来制备连续的培养基稀度以获得 5.0 ng/ml 的 TNF- α 浓度。在细胞计量测定之前在 Zeiss 倒置显微镜上通过锥虫蓝排除测定 (exclusion assay) 测定细胞密度和生存力以确保细胞浓度。在小瓶设定在给定浓度下温和混合 TNF- α 6, 24, 和 48 小时，将细胞因子处理的细胞再悬浮于 PBS 中。将细胞再悬浮在膜联蛋白 V-FITC 偶联物的溶液中并在室温下黑暗中温育 15 分钟。然后将结合缓冲液加至每个样品以产生可达 1.0×10^6 个细胞/ml 的细胞密度。通过混合下列各项制备结合缓冲液：10ml 1M HEPES/NaOH, pH 7.4, 30 ml 5M NaCl, 5 ml 1M KCl, 1 ml 1M MgCl₂, 1.8 ml 1M CaCl₂ 和 52.2 ml DDW。

采用流式细胞计量方法以利用膜联蛋白 V 与带负电的磷脂酰丝氨酸 (PS) 残基以 1:50 膜联蛋白对 PS 的比率的可逆和依赖于钙的结合。然后对来源于培养物小瓶的细胞进行在 Becton-Dickinson FACStar 流式细胞仪上的 488 nm 测定，以确定不能存活的细胞的相对比例。使用二维 x-y 等高线图来显示早期编程性细胞死亡事件与晚期编程性细胞死亡事件分开的群体。在细胞计量试验之前设定补偿，通过使用仅用膜联蛋白染色的群体，和未染色的群体来限定在各个 FL-1/FL-2 象限中检测的最高限度。使用

CellQuest 软件为每组样品象限提供的统计学和回归分析，平均 5000 个细胞事件（event）的总取样把平均大大高于 1.0×10^6 个细胞/ml 的样品群体不算在内。仅仅荧光素染色的群体区分编程性细胞死亡检测，而使用二碘化丙锭的二重对染显示坏死群体。

5

实施例 13

当在照射前施用 DE-TOPS 时防止紫外线诱导的皮肤损伤的保护

参考图 32，与没有 UVB 曝露的正常小鼠皮肤相比，曝露 UVB 11 天导致显著的皮肤加厚。组织病理学皮肤切片显示 DE-TOPS 的局部施用显著地减少了由 UVB 诱导的皮肤加厚。局部施用是在 UVB 照射前每日 10 分钟。UVB 剂量为在 15 分钟的期间 200 mJ/cm^2 。UVB 灯光谱分布为 290-310 nm 80%，低于 310 nm 20%。DE-TOPS 配方为在石油基中 100 mM。参考图 31，以类似的方案，通过 DE-TOPS 急性抑制皮肤烧伤。参考图 33，饲养相同的小鼠 4 个月，通过 DE-TOPS 慢性抑制皮肤损伤。在该实例中在 UVB 照射前 2 小时施用 DE-TOPS。

15

实施例 14

当在照射后施用 DE-TOPS 时防止紫外线诱导的皮肤损伤的保护

如实施例 13 使用相同的方案，除了在照射后 15 分钟施用 DE-TOPS。在图 34 中显示 DE-TOPS 的保护作用，在图 35 中显示组织病理学变化。

20

实施例 15

与 Tempol 比较的防止紫外线诱导的皮肤损伤的保护

将与实施例 13 相同的方案用于本研究。当在照射前 10 分钟或 2 小时施用试验样品时，与 Tempol 比较测试 DE-TOPS 在保护 UVB 诱导的皮肤损伤中的作用。图 36 的结果显示 DE-TOPS 提供比 Tempol 更长的治疗窗（参见图 36B 和 C）。

25

实施例 16

BE-TOPS 在 Rhino 小鼠中的防皱效果

30

为了确定 CGN 相对于可商购的局部治疗的优势,将 BE-TOPS, Retin-A 和空白对照剂施用到暴露于每隔日的 UVB 照射的小鼠皮肤上。与对照动物相比用 Retin-A 治疗导致皮肤起皱的减少 (参见图 37)。尽管 Retin-A 的光敏性导致背部皮肤的脱色和剥落,背部皮肤的皮肤组织切片还显示

5 Retin-A 治疗导致显露的和深层的囊肿密度的减少。

BE-TOPS 还优于 Retin-A 的是 DE-TOPS 处理的皮肤不是 UVB 敏感的。

尽管根据其具体实施方案已经描述本发明,本领域技术人员应当理解可以不背离本发明的真实精神和本发明的范围进行各种变化和替代等价

10 物。另外,可以进行许多修改以将具体的情况,材料,物质组成,方法,过程步骤或多个步骤适合于本发明的目的,精神和范围。所有的这些修改都在此后附的权利要求的范围内。

