

# **Diazen-1-ium-1,2-diolate als NO-Donoren**

-

**Zusammenhänge zwischen Struktur, Bildung und  
NO-Freisetzung sowie die Umsetzung zu bioaktiven  
Prodrugs und Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen**



---

seit 1558

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2007

von Jörg Konter

geboren am 24.02.1978 in Leverkusen



# **Diazen-1-ium-1,2-diolate als NO-Donoren**

-

**Zusammenhänge zwischen Struktur, Bildung und  
NO-Freisetzung sowie die Umsetzung zu bioaktiven  
Prodrugs und Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen**



---

seit 1558

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2007

von Jörg Konter

geboren am 24.02.1978 in Leverkusen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann
2. Prof. Dr. Gerhard Scriba
3. Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein

Tag der Doktorprüfung:

Tag der öffentlichen Verteidigung:

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2003 bis August 2007 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller Universität Jena durchgeführt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jochen Lehmann danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine wertvollen Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft und seine große Einsatzbereitschaft unvergessliche Erfahrungen, wie der NO-Konferenz in Monterey, zu ermöglichen.

Herrn Prof. Dr. Gerhard Scriba und Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Für die große Kooperationsbereitschaft und erfolgreiche Zusammenarbeit danke ich Frau Dr. Möllmann und ihren Mitarbeitern, Herrn Sven Winter und Herrn Prof. Dr. Alfred Fahr, Herrn Andreas König und Frau Prof. Dr. Erika Glusa sowie Herrn Michael Rothenburger.

Bedanken möchte ich mich bei allen Kollegen und Freunden des Instituts für die unkomplizierte Zusammenarbeit, offene Hilfsbereitschaft und gemeinsame Zeit in Jena. Frau Carolin Roegler danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, Helga und Wolfgang Konter, die mich während meiner gesamten schulischen und universitären Ausbildung vielfältig unterstützt haben.

---

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Biochemische und physiologische Bedeutung des NO</b>	<b>1</b>
1.1.1	Stickstoffoxide und reaktive Stickstoffspezies (RNS)	1
1.1.2	Zelluläre Angriffspunkte und die physiologischen und pathologischen Funktionen der RNS	3
<b>1.2</b>	<b>NO-Donoren: Übersicht und chemische Charakteristika</b>	<b>7</b>
1.2.1	Organische Nitrate	7
1.2.2	Nitroprussid-Natrium	8
1.2.3	Sydnonimine	8
1.2.4	S-Nitrosothiole	9
1.2.5	Diazen-1-ium-1,2-diolate (NONOate)	10
1.2.6	Sonstige NO-Donoren	15
<b>1.3</b>	<b>Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid</b>	<b>16</b>
1.3.1	Griess Reaktion	16
1.3.2	Oxyhämoglobin Assay	16
1.3.3	Elektronenspin Resonanz- und Laser Magnet Resonanz Spektroskopie	16
1.3.4	Chemilumineszenzdetektion	17
1.3.5	Amperometrische NO-Detektion	17
<b>1.4</b>	<b>Charakterisierung des Azol-Antimykotikums Ketoconazol</b>	<b>18</b>
1.4.1	Allgemeine Eigenschaften von Ketoconazol	18
1.4.2	Pharmakologie von Ketoconazol	19
<b>1.5</b>	<b>Problemstellung und Ziele</b>	<b>19</b>
1.5.1	Chemische Aspekte	19
1.5.2	Biologische Aspekte	22
<b>2</b>	<b><u>Übersicht zu den Veröffentlichungen</u></b>	<b>23</b>

---

<b>3</b>	<b><u>Veröffentlichungen</u></b>	<b>26</b>
	<b>Veröffentlichung 1</b>	<b>26</b>
	<b>The NOTizer- A Device for the Convenient Preparation of Diazen-1-ium-1,2-diolates.</b> <i>Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din Ali Ahmed Hassan; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. Methods in Enzymology (2005), 396 (Nitric Oxide, Part E), 17-26.</i>	
	<b>Veröffentlichung 2</b>	<b>37</b>
	<b>Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Monitored by the "NOTizer" Apparatus: Relationship between Formation Rates, Molecular Structure and the Release of Nitric Oxide.</b> <i>Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din A. A.; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. European Journal of Organic Chemistry (2007), 4, 616-624.</i>	
	<b>Veröffentlichung 3</b>	<b>47</b>
	<b>NO Donors, part 17: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs and Corresponding Nitric Oxide Donors.</b> <i>Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. Journal of Medicinal Chemistry. In Vorbereitung.</i>	
	<b>Veröffentlichung 4</b>	<b>64</b>
	<b>Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate.</b> <i>Koenig, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Joerg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. Journal of Cardiovascular Pharmacology (2007), 50, 68-74.</i>	
	<b>Veröffentlichung 5</b>	<b>72</b>
	<b>Permeability changes in response to NONOate and NONOate prodrug derived nitric oxide in a blood-brain barrier model formed by primary porcine endothelial cells.</b> <i>Winter, Sven; Konter, Joerg; Scheler, Stefan; Lehmann, Jochen; Fahr, Alfred. Nitric Oxide. Eingereicht (2007).</i>	
	<b>Veröffentlichung 6 (Patentschrift)</b>	<b>90</b>
	<b>Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkstoffe.</b> <i>Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. Eingereicht beim Deutschen Patent- und Markenamt (25.07.2007).</i>	

---

<b>4.</b>	<b><u>Bisher unveröffentlichte Ergebnisse</u></b>	<b>110</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemische Aspekte</b>	<b>110</b>
4.1.1	Beobachtung der NONOat-Synthese mit dem NOTizer	110
4.1.2	HPLC Untersuchungen der NONOate	117
4.1.3	Synthese von Diazen-1-ium-1,2-diolat Prodrugs	119
<b>4.2</b>	<b>Biologische Aktivität einiger synthetisierter NO-Donoren</b>	<b>122</b>
4.2.1	Vasodilatation <i>in vitro</i>	122
4.2.2	Neuroregenerative Eigenschaften von DETA/NO und Et-BUPIPERAZI/NO <i>in vivo</i>	124
<b>5.</b>	<b><u>Gesamtdiskussion</u></b>	<b>126</b>
<b>5.1</b>	<b>Bewertung der NOTizer<sup>®</sup>-Apparatur für die Synthese von Diazen-1-ium-1,2-diolaten</b>	<b>126</b>
5.1.1	Vorteile der NOTizer <sup>®</sup> -Apparatur und der erarbeiteten Methode	126
5.1.2	Nachteile der NOTizer <sup>®</sup> -Apparatur und der erarbeiteten Methode	127
<b>5.2</b>	<b>Untersuchungen zur Bildung und zum Zerfall von Diazen-1-ium-1,2-diolaten</b>	<b>127</b>
5.2.1	Bildung von Diazen-1-ium-1,2-diolaten	127
5.2.2	Zerfall von Diazen-1-ium-1,2-diolaten	129
5.2.3	Zusammenhang zwischen molekularer Struktur des Amins, NONOat-Bildung und NO-Freisetzung	130
<b>5.3</b>	<b>Identitäts und Reinheitsuntersuchungen der Diazen-1-ium-1,2-diolat-Prodrugs und Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen</b>	<b>133</b>
5.3.1	Et-BUPIPERAZI/NO	133
5.3.2	Ketoconazol-Nitratopivalinsäure Hybridverbindung	134
<b>5.4</b>	<b>Antimikrobielle Eigenschaften der Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen - Diskussion möglicher Targets, Unterschiede im Wirkspektrum und Ursachen des Synergismus</b>	<b>135</b>
5.4.1	Mikrobielle zelluläre Targets für NO und andere RNS	136
5.4.2	Mögliche Ursachen der Unterschiede im Wirkspektrum und des Synergismus	136



<b>5.5</b>	<b>Struktur-Wirkungsbeziehung bei Diazen-1-ium-1,2-diolaten</b>	<b>138</b>
5.5.1	Vasodilatorische Effekte	138
5.5.2	Einfluss auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke	139
5.5.3	Neuroregenerative Eigenschaften und Verringerung des Photothrombosevolumens	139
<b>6.</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>141</b>
6.1	Chemische Aspekte	141
6.2	Biologische Aspekte	143
<b>7.</b>	<b><u>Conclusion</u></b>	<b>145</b>
<b>8.</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	
<b>9.</b>	<b><u>Anhang</u></b>	
	Curriculum vitae	
	Publikationsverzeichnis	
	Selbstständigkeitserklärung	

## 1 Einleitung

Die in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts überraschende und zugleich aufregende Entdeckung der physiologischen und pathologischen Bedeutung des Stickstoffmonoxid ( $\text{NO}$ ; Stickoxid) fand ihren bisherigen Höhepunkt mit der Verleihung des Nobelpreises für Physiologie und Medizin an die drei Pioniere der NO-Forschung Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad im Jahre 1998. Das vor seiner Identifizierung nur als "endothelium derived relaxing factor" (EDRF) bezeichnete Stickoxidradikal wurde seit dieser Zeit als einer der wichtigsten physiologischen Botenstoffe in den verschiedensten Bereichen der Medizin und Biologie erkannt. Schon 1992 wurde das  $\text{NO}$ -Radikal von der Fachzeitschrift *Science* als das "Molecule of the Year" bezeichnet.