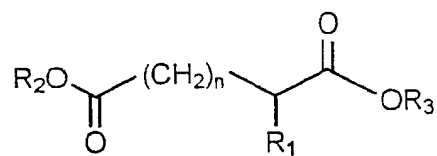


图 1

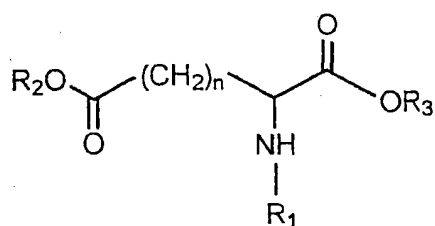


图 2

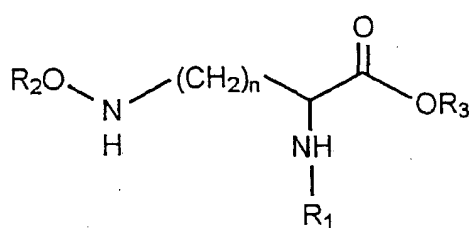


图 3

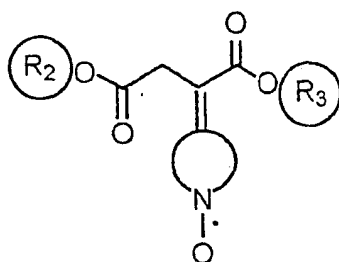


图 4

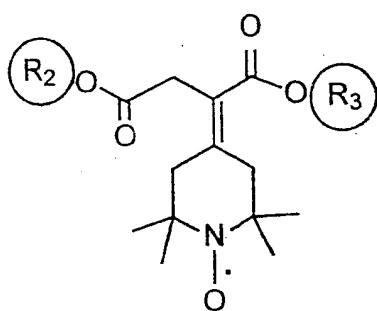


图 5

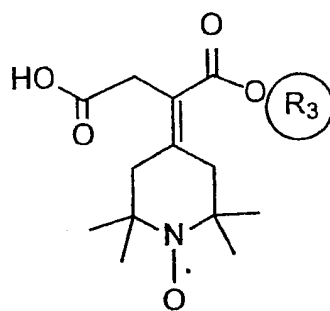


图 6

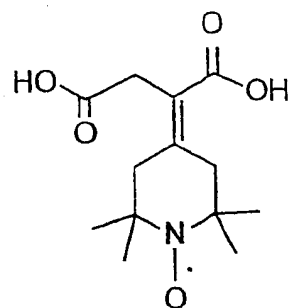


图 7

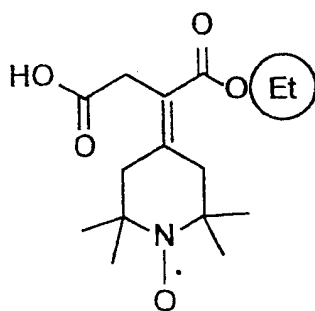


图 8

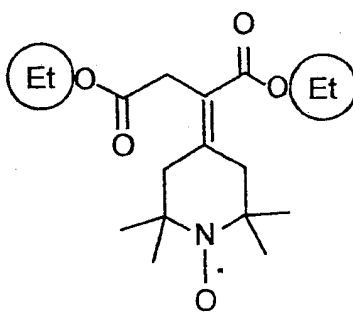


图 9

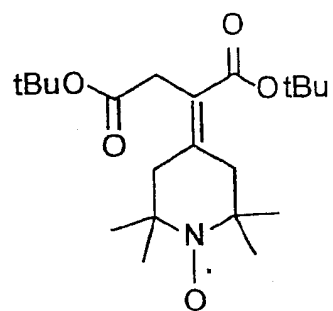


图 10

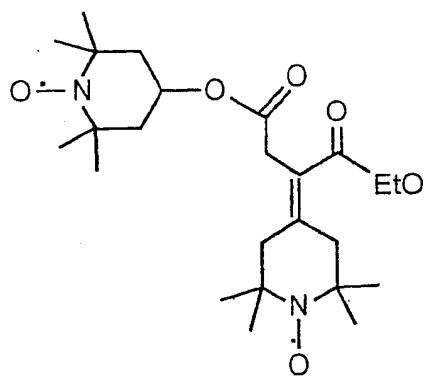


图 11

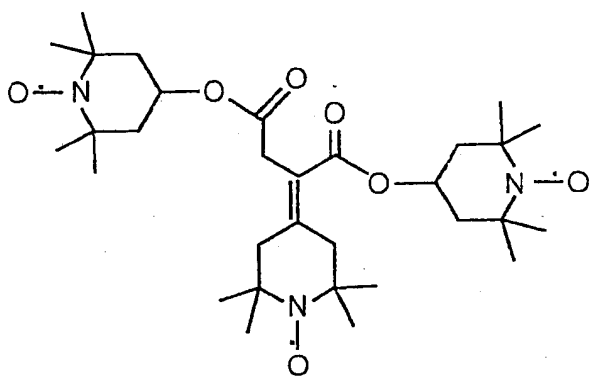


图 12

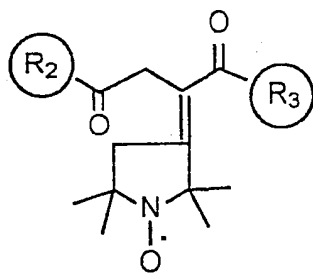


图 13

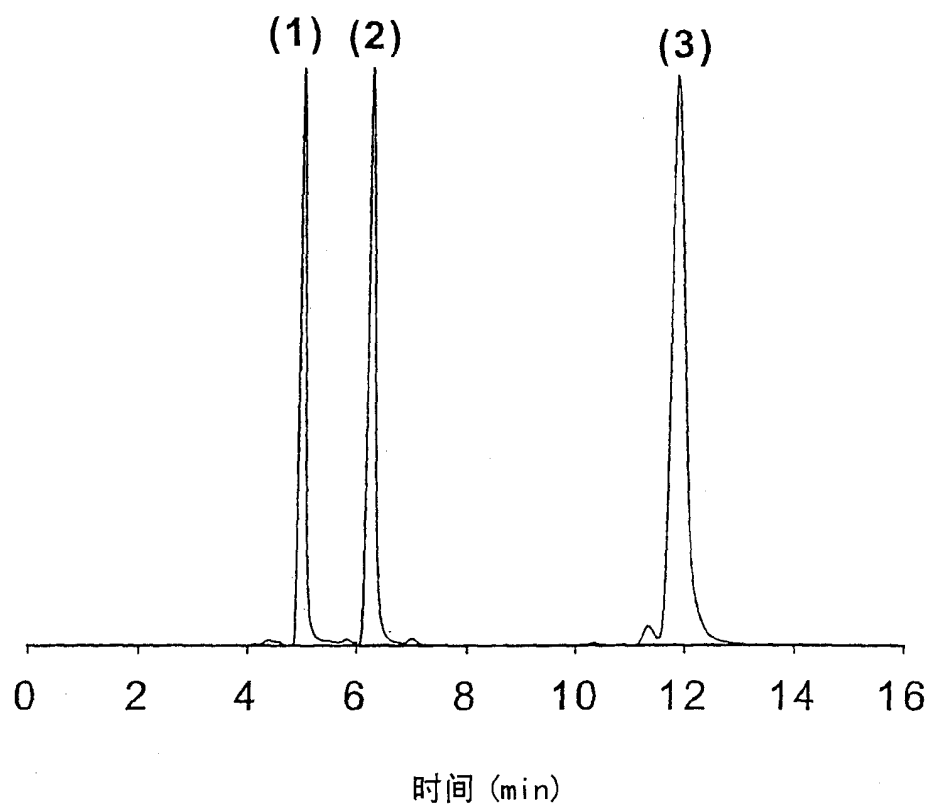


图 14. 显示 DETOPS, ETOPS 和 TOPS 混合物的代表性色谱图,
每个注射的硝基氧的量为 250pg. 在 250nm 检测硝基氧.
流速为 0.6ml/min, C18 柱, 80%CAN 在水中

在水解之前和之后的 DETOPS:EPRT 信号在水或辛醇中的分配

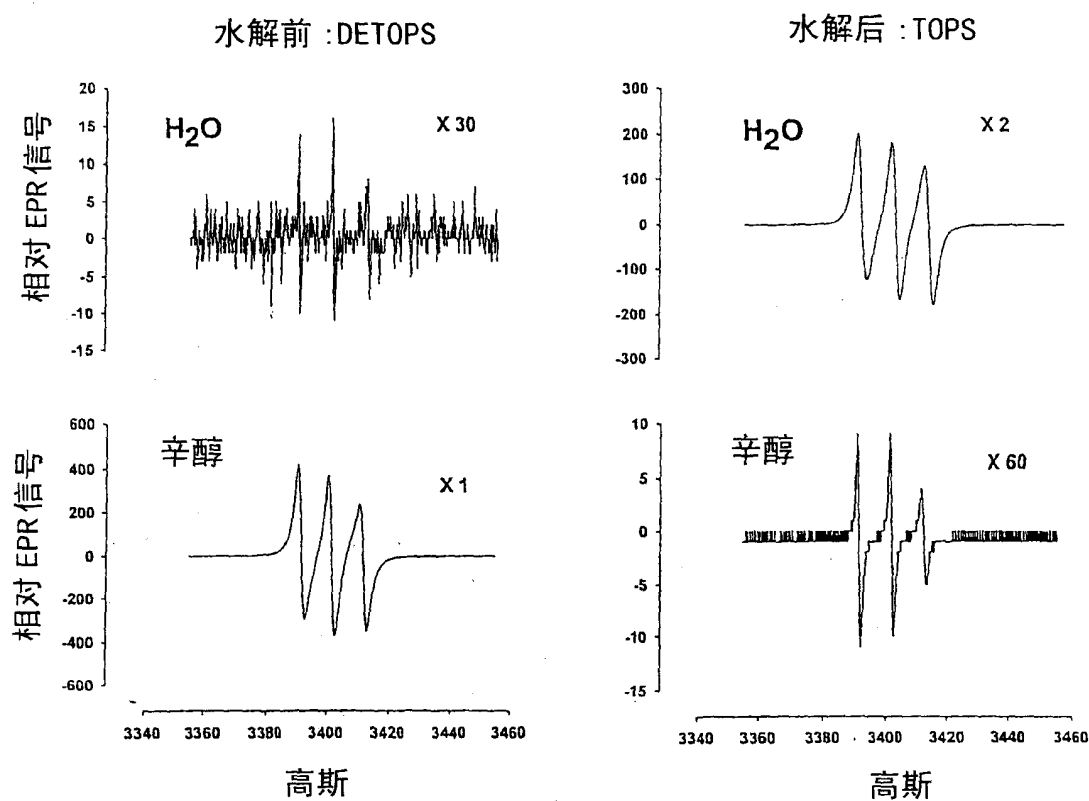


图 15. 在水解之前和之后 DETOPS在水和辛醇之间的分配
使用 Varian E9 EPR分光光度计测量 40 μ l 水或辛醇样品
关于仪器装置参见以上方法。

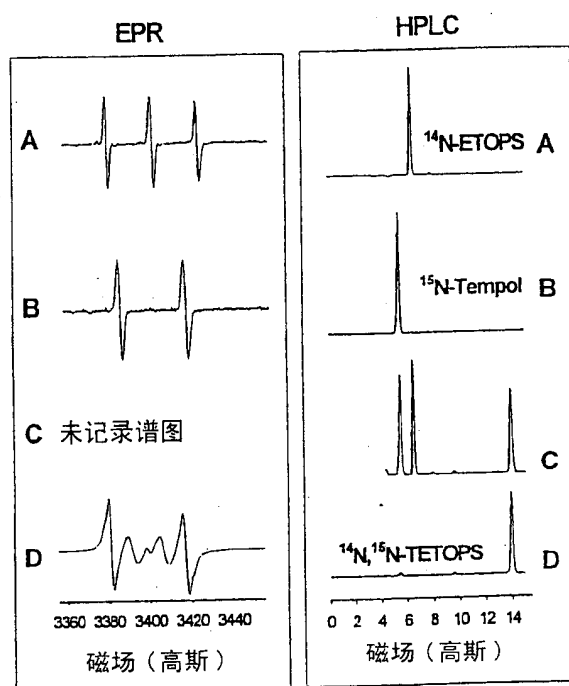


图 16. 通过 EPR (左图) 和 HPLC (右图) 鉴定 TE-TOPS: A) 反应前的 ^{14}N -ETOPS, B) 反应前的 ^{15}N -TEMPOL, C) 反应后 3 小时和 D) 反应后 8 小时
HPLC 条件为 HPLC 柱 (Vydac C18), 流动相含有 0.05%TFA 的水中 75% 的乙腈, 流速 0.6ml/min, 在 250nm 检测。

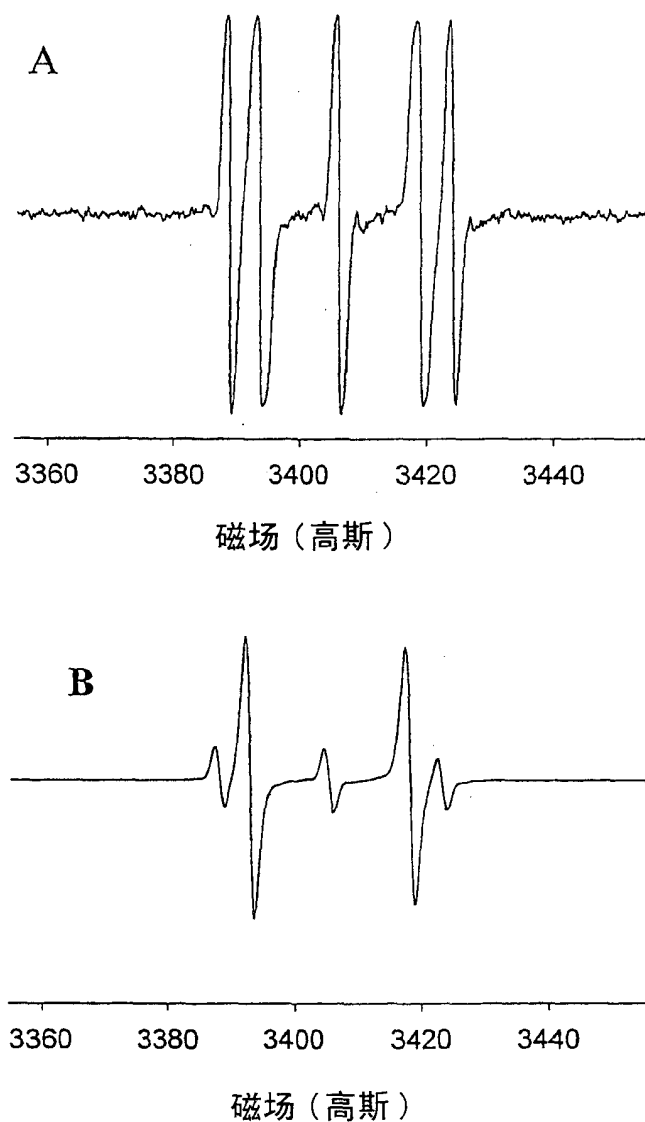


图 17 TE-TOPS 水解 (A) 在体外通过 5mM KOH (B) 体内通过 i. p. 在尿样中。
¹⁵N Tempol 与 ¹⁴N E-TOPS 反应形成 TE-TOP, 其产生如图 16D 左图所示宽 EPR 谱,
在通过 KOH 或通过身体酯酶水解后观察到尖锐的双峰和尖锐的三重峰
的混合, 其意味者酯键的水解。

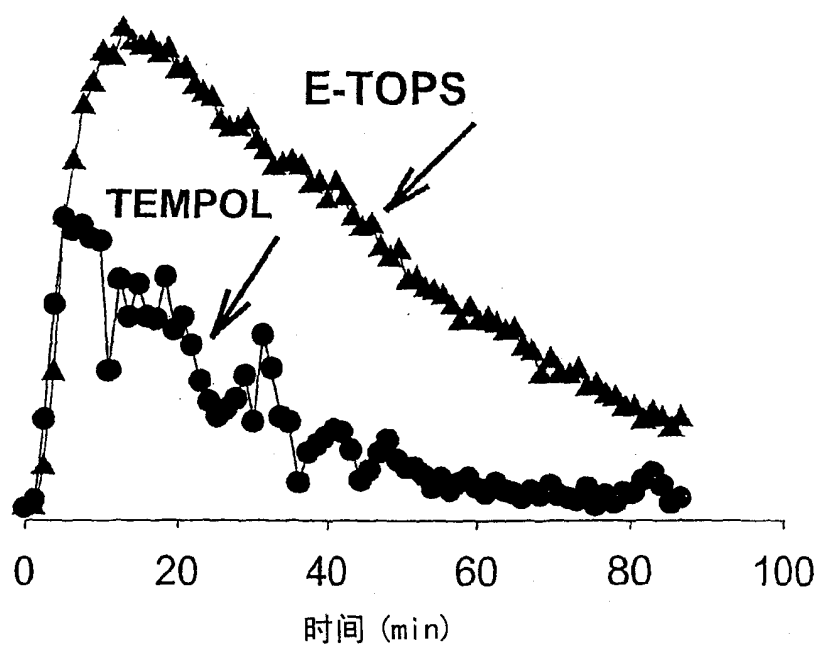


图 18 当将通过 EPR 测定的 ^{15}N Tempol 与 ^{14}N E-TOPS i.p. 共同注射时，
在小鼠尾巴中测量的血浆半衰期

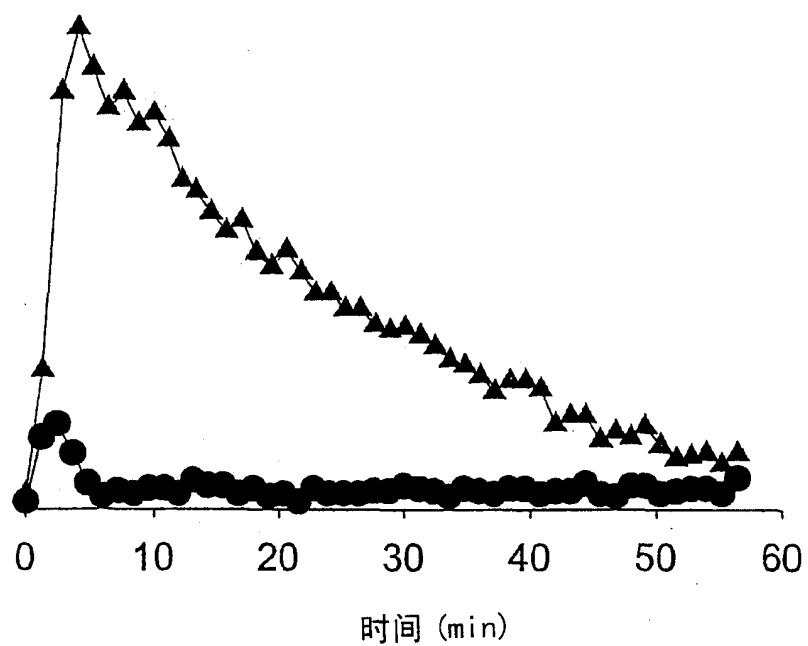


图 19 当将通过 EPR 测定的 ^{15}N -Tempol 和 ^{14}N -E-TOPS 静脉内共同注射时在小鼠尾巴中测量的血浆半衰期。

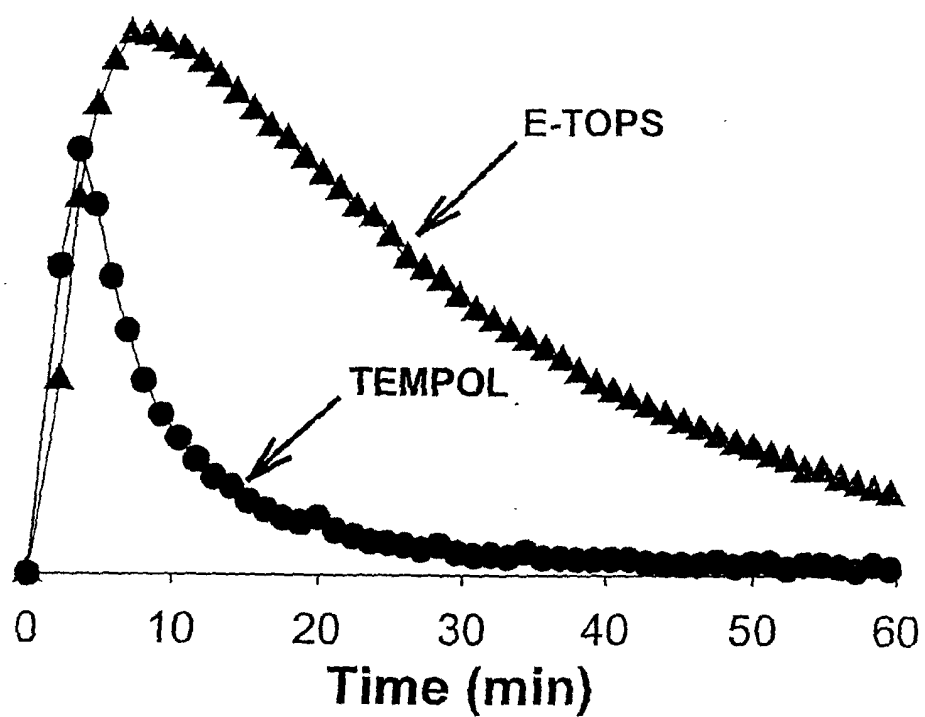
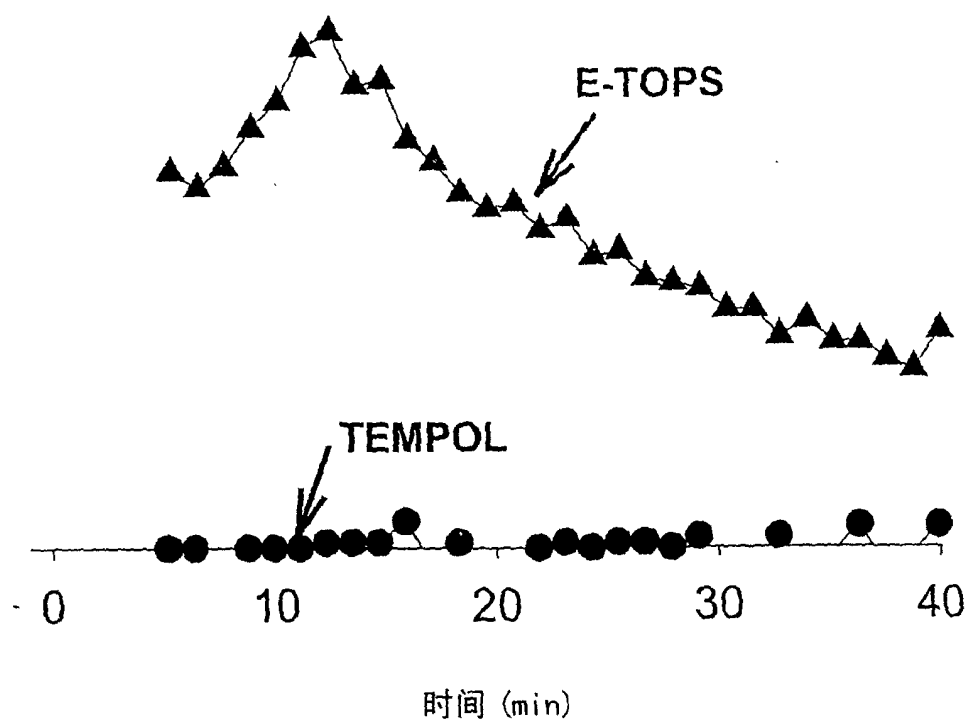