In diesem einleitenden Kapitel werden die biochemischen Grundlagen sowie die physiologische und pathologische Rolle des  $\text{NO}$  zusammengefasst und eine Übersicht und Einteilung der wichtigsten NO-Donoren dargestellt. Es folgt ein Überblick über analytische Nachweisverfahren von  $\text{NO}$ , eine Charakterisierung des Antimykotikums Ketoconazol und abschließend die Problemstellung dieser Arbeit.

### 1.1 Biochemische und physiologische Bedeutung des NO

#### 1.1.1 Stickstoffoxide und reaktive Stickstoffspezies (RNS)

Eines der wichtigsten Charakteristika des NO sind seine unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten. Man muss deutlich unterscheiden, besonders wenn es sich um NO-Donoren handelt, welche Redoxform des NO vorliegt bzw. freigesetzt wird:  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}^+$  oder  $\text{NO}^-$ . Jede dieser Spezies kann unter dem allgemeinen Begriff "NO" verstanden werden und alle weisen ein unterschiedliches Reaktionsverhalten auf. Insbesondere die Folgeprodukte dieser NO-Spezies haben wiederum eigene Eigenschaften und vor allem eine bedeutende pathologische oder physiologische Relevanz, wie zum Beispiel das Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) oder die Nitrosothiole (R-SNO). Molekularer Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ), das Superoxidanion-Radikal ( $\text{O}_2^-$ ) sowie einige Übergangsmetalle und Spurenelemente (M) sind die Hauptreaktionspartner für die NO-Spezies, um weitere reaktive Stickstoffspezies (RNS; reactive nitrogen species) wie  $\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2$  oder  $\text{ONOO}^-$  zu bilden.<sup>[1,2]</sup> Die genauen Funktionen dieser Verbindungen werden im folgenden Unterkapitel (1.1.2) im Einzelnen erläutert. Abbildung 1 und Tabelle 1 stellen die biologisch relevanten Stickoxide und die dazugehörigen Reaktionsschemata dar.<sup>[3,4]</sup>

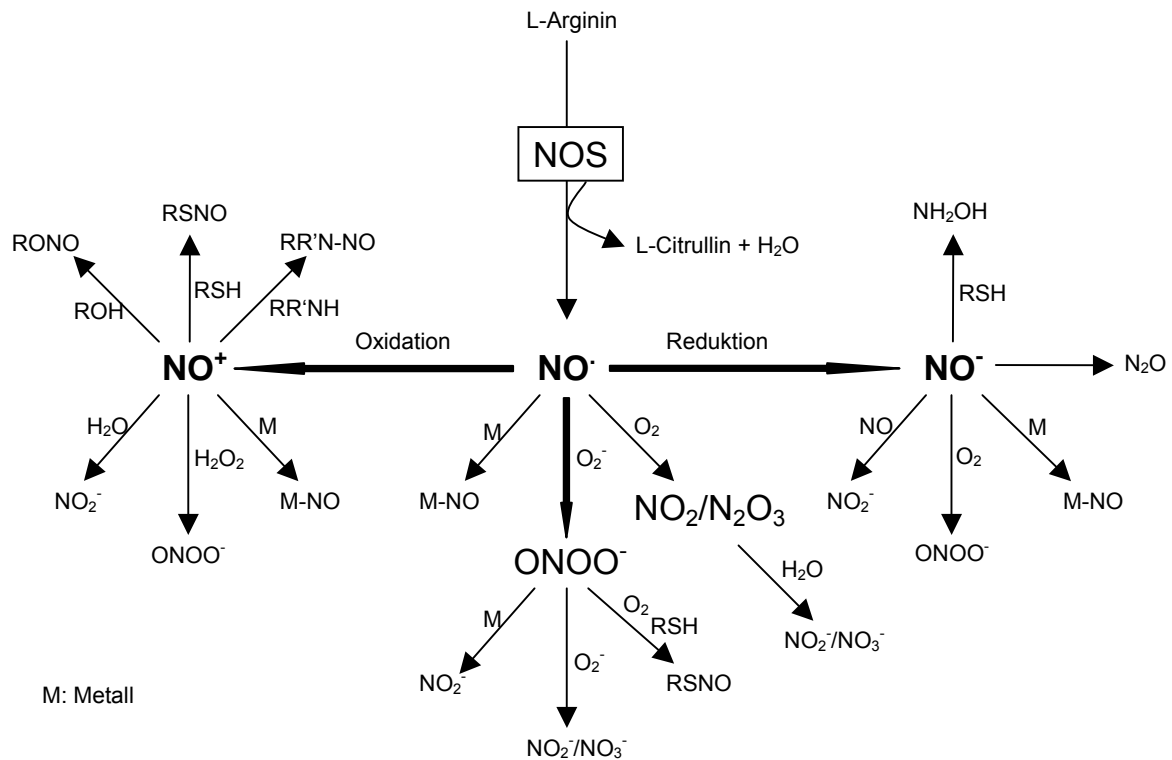


Abb. 1 Reaktionen der reaktiven Stickstoffspezies

Endogenes NO wird, katalysiert durch die NO-Synthasen (eNOS, nNOS, iNOS), aus der Aminosäure L-Arginin gewonnen, wobei neben dem NO-Radikal noch L-Citrullin und Wasser als Nebenprodukte entstehen. Wie Abbildung 1 deutlich zeigt, sind die durch das NO verursachten physiologischen Veränderungen das Gesamtergebnis eines multifaktoriellen Prozesses. Trotzdem müssen die Oxidationsprodukte  $\text{NO}_2$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  und insbesondere das  $\text{ONOO}^-$  als die wichtigsten RNS herausgestellt werden. Es ist nicht verwunderlich, dass gerade diese RNS äußerst schnell gebildet werden, da es sich bei dem Superoxidanion, dem molekularen Sauerstoff, wie auch ihrem jeweiligen Reaktionspartner, dem Stickstoffmonoxid, um Radikale handelt. Das  $\text{O}_2^-$  Radikal ist ein ubiquitär vorkommendes Stoffwechselnebenprodukt aus der Reduktion von  $\text{O}_2$  durch NADPH-Oxidasen und der endothelialen Xanthinoxidase.<sup>[5,6]</sup> Ein weiteres mögliches Oxidationsprodukt des NO ist das Nitrosyl Kation ( $\text{NO}^+$ ), welches schnell nukleophile Bindungspartner wie Thiole oder Amine zu Nitrosothiolen und Nitrosaminen nitrosyliert.<sup>[7,8]</sup>

Tab. 1 Biologisch relevante Stickoxide und ihre Oxidationsstufen

Summenformel	Name	Oxidationsstufe des N-Atoms
NO <sup>-</sup>	Nitroxyl Anion	+1
N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid (Lachgas)	+1 (0 und +2)
NO <sup>•</sup>	Stickstoffmonoxid	+2
NO <sup>+</sup>	Nitrosyl (Nitrosonium) Kation	+3
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit	+3
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Distickstofftrioxid (Salpetrige Säure Anhydrid)	+3 (+2 und +4)
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid	+4
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit	+5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat	+5
NH <sub>2</sub> OH	Hydroxylamin	-1
RR'N-NO	Nitrosamin	+2
RS-NO	Nitrosothiol	+3

Durch Reduktion des NO<sup>•</sup> entsteht das Nitroxyl Anion (NO<sup>-</sup>), welches isoelektronisch zum O<sub>2</sub> ist und somit ebenfalls als Triplett-NO<sup>-</sup> (gleicher Spin der Elektronen in den antibindenden π<sub>y</sub><sup>\*</sup>-/ π<sub>z</sub><sup>\*</sup> Orbitalen) oder Singulett-NO<sup>-</sup> (entgegengesetzter Spin) auftreten kann. Das stabilere Triplett-NO<sup>-</sup> kann durch O<sub>2</sub> zu Peroxynitrit oxidiert werden, während das wesentlich energiereichere Singulett-NO<sup>-</sup> überwiegend zu Hydroxylamin reduziert wird, beispielsweise durch freie Thiol-Gruppen. Die Hauptkonkurrenzreaktion ist die Umsetzung des NO<sup>•</sup> zum N<sub>2</sub>O.<sup>[9]</sup> Die biologischen Hauptmetabolite der RNS sind Nitrat und Nitrit, die renal ausgeschieden werden.<sup>[10]</sup>

Die oben beschriebenen Stoffwechselwege verdeutlichen, dass im Hinblick auf NO-Donoren nicht allein das NO<sup>•</sup>, sondern ebenso gut seine Folgeprodukte die entscheidenden Faktoren für einen physiologischen Effekt sein können. Abschließend sei darauf hingewiesen, dass sich in der Literatur die Kurzform "NO" für das damit gemeinte Radikal NO<sup>•</sup> durchgesetzt hat.