图 20 当将通过 EPR 测定的 ^{15}N -Tempol 与 ^{14}N -E-TOPS 肌肉共同注射时在小鼠尾巴中测量的血浆半衰期。



当将通过 EPR 测定的 ^{15}N -Tempol 与 ^{14}N -E-TOPS 经口共同注射时在小鼠尾巴中测量的血浆半衰期。

图 21

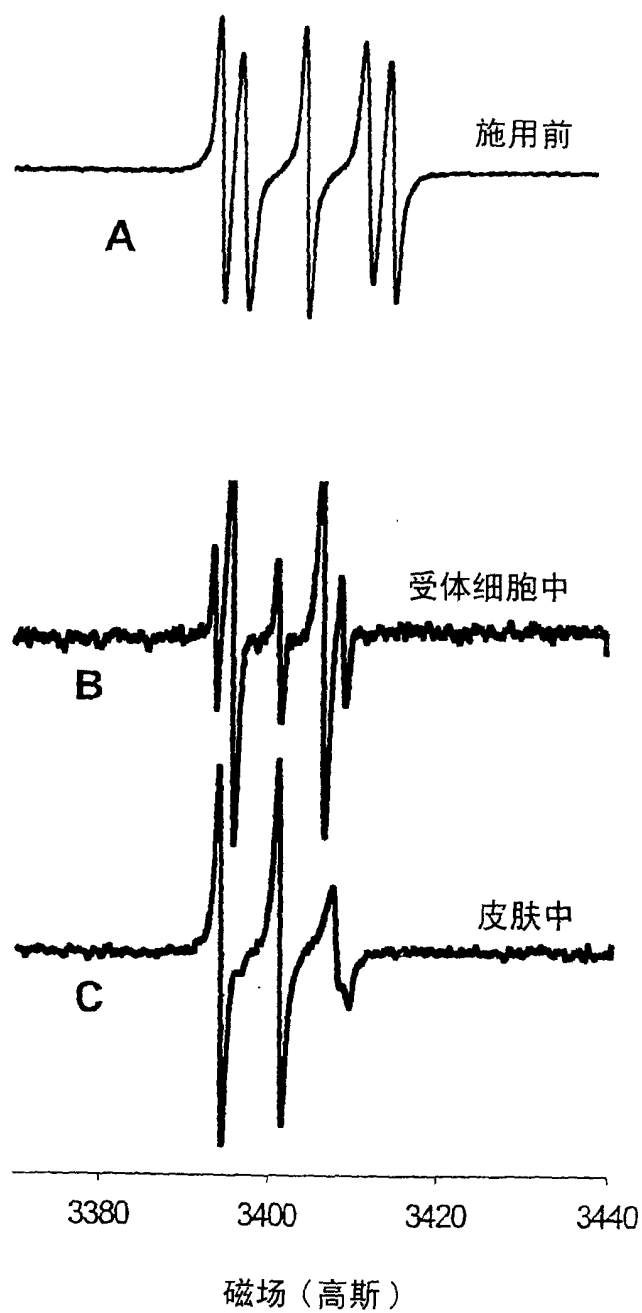


图 22

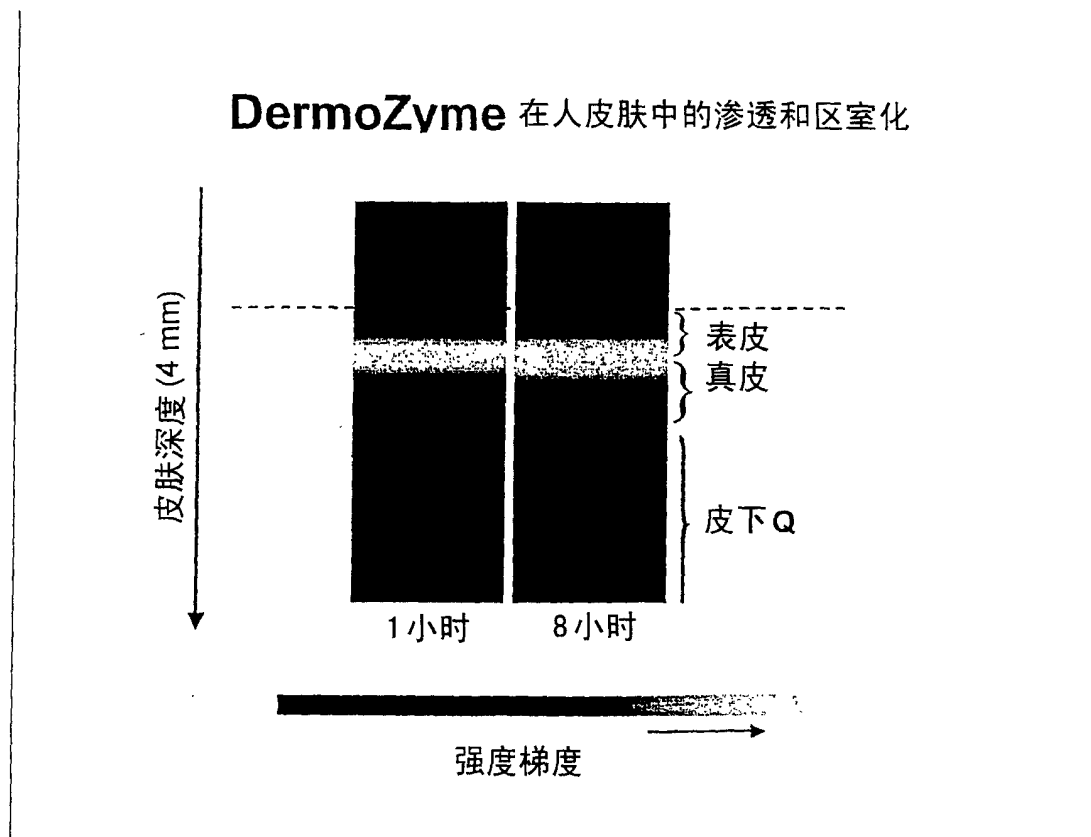


图 23

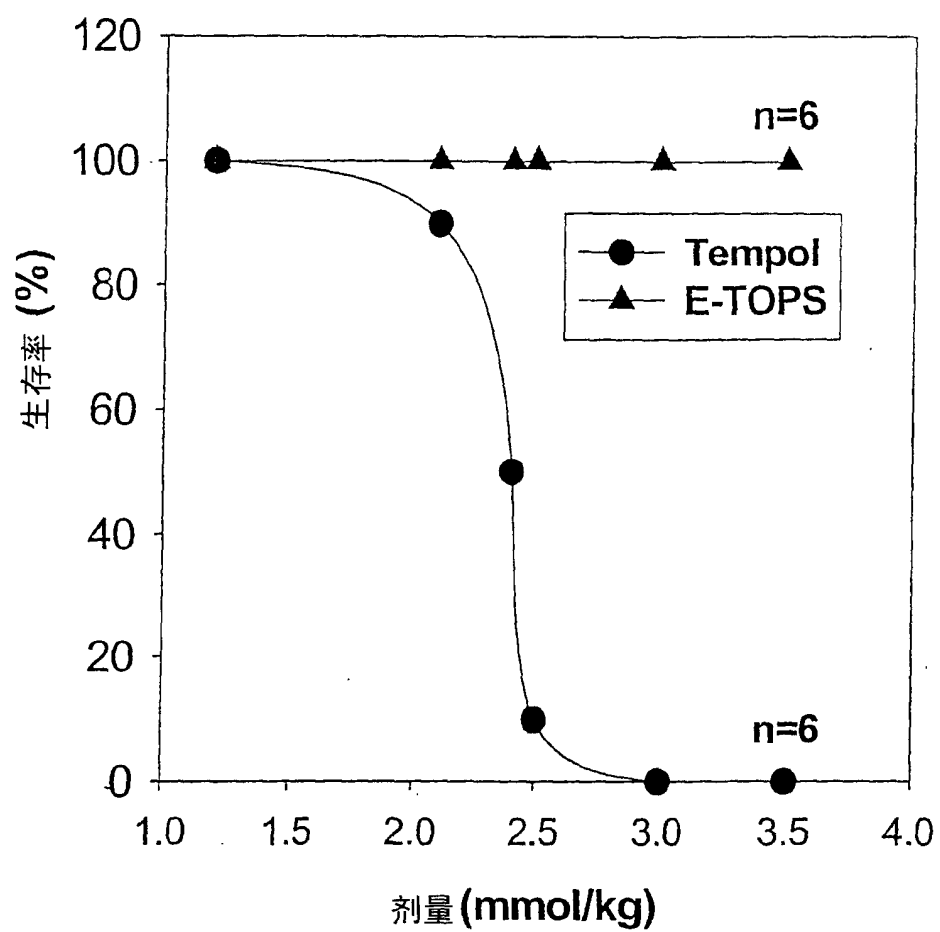


图 24

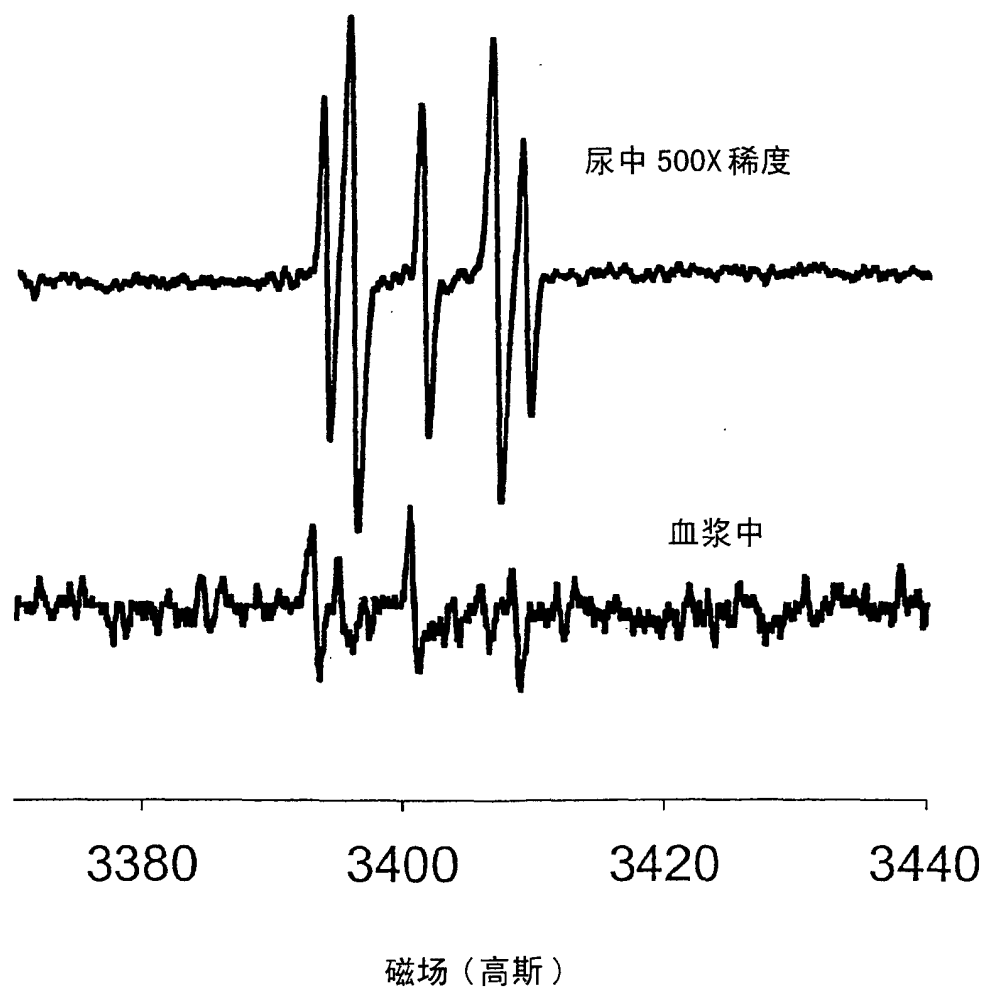


图 25

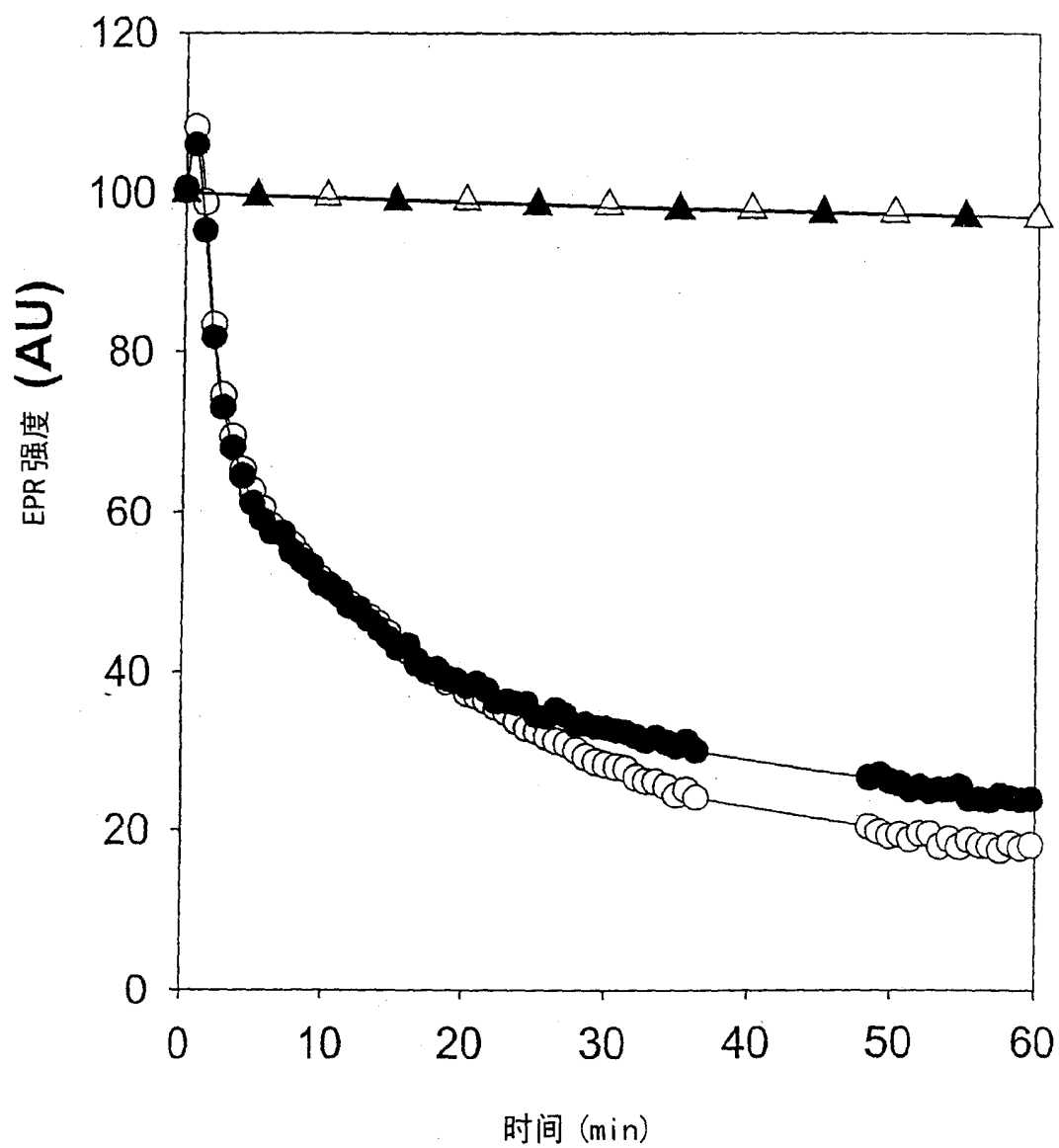


图 26

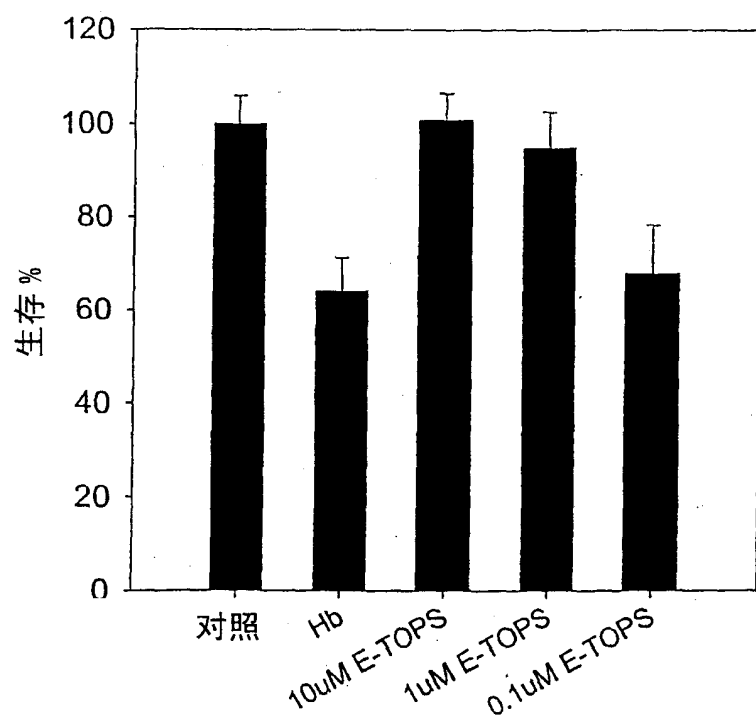