### 1.1.2 Zelluläre Angriffspunkte und die physiologischen und pathologischen Funktionen der RNS

Eines der bedeutendsten Merkmale des NO<sup>•</sup> in Bezug auf seine physiologische Funktion ist die extrem hohe Affinität zu Häm-Proteinen, die fester Bestandteil vieler Enzyme, wie der löslichen Guanylatcyclase (sGC), der Cyclooxygenase und der Cytochromen, ist.<sup>[11]</sup>

Für die Aktivierung der sGC in glatten Gefäßmuskelzellen bindet das aus dem Endothel stammende NO (gebildet durch die eNOS) an das zentrale Eisen Atom der prosthetischen Häm-Gruppe und löst dort eine bis zu 400-fache Aktivitätssteigerung für die Umsetzung von GTP zu cGMP aus.<sup>[12]</sup> Das cGMP wiederum aktiviert eine Proteinkinase der Gefäßmuskelzelle (PKG II), die durch Phosphorylierung verschiedener Membranproteine (u. a. VASP, IRAG, Phospholamban) des sarkoplasmatischen Retikulums eine Absenkung der freien intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Ionen Konzentration

und folglich eine **Relaxation der Gefäßmuskulatur** bewirkt.<sup>[13]</sup> Das von der cGMP abhängigen Proteinkinase phosphorylierte VASP (vasodilator stimulated phosphoprotein) wird unter anderen auch in Thrombozyten exprimiert.<sup>[14]</sup> Hier verhindert das phosphorylierte VASP die Aktivierung des Fibrinogen Rezeptors und von Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , wodurch die **thrombozytenaggregationshemmende Wirkung** des NO zu erklären ist.<sup>[15]</sup> Neben den Proteinkinasen werden außerdem Phosphodiesterasen (PDE) von cGMP reguliert, wie z.B. die durch cGMP inhibierbare PDE II in Kardiomyozyten von Säugerherzen. Ein erhöhter cGMP Spiegel löst hier eine **negativ inotrope Wirkung** aus.<sup>[16]</sup> In glatten Gefäßmuskelzellen wird durch die cGMP abhängige Hemmung der PDE III eine **antiproliferative Wirkung** entfaltet, die wiederum **atherosklerotischen Veränderungen entgegenwirkt**.<sup>[17,18]</sup> Eine Reihe von cGMP abhängigen Ionenkanälen, die vor allem den Einstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - Ionen durch Membranen regulieren, spielen eine große Rolle bei der **Verarbeitung von Signalen in Nervengewebe**.<sup>[19]</sup> Zur Aufklärung solcher NO/cGMP vermittelten Effekte werden häufig Inhibitoren der löslichen Guanylatcyclase verwendet, wie zum Beispiel der selektive Inhibitor ODQ oder das etwas unspezifischere Methylenblau.<sup>[20]</sup> Beide Inhibitoren oxidieren das Häm-Eisen der sGC, wobei das Methylenblau zusätzlich als "NO scavenger" fungiert, indem es durch  $\text{O}_2^-$  Bildung die Bioverfügbarkeit des NO drastisch reduziert.<sup>[21-23]</sup> Ob Methylenblau zusätzlich auch die Aktivität der NO-Synthasen hemmt, ist noch umstritten.<sup>[24]</sup>

Eine sehr häufig auftretende NO-bedingte Proteinmodulation ist die S-Nitrosylierung (RS-NO) cysteinhaltiger Proteine. Eine solche Modulation wird beispielsweise für NMDA-Rezeptoren im ZNS diskutiert, wodurch die Rolle von NO an **Lern- und Gedächtnisprozessen** sowie der **Schmerzwahrnehmung** zu erklären ist.<sup>[25-27]</sup> Die S-Nitrosylierung und dadurch gleichzeitige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 bewirkt die Expression anti-apoptotischer Faktoren und somit eine **zytoprotektive Wirkung** in ausgewählten Geweben.<sup>[28]</sup> Neben der Nitrosylierung finden Nitrierungen (RS-NO<sub>2</sub>) durch aus Peroxynitrit gebildetem Stickstoffdioxid (siehe Abb.1) sowie Sulfhydryl-Oxidationen (RS-H zu RS-SR) statt.<sup>[29-32]</sup> Solche Thiol-Gruppen-Modifikationen sind besonders ausgeprägt in der Familie der Cysteinproteasen, welche proteolytische Enzyme nicht nur im menschlichen Organismus, aber auch im Pflanzen- und Tierreich, sowie einen wichtigen Bestandteil vieler Mikroorganismen darstellen. So übernehmen beispielsweise Cathepsine und Caspasen entscheidende Funktionen in antigenpräsentierenden Zellen, der Aktivierung von Zytokinen und der T-Zell-Aktivierung, womit die Rolle der RNS bei der **Immunabwehr** deutlich wird.<sup>[33-36]</sup> Ebenso sind solche Cysteinproteasen direkt an der Reproduktion vieler Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten beteiligt.<sup>[37]</sup> Aktivierte Makrophagen produzieren NO $\cdot$  als einen wichtigen Verteidigungsmechanismus gegen Tumorzellen, indem es die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien vermittelt und letztendlich die **Apoptose der entarteten Zellen** einleitet.<sup>[38,39]</sup>

Ein weiteres Angriffsziel für RNS sind Nukleinsäuren, wobei durch elektrophile Substitution Nitroverbindungen der Purin- und Pyrimidinbasen entstehen.<sup>[40,41]</sup> Die durch N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> verursachte Desaminierung von Aminosäuren in Proteinen und Peptiden kann ebenso gut in der DNA auftreten, insbesondere an den Pyrimidinbasen. Inwiefern diese genotoxischen "Mutationen" und Strangbrüche *in vivo* eine Rolle spielen ist umstritten. Schon *in vitro* ist eine unphysiologisch hohe Konzentration der entsprechenden RNS nötig um diese Reaktionen zu ermöglichen.<sup>[42]</sup> Vor allem muss man beachten,

dass *in vivo* zahlreiche Abwehrmechanismen bestehen, wie z.B. Antioxidantien, die die RNS "abfangen" bevor sie überhaupt an die DNA/RNA gelangen können.<sup>[43]</sup>

Äußerst komplex sind die Reaktionen der RNS mit Lipiden. Das  $\text{NO}^\bullet$  und die daraus gebildeten RNS sind in der Lage eine Lipidoxidation zu stimulieren, ebenso aber auch zu hemmen.<sup>[10]</sup> Welcher der beiden gegensätzlichen Mechanismen eintritt ist abhängig von (1) der Konzentration an  $\text{NO}^\bullet$ ; (2) der Konzentration an reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), (3) der Anwesenheit von Antioxidantien wie z.B. Vitamin E, und (4) den Reaktionsraten der beteiligten Spezies in Bezug auf das Milieu in dem sie sich befinden.<sup>[44,45]</sup> Abbildung 2 verdeutlicht die Mechanismen der Lipidoxidation.

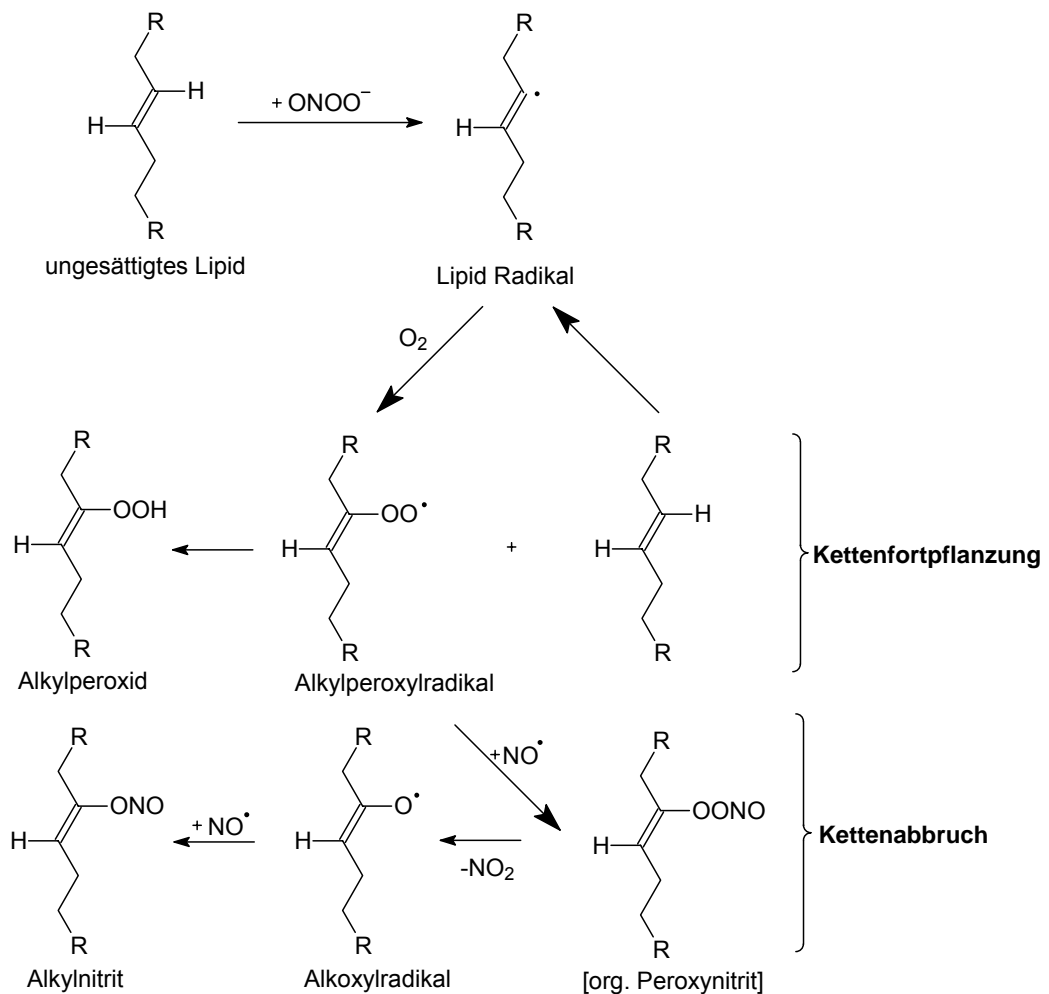
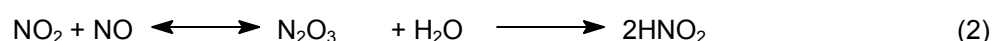