图 27

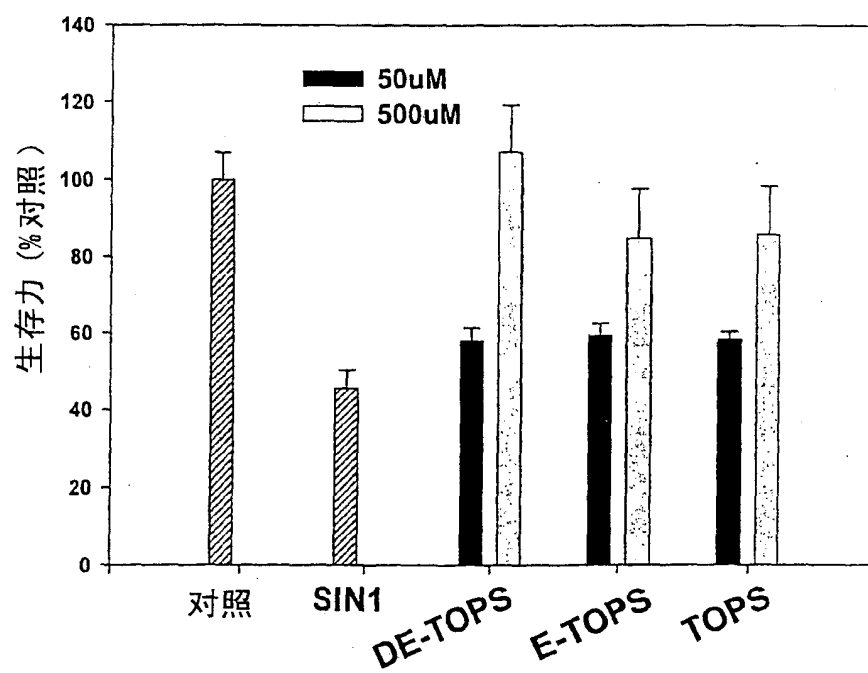


图 28

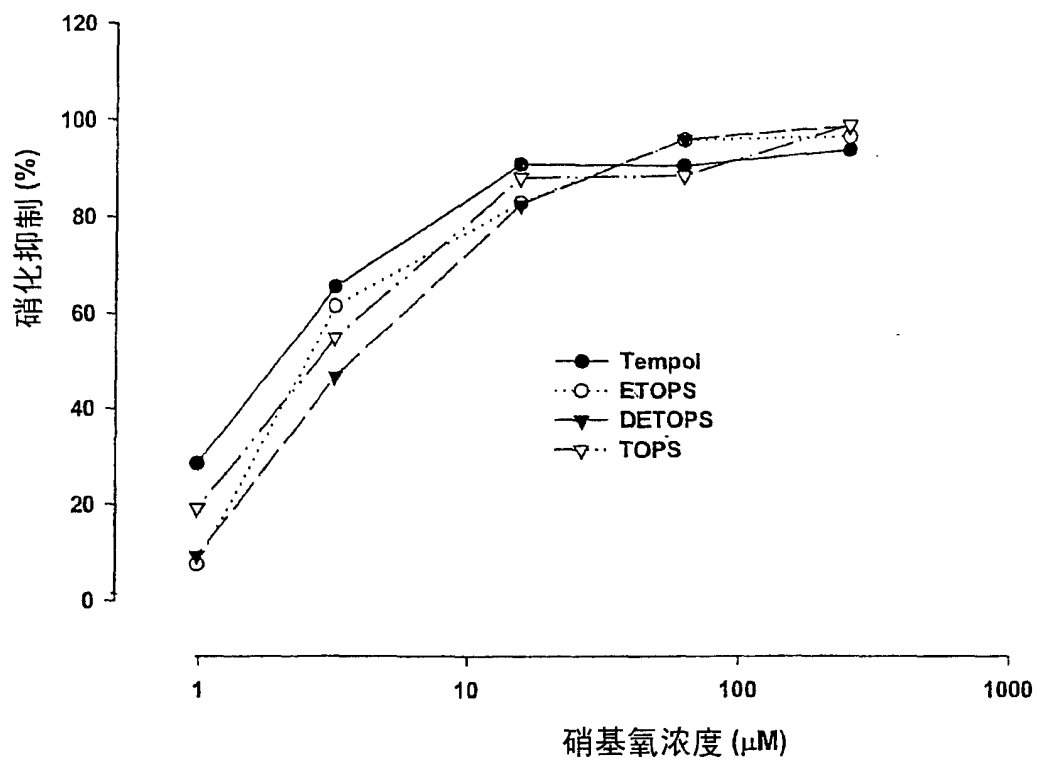


图 29

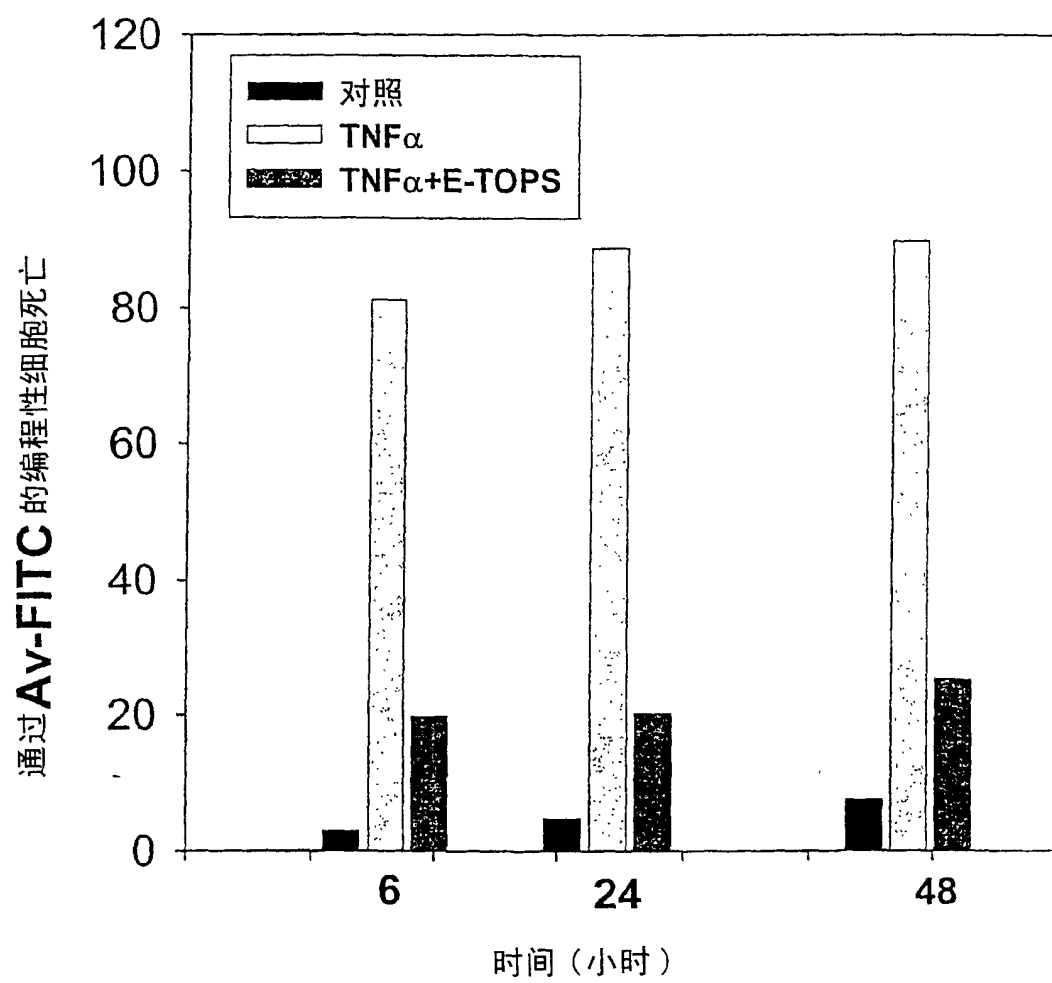


图 30

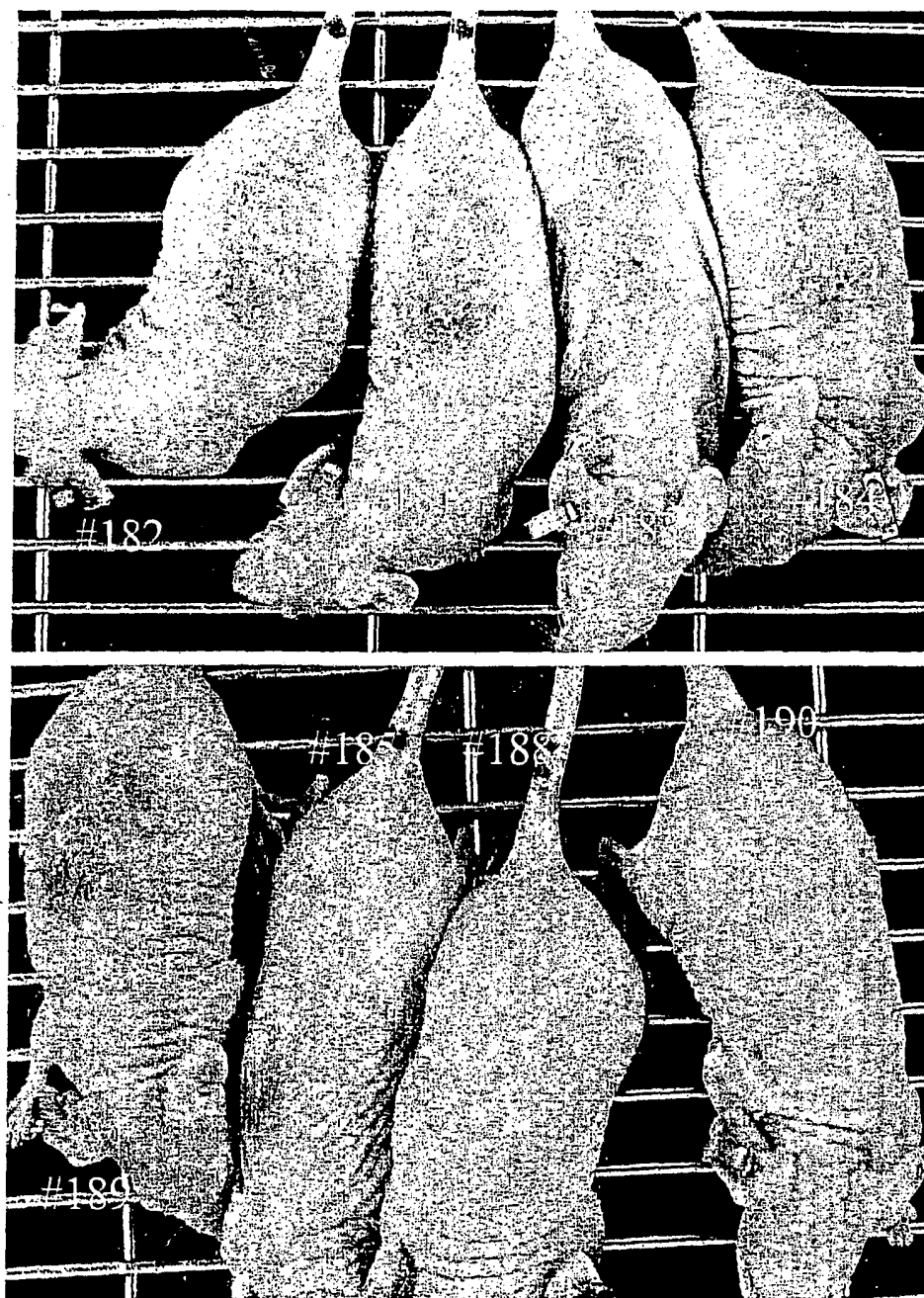