Abb. 2 Mechanismen der Peroxid- und Organonitritbildung bei ungesättigten Lipiden

Ein **pro-oxidativer Prozess an Lipiden** tritt auf, wenn eine mindestens gleich große Konzentration an  $\text{O}_2^-$  im Vergleich zum  $\text{NO}^\bullet$  vorhanden ist, da diese extrem schnell hochoxidatives Peroxynitrit bilden, welches dann schließlich ungesättigte Lipide oxidiert.<sup>[46]</sup> Die so entstehenden Lipid-peroxyradikale wiederum oxidieren ungesättigte Lipide und es entsteht eine Kettenreaktion, die immer mehr Lipide oxidieren lässt. Der **anti-oxidative Prozess** tritt ein, wenn die Konzentration an  $\text{NO}^\bullet$  überwiegt.<sup>[47]</sup> Der Überschuss an  $\text{NO}^\bullet$  Radikalen bewirkt einen Kettenabbruch der Reaktion indem sie mit den Lipid-peroxyradikalen intermediär ein instabiles organisches Peroxynitrit bildet, das sofort in das

entsprechende Alkoxyradikal ( $\text{RO}\cdot$ ) und  $\text{NO}_2$  zerfällt. Ein zweites  $\text{NO}\cdot$  Molekül setzt sich dann mit dem  $\text{RO}\cdot$  zum Alkylnitrit ( $\text{RNO}_2$ ) um.<sup>[10]</sup> Die in Abb. 2 dargestellte Oxidation der Lipide durch Peroxynitrit kann auch von einigen ROS, wie dem hochreaktiven Hydroxylradikal ( $\text{OH}\cdot$ ) initiiert werden. Ein Überschuss an  $\text{NO}\cdot$  spielt so **oxidativem Stress entgegen**. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Kombination von  $\alpha$ -Tocopherol/ $\text{NO}\cdot$  effektiver gegen oxidative Prozesse schützt als die Kombination  $\alpha$ -Tocopherol/Ascorbinsäure.<sup>[48]</sup> Diese antioxidative Wirkung des  $\text{NO}\cdot$  ist von sehr großer Bedeutung in der **Repression der Arteriosklerose**, nicht nur weil durch den Kettenabbruch die Entstehung oxidierter LDL Partikel unterdrückt wird, sondern insbesondere weil die Organonitrit-Gruppen tragenden LDL Partikel ( $\text{NO}_2$ -LDL) verstärkt von Makrophagen aufgenommen werden.<sup>[49,50]</sup> Die Interaktionen von  $\text{NO}\cdot$  im Eicosanoidstoffwechsel, sei es durch direkte Reaktionen mit den ungesättigten Kohlenstoffgerüsten oder durch Modulation der Arachidonsäure verstoffwechselnden Enzyme (Cyclooxygenase, Lipoxygenasen, Cytochrom 450), zeigen vielseitige Auswirkungen, wie beispielsweise die Hemmung der Thrombozytenaggregation.<sup>[10]</sup> Über die durch RNS hervorgerufenen Veränderungen an Zellmembranlipiden und ihre physiologische Bedeutung ist noch nicht sehr viel bekannt. Sicher ist, dass nicht nur strukturelle Modifikationen an den Membranlipiden selbst Signalkaskaden in Gang setzen, sondern auch, dass das gebildete Lipidradikal eine wichtige Bindungsstelle für Proteine darstellt.<sup>[51]</sup> Dieses Charakteristikum der Lipide, auch nicht-membranständige Proteine an die Zelloberfläche zu binden, wird von führenden Membranproteomik Forschungsgruppen als ein bedeutender Bestandteil zukünftiger Forschung gesehen.<sup>[52]</sup>

Ähnlich wie beim oxidativen Stress, kann ein Ungleichgewicht der RNS zu Ungunsten der physiologischen Abläufe ein komplexes pathologisches Bild entstehen lassen. Diese als **nitrosativer Stress** bezeichnete Entgleisung des Stoffwechsels geht in erster Linie von der aus  $\text{NO}\cdot$  und  $\text{O}_2$  gebildeten RNS  $\text{N}_2\text{O}_3$  aus.<sup>[51]</sup> Gleichung 1 und 2 stellen den genauen Zusammenhang der beteiligten RNS dar.<sup>[53]</sup>



Das Ausmaß des nitrosativen Stresses ist besonders abhängig von der  $\text{NO}\cdot$  Konzentration. Es muss ständig eine ausreichende Menge an  $\text{N}_2\text{O}_3$  gebildet werden um die S-Nitrosylierung von Thiolen, Desaminierung primärer Amine und die Nitrosaminbildung aus sekundären Aminen aufrecht erhalten zu können. In wässrigen Medien beträgt die Halbwertszeit der  $\text{N}_2\text{O}_3$  Hydrolyse etwa 1 ms.<sup>[54]</sup> Der Hauptort der RNS Bildung aus  $\text{NO}\cdot$  und  $\text{O}_2$  sind daher hydrophobe Medien, wie z.B. zwischen Phospholipiden. Die Konzentration dieser beiden Gase kann in Membranlipiden 5 bis 50 mal höher sein als im Intra- oder Extrazellulärraum.<sup>[55]</sup> Bekannt ist, dass bei inflammatorischer Aktivität die iNOS (induzierte NO-Synthase) lokal begrenzt große Mengen  $\text{NO}\cdot$  freisetzt. Ob die Expression der iNOS bei Erkrankungen wie Colitis, Morbus Crohn, Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Psoriasis, Alzheimer, Parkinson oder Krebs ein Teil des pathologischen Geschehens oder eine Immunantwort darstellt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Vergleicht man die vielseitigen Effekte des  $\text{NO}$  und der anderen RNS, so stellt man fest, dass häufig scheinbar Widersprüche bestehen. Zum Beispiel ist  $\text{NO}\cdot$  einmal zytotoxisch, in anderen

Zusammenhängen wieder zytoprotektiv, oder, wie oben erwähnt, zugleich oxidativ und antioxidativ. Diese Ambivalenz lässt sich dadurch erklären, dass alle vom NO ausgehenden Effekte zum einen von der Art des Gewebes abhängt, vor allem aber auch von der Menge des dort auftretenden NO<sup>•</sup>. Wesentlich ist auch, ob oder wie viel der für die Produktion der übrigen RNS benötigten Reaktionspartner, wie z.B. der ROS, vorhanden sind.

## 1.2 NO-Donoren: Übersicht und chemische Charakteristika

### 1.2.1 Organische Nitrate

Aus chemischer Sicht handelt es sich bei den organischen Nitraten um Ester der Salpetersäure. Der in diesem Zusammenhang häufig verwendete Begriff "NO Donor" ist nicht ideal, da der Nitrat Stickstoff von seiner Oxidationsstufe +V reduziert werden muss, um das zweiwertige NO<sup>•</sup> freisetzen zu können. Ob dies zur Auslösung eines biologischen Effektes zwingend notwendig ist, wird kontrovers diskutiert. Zudem ist der genaue Bioaktivierungsmechanismus der Nitrate noch immer Gegenstand der Forschung, da jedoch die biologische Aktivität der organischen Nitrate in den meisten Fällen dem des NO<sup>•</sup> sehr ähnlich ist, ist der Begriff "NO-Mimetika" angebrachter. Die auf dem Markt erhältlichen organischen Nitrate sind (siehe Abb. 3):

- Pentaerythryltetranitrat (PETN) mit vier Nitratgruppen
- Glyceroltrinitrat (GTN) mit drei Nitratgruppen
- Isosorbiddinitrat (ISDN) mit zwei Nitratgruppen
- Isosorbid-5-mononitrat (ISMN) mit einer Nitratgruppe

wobei die pharmakodynamische Potenz, unter Ausschluss pharmakokinetischer Parameter, in dieser Reihenfolge abnimmt.<sup>[56]</sup>

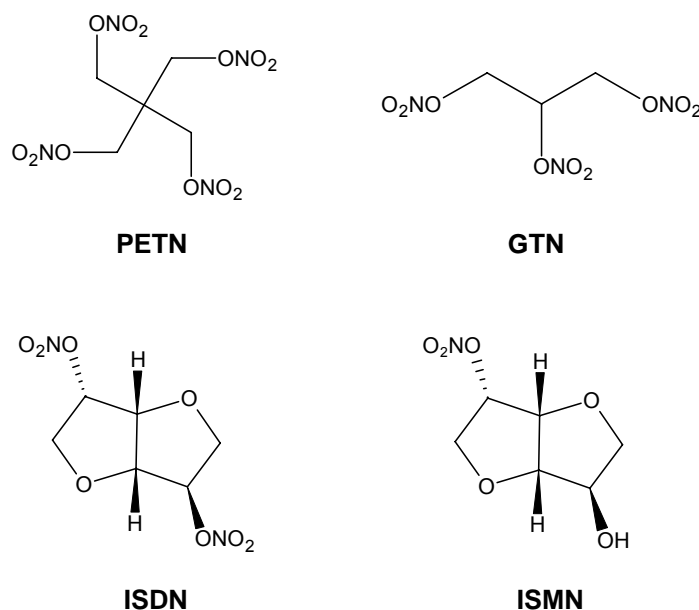


Abb. 3 Therapeutisch eingesetzte organische Nitrate



Für die biologische Aktivierung der organischen Nitrate sind die Glutathion-S-transferase, Cytochrom P-450-abhängige Systeme, Xanthin-Oxidoreduktase und die mitochondriale Aldehyddehydrogenase (ALDH-2) im Gespräch.<sup>[57-60]</sup> Das einzige therapeutisch genutzte Nitrat, das *in vivo* praktisch keine Tachyphylaxie ("Nitratoleranz") zeigt, ist das PETN.<sup>[61]</sup> Der häufig auftretende "Nitratkopfschmerz" ist beim PETN ebenfalls deutlich seltener beschrieben als bei den übrigen Nitraten.<sup>[62]</sup> Die genauen Gründe für diese Phänomene sind nach wie vor Gegenstand der aktuellen Forschung.

Die noch vor einigen Jahren eingesetzten organischen Nitrite, wie z.B. Amylnitrit, sind wegen ihrer kurzen Halbwertszeit und einem schlechten Nutzen-Risiko Verhältnis heute nicht mehr im Gebrauch. Auf dem Schwarzmarkt werden diese Nitrite noch missbräuchlich unter dem Szenenamen "Poppers" angeboten.

### 1.2.2 Nitroprussid-Natrium

Dieser Eisen-Nitrosyl-Komplex mit der Summenformel  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$  wird aufgrund seiner extrem hohen blutdrucksenkenden Wirkung im arteriellen- und venösen Strombett ausschließlich in der Intensivmedizin als intravenöse Darreichungsform genutzt. Nitroprussid-Na muss in erster Linie als  $\text{NO}^+$ -Donor (Oxidationsstufe +III) bezeichnet werden, da es eines Reduktionsmittels wie z.B. Cystein, Glutathion, Ascorbat bedarf, um die RNS  $\text{NO}^\cdot$  mit der Oxidationsstufe +II vorliegen zu haben.<sup>[63]</sup> Der genaue Mechanismus der Stickstoffmonoxid Freisetzung ist bislang nur unvollständig geklärt.

### 1.2.3 Sydnonimine

Molsidomin ist ein Prodrug, das im Organismus durch enzymatische Abspaltung des Ethoxycarbonyl-Restes den Metaboliten Linsidomin (SIN-1) bildet. Durch nichtenzymatische Ringöffnung bildet sich zunächst das ringoffene Nitrosohydrazin (SIN-1A), welches dann das  $\text{NO}^\cdot$  freisetzt.<sup>[64]</sup> Bei Molsidomin tritt keine Toleranzentwicklung auf, vermutlich weil eine Reduktion der RNS nicht notwendig ist.<sup>[65]</sup> Aus diesem Grund wird SIN-1 häufig als biologisches "Tool" für die Erforschung  $\text{NO}^\cdot$  abhängiger Prozesse verwendet. Dabei ist jedoch zu beachten, dass der Zerfall dieser Sydnonimine ebenfalls das Superoxidanion  $\cdot\text{O}_2^-$  produziert, welches mit  $\text{NO}^\cdot$  die RNS Peroxynitrit bildet.<sup>[66]</sup> Daher handelt es sich bei diesen Verbindungen streng genommen um  $\text{ONOO}^-$ - wie auch  $\text{NO}^\cdot$ -Donoren.

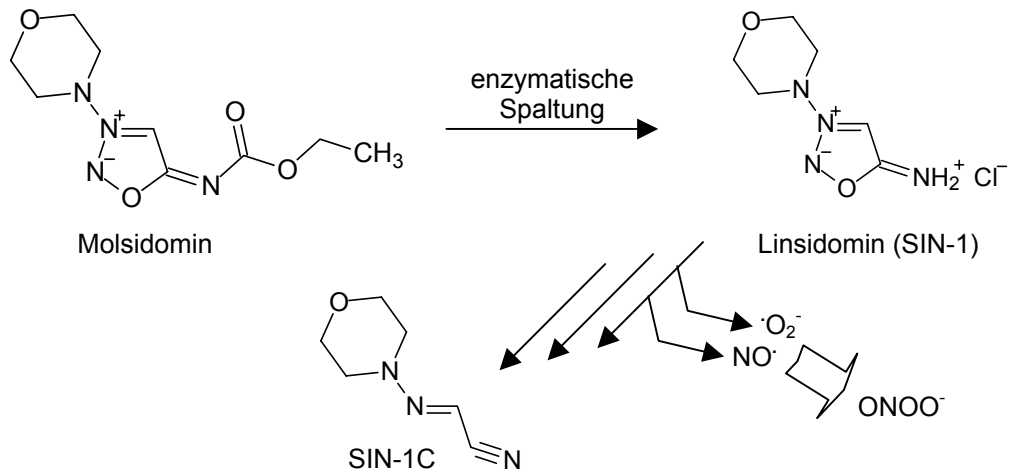
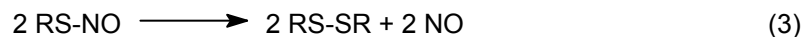


Abb. 4 Zerfall von Molsidomin<sup>[66]</sup> (vereinfacht)

Therapeutisch wird Molsidomin häufig eingesetzt um die nächtliche Nitratpause im Rahmen einer Angina Pectoris Prophylaxe zu überbrücken.

#### 1.2.4 S-Nitrosothiole

Diese NO-Donoren entstehen durch Nitrosierung primärer, sekundärer oder tertiärer Thiole mit NO<sup>+</sup> bzw. Nitrit, wobei die Stabilität der Produkte in dieser Reihenfolge zunimmt. Nasschemisch erfolgt die Synthese durch die Zugabe von NaNO<sub>2</sub> oder Alkylnitriten zum entsprechenden Thiol in saurem Medium.<sup>[67]</sup> Es handelt sich bei dieser Substanzgruppe in erster Linie um nitrosierende NO<sup>+</sup>-Donoren. Andererseits kann aber der dreiwertige Stickstoff des Nitrosothiols durch oxidative Disulfidbildung auch zum zweiwertigen NO· reduziert werden (Gleichung 3).



Der bekannteste und in Studien häufig verwendete Vertreter der S-Nitrosothiole ist das sterisch stabilisierte S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (SNAP; Abb. 5).

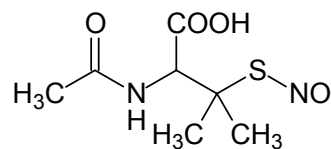


Abb. 5 S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin (SNAP)

Die physiologische Rolle natürlicher S-Nitrosothiole als "NO-carrier" ist bereits bekannt. Stickstoffmonoxid ist durch seine kurze Halbwertszeit (HWZ) unter physiologischen Bedingungen auf

die Stabilisierung durch niedermolekulare Peptide angewiesen.<sup>[68]</sup> Es konnte ebenso schon gezeigt werden, dass  $\text{NO}^\cdot$  auf unterschiedliche Thiol-Gruppen tragende Moleküle übertragen werden kann um einen Weitertransport zu gewährleisten.<sup>[69]</sup> Deshalb wird als EDRF nicht nur das  $\text{NO}^\cdot$  allein, sondern auch seine Transportform S-Nitrosothiol angesehen.