图 31

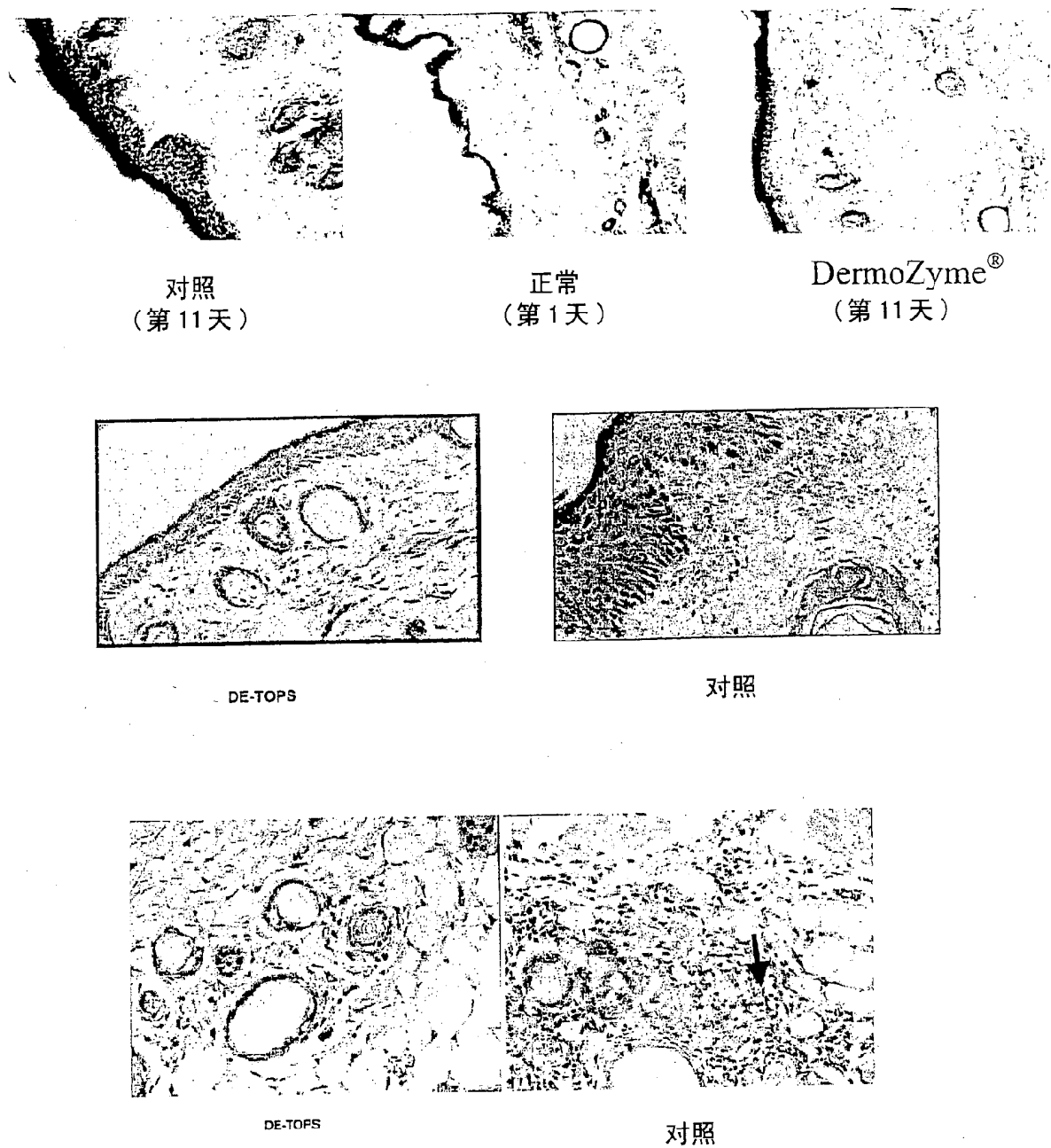


图 32

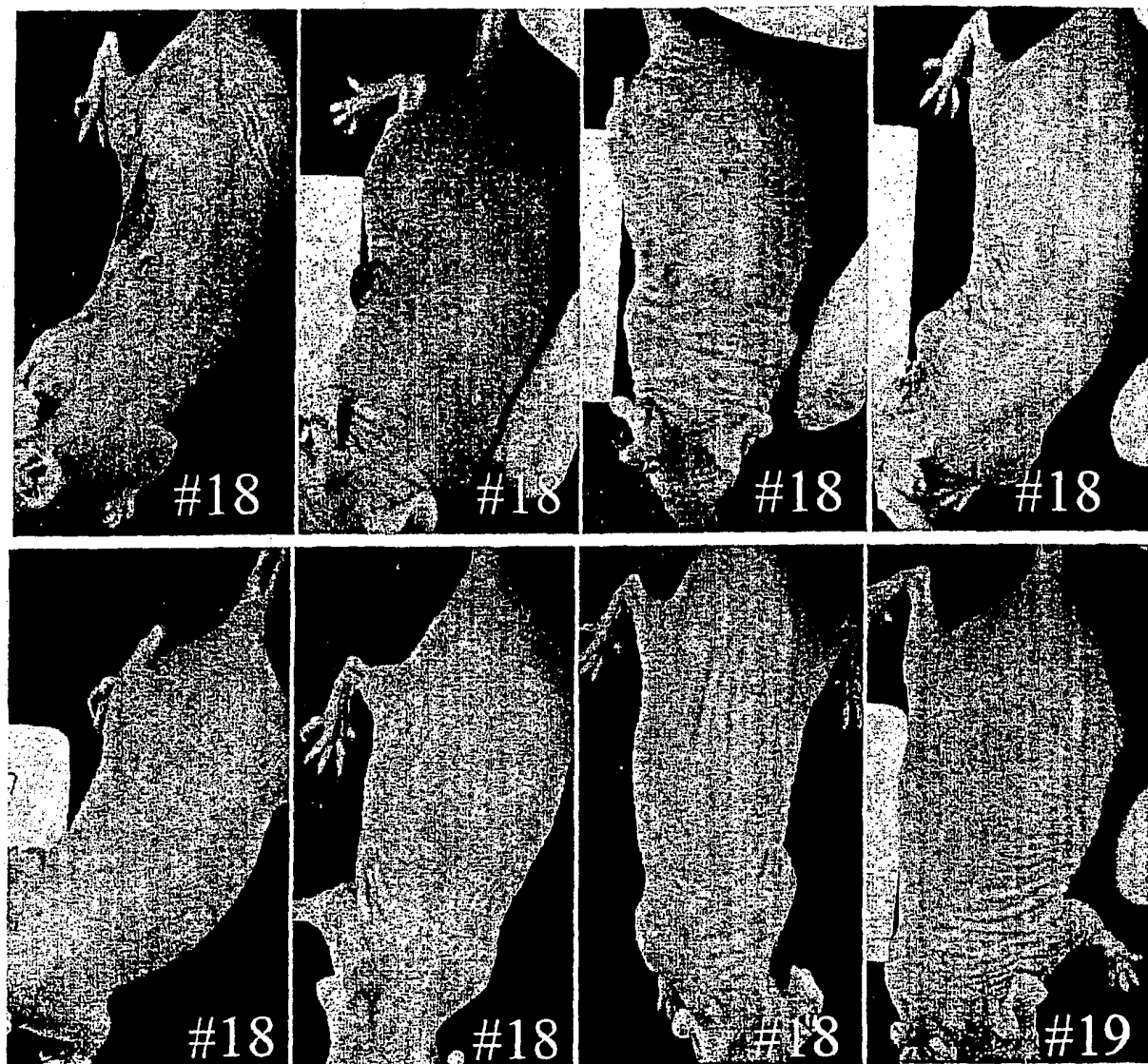
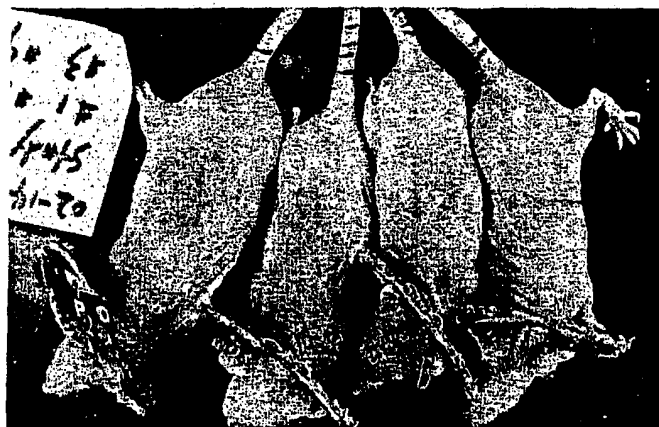


图 33

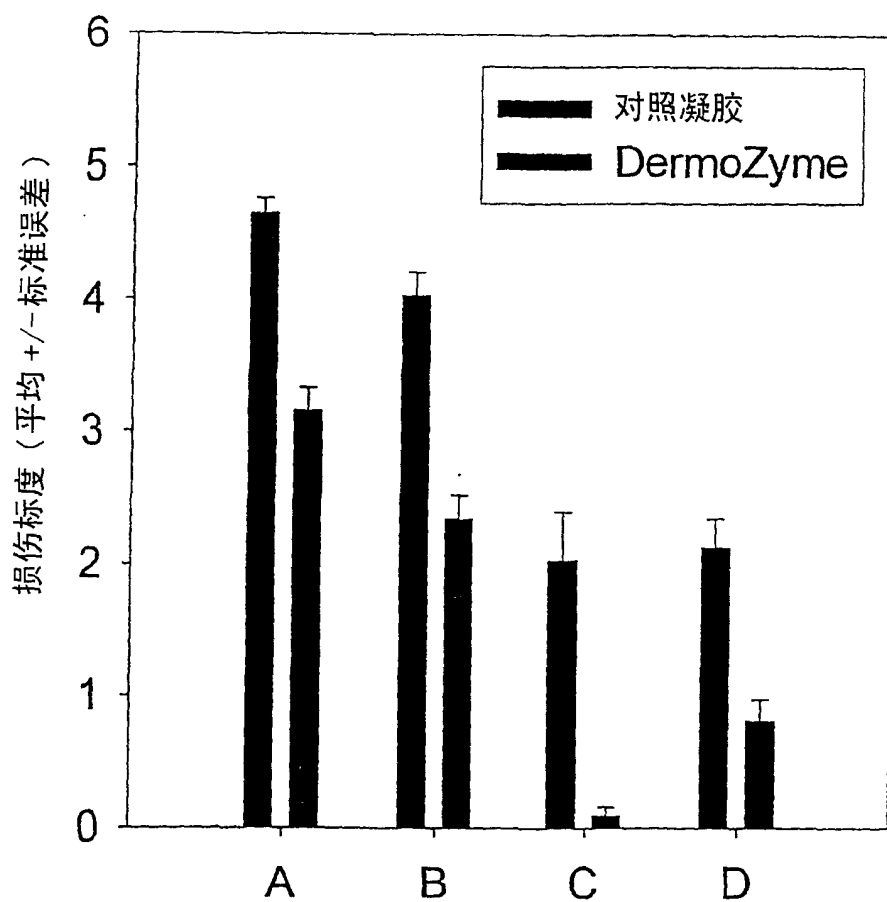


DE-TOPS 处理的
组在第 8 天