### 1.2.5 Diazen-1-ium-1,2-diolate (NONOate)

Die aus medizinisch-chemischer Sicht wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind die an sekundäre Amine gebundenen Diazen-1-ium-1,2-diolate (kurz Diazeniumdiolate, NONOate, "solid  $\text{NO}^\cdot$ "), da nur diese in der Lage sind spontan und direkt 2 mol  $\text{NO}^\cdot$  aus einem mol NONOat freizusetzen, im Gegensatz zu den an C-, O- oder S-Atome verknüpften NONOate. Wie die Abbildung 6 darstellt, können die Diazeniumdiolate als Salze vorliegen oder am  $\text{O}^2$ -Atom kovalent an einen Rest gebunden sein. Im Allgemeinen wird dann von einem NONOat Prodrug gesprochen, da für die  $\text{NO}$  Liberation eine biologische oder chemische Aktivierung nötig ist. Es sei angemerkt, dass es sich schon bei den NONOaten selbst um Prodrugs handelt, da das freigesetzte  $\text{NO}^\cdot$  das pharmakophore Element darstellt und somit die am  $\text{O}^2$ -derivatisierten Diazeniumdiolate eher als "Pre-Prodrugs" bezeichnet werden müssen.

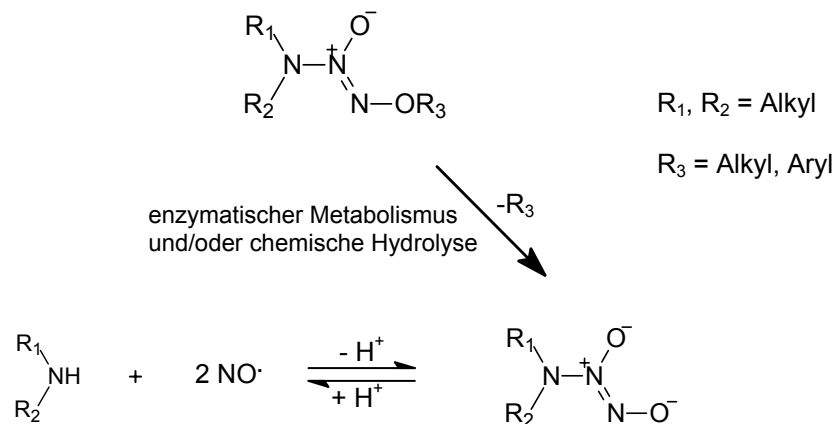


Abb. 6 Diazen-1-ium-1,2-diolat Bildung und  $\text{NO}$ -Freisetzung

Die Synthese und Charakterisierung der ersten Diazeniumdiolate wurde 1960 von R. Drago beschrieben.<sup>[70]</sup> Seit der Identifizierung des  $\text{NO}^\cdot$  als EDRF haben die NONOate zunehmend an Bedeutung gewonnen, zum einen weil sie zu den wenigen direkten  $\text{NO}^\cdot$ -Donoren gehören, zum anderen aber auch weil sie je nach Struktur des Aminkörpers sehr unterschiedliche Halbwertszeiten für die  $\text{NO}^\cdot$ -Freisetzung haben. Die zuverlässige und berechenbare  $\text{NO}^\cdot$ -Lieferung macht die NONOate zu idealen Werkzeugen für die Erforschung  $\text{NO}$ -abhängiger Prozesse und Krankheiten. Zusätzlich tritt ihr therapeutischer Nutzen als Arzneimittel immer mehr in den Vordergrund. Die für diese Arbeit relevanten literaturbekannten Aspekte der Diazeniumdiolate sollen im Folgenden detailliert dargestellt werden.

### Synthese und Eigenschaften der Diazeniumdiolate

Die einzige brauchbare Methode Diazeniumdiolate herzustellen, ist die direkte Umsetzung eines Amines mit 4-5 Atm  $\text{NO}^-$ -Gas in einem geeigneten Lösungsmittel (Methanol, ggf. Acetonitril) unter Ausschluss von Sauerstoff und Wasser. Um diese Bedingungen herstellen zu können, wird üblicherweise eine Hydrierapparatur oder ein Autoklav mit Leitungen aus Edelstahl verwendet. Das verwendete Amin dient dabei gleichzeitig als Base und es entstehen intermolekulare Ammonium Salze. Einige Polyamine, wie das Diethylentriamin, sind in der Lage stabile intramolekulare Salze zu bilden. Durch den Zusatz starker Basen, z.B. Natrium-methanolat, entstehen wesentlich weniger hygroskopische Na-Salze NONOate. Abbildung 7 zeigt die Strukturformeln dieser drei möglichen Salzarten am Beispiel des Diethylamin und Diethylentriamin als Edukte.

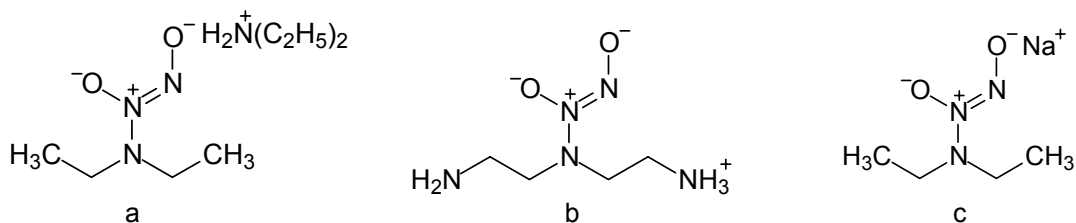


Abb. 7 NONOat-Salze: a) Intermolekulares Ammoniumsalz, b) Intramolekulares Salz, c) Na-Salz

In der Regel handelt es sich bei allen NONOat-Salzen um weiße Pulver, wobei einige Na-Salze bei richtiger Aufarbeitung auch als farblose oder weiße Kristalle anfallen können. Die Identität der Diazeniumdiolate lässt sich am besten durch  $^1\text{H-NMR}$ - (gemessen in  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ), UV- und IR-Spektroskopie bestimmen. Im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum ist, wie in Abbildung 8 beispielhaft aufgeführt, eine Signalverschiebung der N-benachbarten CH-Protonen um 0.4-0.5 ppm, im Vergleich zum sekundären Amin, charakteristisch. Ebenso geben die zum N-Atom  $\beta$ -ständigen CH-Protonen ein Signal, das in einem geringeren Maße Tieffeld verschoben ist.

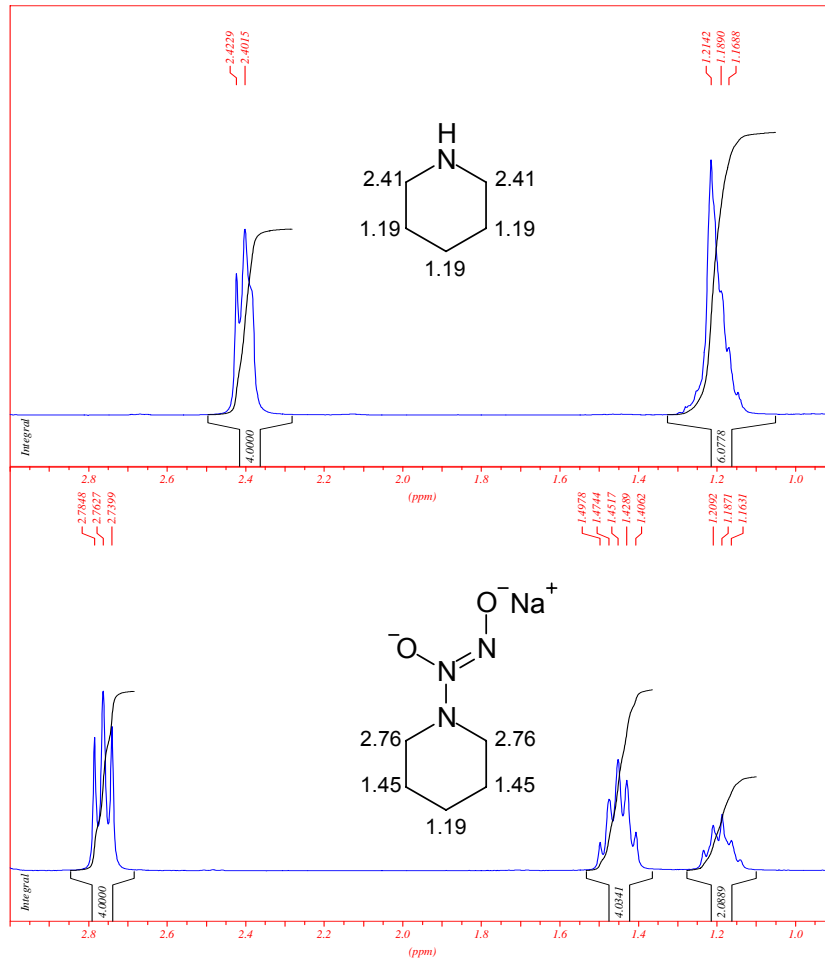


Abb. 8  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum mit chemischen Verschiebungen ( $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ ;  $\delta$ ) des Piperidin im Vergleich zum Piperidin-NONOat (PIPER/NO)

Das Absorptionsmaximum der  $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$  Gruppe im UV-Licht liegt bei 251 nm, wohingegen die typischen IR-Valenzschwingungen bei  $1225\text{-}1210\text{ cm}^{-1}/1187\text{-}1155\text{ cm}^{-1}$  (N-O Valenz) und  $1131\text{-}1129\text{ cm}^{-1}$  (N-N Valenz) Wellenzahlen liegen.<sup>[70,71]</sup> Für Reinheitsprüfungen sind Elementaranalysen geeignet, wobei es erwähnenswert ist, dass bis heute keine universell einsetzbare HPLC Analytik für Diazoniumdiolate zur Verfügung steht. Die beschriebene Methode von Fitzhugh *et al.* lässt durch die verwendete UV-Detektion lediglich die Quantifizierung der NONOate und der entsprechenden Nitrosamine als Verunreinigung zu. Andere Verunreinigungen, wie z.B. Natrium-methanolat oder die Ausgangsamine, werden nicht erfasst.<sup>[72]</sup> Experimente diesbezüglich, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind im Kapitel 4.1.2 (Bisher unveröffentlichte Ergebnisse) aufgeführt.