对照凝胶处理的组
在第 8 天

图 34



A: 表皮增厚
(正常为标度 1)
B: 表皮增厚
(正常为标度 1)
C: 出血
(正常为标度 0)
D: 炎症
(正常为标度 0)

在所有组中 $P < 0.0001$

(t 检验)

N(动物)=每组 4 只

N(样品) 每种动物 8 个

图 35

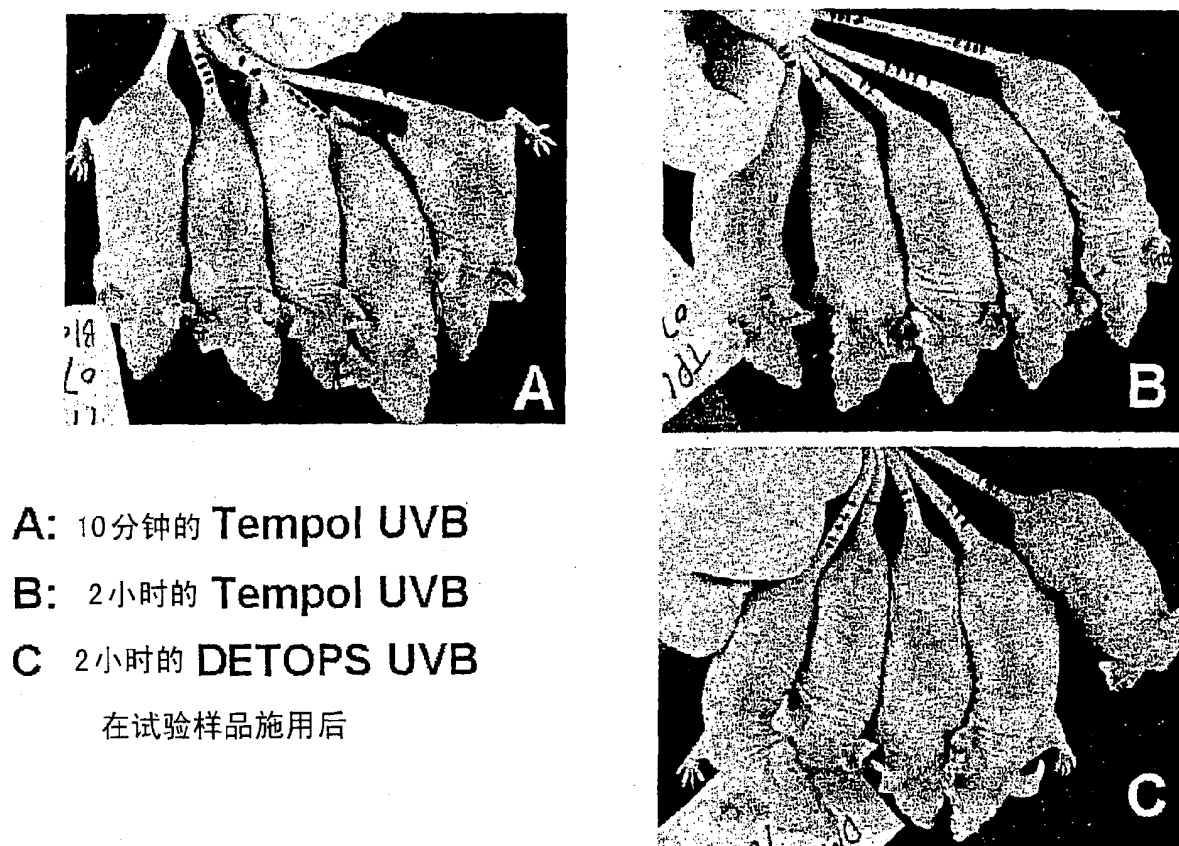


图 36



图 37