Als Mechanismus der Diazoniumdiolat-Bildung sind zwei Möglichkeiten denkbar. Zum einen die Entstehung eines  $\text{NO}^-$ -Dimers, welches sich an das Amin bindet (Abb. 9, Weg A), zum anderen die aufeinanderfolgende Anlagerung von jeweils einem  $\text{NO}^-$ -Molekül (Weg B).<sup>[73,74]</sup> Da die Dimerisierung von  $\text{NO}^-$  unter normalen Reaktionsbedingungen ohnehin nicht stattfindet und die Anlagerung des Dimers an das Amin in der Computersimulation von Dutton *et al.* als die endothermere Reaktion kalkuliert wird (B3LYP-Modell), gilt der Mechanismus der sequenziellen  $\text{NO}^-$ -Bindung als der wahrscheinlichere.<sup>[73]</sup>

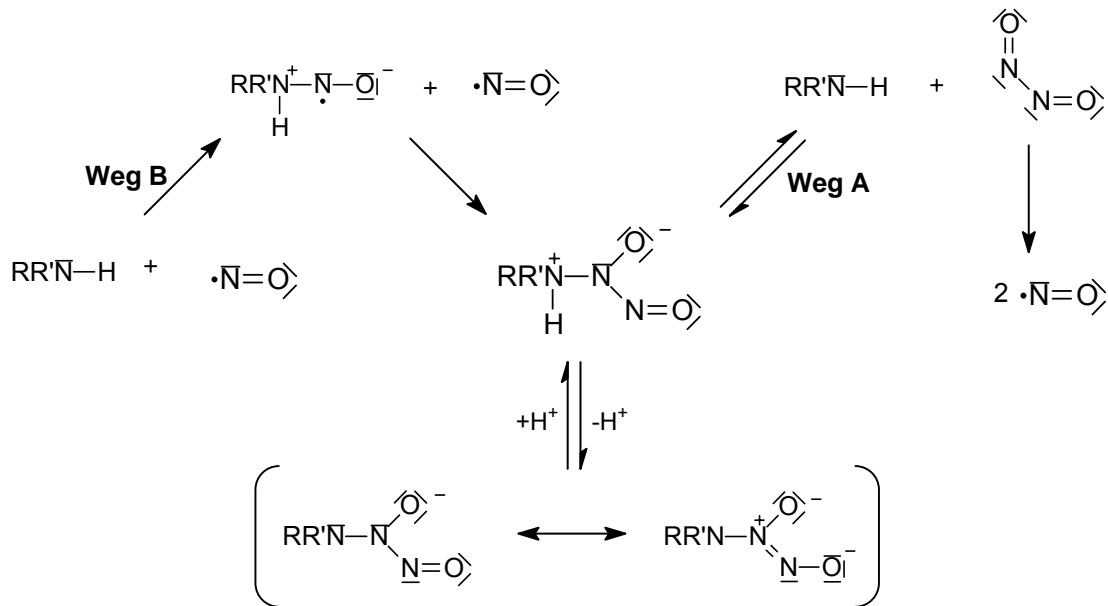
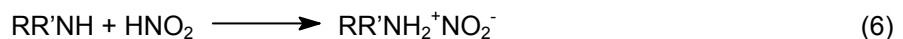
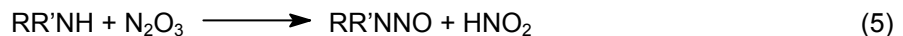
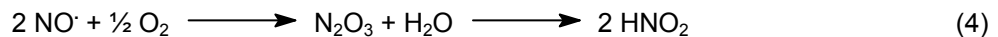


Abb. 9 Mögliche Mechanismen der NONOat Bildung und der NO-Freisetzung

Die treibende Kraft für diese Reaktion ist die Anwesenheit einer möglichst starken Base, um das Gleichgewicht auf die Seite des Diazeniumdiolat-Anions zu verschieben. Bei der Synthese von NONOaten muss auf die Abwesenheit von O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O geachtet werden, da sonst aus entstandenem Distickstofftrioxid das entsprechende Nitrosamin und das Hydronitrit des eingesetzten Amins gebildet wird (Gleichung 4, 5 und 6).



Aus diesem Grund wird auch empfohlen die trockenen Diazeniumdiolate unter Schutzgasatmosphäre kühl und lichtgeschützt zu lagern.<sup>[75]</sup>

#### NO Freisetzung aus Diazeniumdiolaten

Nach den oben genannten Modellberechnungen von Dutton *et al.* wird umgekehrt das N-Atom des ursprünglichen Amins protoniert und nicht etwa eines der Sauerstoffatome. Darauf folgt die Abspaltung des NO-Dimers mit sofortiger Aufspaltung in zwei Moleküle monomeres Stickoxid (Abb. 9, Weg A).<sup>[73]</sup> Für den Zerfall der NONOate ist somit der pH-Wert von entscheidender Bedeutung. Bei einem konstanten pH-Wert zerfällt das Diazeniumdiolat nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung. In Puffern verschiedener pH-Werte steigt die Geschwindigkeitskonstante des Zerfalls proportional zur Protonenkonzentration.<sup>[71]</sup> Ebenso verkürzen sich die Halbwertszeiten der NO Freisetzung durch

Erhöhung der Temperatur oder der Lichteinwirkung.<sup>[76]</sup> Die chemische Struktur des Amins hat nicht nur auf die Synthesegeschwindigkeit, sondern auch auf den NONOat-Zerfall einen großen Einfluss. Es sei darauf hingewiesen, dass bis heute keine systematischen Literaturdaten, sondern lediglich vereinzelte Berichte über diese Zusammenhänge existieren. Beispiele sind die ultraschnelle NO-Freisetzung bedingt durch eine Na-carboxylat Gruppe in direkter Nachbarschaft zum Amin das die  $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ -Gruppe bindet, sowie die teilweise sehr langsame NO-Abgabe aus zwitterionischen Polyamin-NONOaten.<sup>[77,78]</sup>

#### Derivatisierungen am $\text{O}^2$ -Atom: Diazeniumdiolat Prodrugs und Hybridmoleküle

Die in der Literatur am häufigsten beschriebene Methode am  $\text{O}^2$ -Atom der NONOat-Gruppe einen Rest einzuführen, ist die Reaktion des Diazeniumdiolates (suspendiert mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  bei  $0^\circ\text{C}$ ) mit dem entsprechenden Alkyl- oder Arylhalogenid in DMF. Abbildung 10 stellt die wichtigsten literaturbekanntesten Diazeniumdiolat Prodrugs dar.

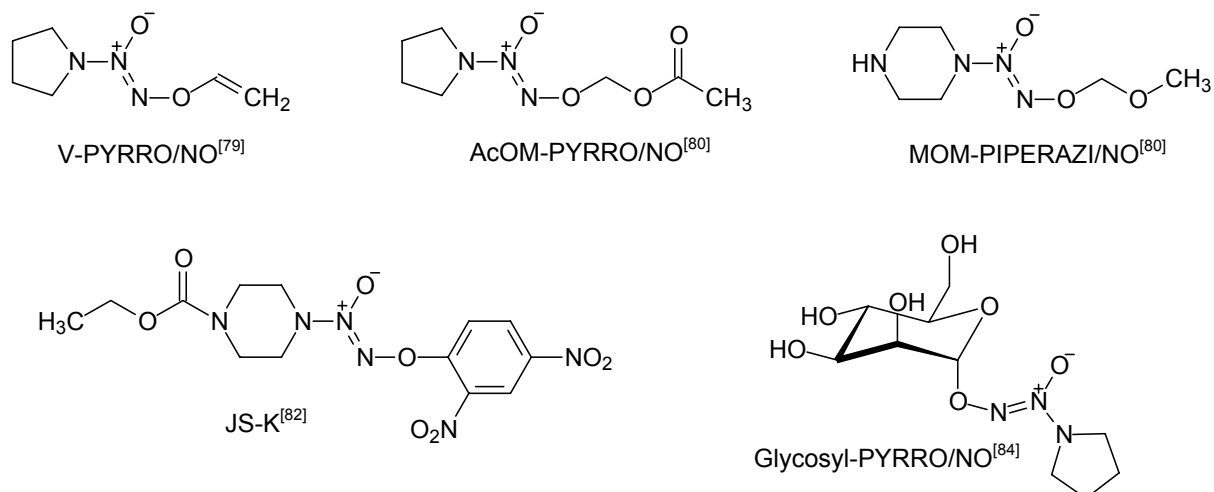


Abb. 10 Wichtige literaturbekannte Diazeniumdiolat Prodrugs

Das von Saavedra *et al.* entwickelte vinylierte Diazeniumdiolat V-PYRRO/NO wird durch Leberenzyme (Cytochrom P450) zum Oxiran (Epoxid) oxidiert, welches dann durch weitere Abbauschritte zum spontan freisetzenden PYRRO/NO (HWZ= 3s) umgesetzt wird.<sup>[79]</sup> Für diese Verbindung konnten leberprotektive Eigenschaften bei Mäusen nachgewiesen werden.<sup>[80]</sup> Während das AcOM-PYRRO/NO von Esterasen biotransformiert wird, hydrolysiert das MOM-PIPERAZI/NO mit einer HWZ von etwa 17 Tagen zum freien NONOat, Methanol und Formaldehyd.<sup>[81]</sup> Der im JS-K inkorporierte labile Aryl-Rest wird durch nukleophile aromatische Substitution, z.B. durch Thiolate in Zinc-finger Proteinen oder Glutathion, angegriffen und schließlich abgespalten.<sup>[82]</sup> Liu *et al.* konnte *in vitro* für dieses Prodrug einen Synergismus mit Alkylantien zeigen.<sup>[83]</sup> Ein weiteres enzymatisch aktivierbares NONOat-Prodrug ist das Glycosyl-PYRRO/NO, das selektiv durch Glucosidasen aktiviert wird.<sup>[84]</sup>

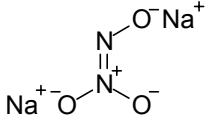
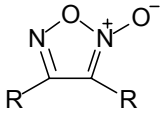
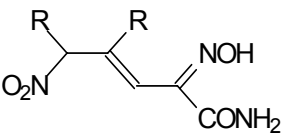
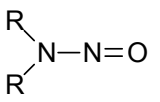
Als Hybridsubstanz bezeichnet man Moleküle, die mindestens zwei biologisch aktive Teilelemente beherbergen. Die meisten NO-freisetzenden bioaktiven Hybride, wie sie z.B. aus ACE-

Hemmern oder NSAID`S hergestellt wurden, enthalten als NO-mimetische Funktion organische Nitrate. Hybride als direkt NO-freisetzende Diazeniumdiolate sind in der Literatur weitaus weniger oft beschrieben. Die wichtigsten Vertreter sind NONOat-Hybride einiger nichtsteroidaler Antirheumatika, Dihydropyridine und Heparin. Hinzukommen Polymere, die statt einer biologischen eine physikalische Aktivität (z.B. als endoluminale Gefäßprothese) besitzen.<sup>[85-88]</sup> Den NSAID-, Heparin- und Polymer-Hybriden gemeinsam ist das Hauptziel, einen Einfluss auf die Blutkoagulation/Plättchenaggregation zu nehmen, auch wenn den Cyclooxygenase-hemmenden NO-Hybriden noch zahlreiche andere denkbare Eigenschaften zugesprochen werden können. Das Hauptaugenmerk der Dihydropyridin-NO-Hybride liegt in der zusätzlichen sGC Aktivierung und den damit verbundenen Effekten (vergl. Kapitel 1.1.2).

### 1.2.6 Sonstige NO-Donoren

Alle bisher nicht erwähnten NO-Donoren haben wegen ihrer teilweise hochtoxischen Eigenschaften, chemischer Instabilität und schlechter Löslichkeit sowie komplizierten Aktivierungsmechanismen nur noch eine untergeordnete Bedeutung. Einige weitere, aus Forschungsaktivitäten in der medizinischen Chemie resultierenden NO-Donoren, sind in Tabelle 2 mit der dazugehörigen Struktur, Art der freigesetzten RNS und den für die Freisetzung auslösenden Faktoren zusammengefasst.<sup>[3]</sup>

Tab. 2 Ausgewählte NO-Donoren mit den daraus resultierenden RNS und Aktivierungsfaktoren

Name	Struktur	Freigesetzte RNS	Auslösender Faktor
Angeli's Salt		NO <sup>-</sup> NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Hydrolyse
Furoxane		NO <sup>-</sup> (durch Ox. NO <sup>•</sup> )	Thiole
Oxime		NH <sub>2</sub> OH (durch Ox. NO <sup>•</sup> )	O <sub>2</sub> Eisenporphyrin Enzymatisch
Nitrosamine		NO <sup>+</sup> NO <sup>•</sup>	Licht enzymatisch



### 1.3 Nachweisverfahren für Stickstoffmonoxid

#### 1.3.1 Griess Reaktion

Das Griess Assay ist eine indirekte kolorimetrische Nachweismethode für  $\text{NO}^\cdot$  in wässrigem Medium und beruht auf der Umsetzung von Nitrit, entstanden durch Oxidation des  $\text{NO}^\cdot$ , mit primären aromatischen Aminen (Sulfanilamid) in saurer Lösung zu einem Diazoniumsalz. Durch Diazokopplung an Naphthylethylendiamin entsteht ein Azofarbstoff, der mittels UV-/Vis-Spektroskopie mit einer Nachweisgrenze von etwa  $0,3 \mu\text{mol/l}$  quantifiziert werden kann. Um auch das aus der  $\text{NO}^\cdot$ -Oxidation resultierende Nitrat zu erfassen, wird der Lösung ein Überschuss Nitratreduktase zugesetzt.

#### 1.3.2 Oxyhämoglobin Assay

Diese sehr empfindliche Methode mit einer Nachweisgrenze von etwa  $1 \text{ nmol/l}$  ist besonders für die Stickstoffmonoxidbestimmung in biologischen Proben geeignet. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung von Oxyhämoglobin ( $\text{HbFe}^{2+}\text{O}_2$ ) mit  $\text{NO}^\cdot$  zu Methämoglobin ( $\text{HbFe}^{3+}$ ) und  $\text{NO}_3^-$ . Aufgrund der unterschiedlichen Absorptionswellenlänge von Oxy- und Methämoglobin (pH-Wert abhängig) wird üblicherweise eine photometrische Detektion für die Quantifizierung verwendet.

#### 1.3.3 Elektronenspin Resonanz- und Laser Magnet Resonanz Spektroskopie

Diese beiden hochempfindlichen Methoden ( $1 \text{ nmol/l}$ ) beruhen auf dem Prinzip, dass die ungepaarten Elektronen der paramagnetischen  $\text{NO}^\cdot$  Moleküle durch ein von außen angelegtes Magnetfeld mit elektromagnetischer Strahlung (Mikrowellen bei der ESR-, Laserlicht bei der LMR-Spektroskopie) in Resonanz gebracht werden. Resonanzbedingungen liegen vor, wenn durch die variierte Magnetfeldstärke die ungepaarten Elektronen sich in ein Energieniveau ( $\Delta E$ ) aufspalten, dessen Energie ihrem gegensätzlichen Spin ( $\pm 1/2$ ) entspricht. Die konstante Frequenz der eingestrahlten elektromagnetischen Welle muss der Differenz dieses aufgespalteten Energieniveaus entsprechen. Die ESR-Spektroskopie erfasst die aufgespalteten Energieniveaus in einem niedrigen Frequenzbereich, während bei der LMR-Spektroskopie die Energieniveaus eines höheren Frequenzbereiches erfasst werden. Die Intensität des Resonanzsignals ist dabei proportional zur  $\text{NO}^\cdot$  Konzentration. Um die eher schlechte Auflösung des ESR-Signals zu verbessern, werden häufig zusätzlich Spintrap Moleküle, wie z.B. Eisen(II)-diethyldithiocarbamat ( $\text{Fe}^{2+}[(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NC}(\text{S})\text{S}]_2$ ), eingesetzt. Hierbei handelt es sich um diamagnetische Moleküle die mit  $\text{NO}^\cdot$  stabile, paramagnetische Eisen-Komplexe bilden. Ein Vorteil der ESR Methode ist die Möglichkeit *in vivo* messen zu können, wobei durch die nicht ausreichende Empfindlichkeit nur unphysiologisch hohe  $\text{NO}^\cdot$  Konzentrationen detektiert werden können. Ein Vorteil der LMR Methode ist die gleichzeitige Bestimmung von  $^{15}\text{NO}^\cdot$ -Isotopen.<sup>[89,90]</sup>

### 1.3.4 Chemilumineszenzdetektion

Bei der chemischen Umsetzung von Ozon mit Stickstoffmonoxid entsteht Sauerstoff ( $O_2$ ) und angeregtes Stickstoffdioxid ( $NO_2^*$ ), welches bei der Rückkehr in den Grundzustand ( $NO_2$ ) Energie in Form von Lichtquanten emittiert, die photoelektrisch detektiert werden können. Diese sehr beliebte, aber auch recht kostenintensive Methode hat eine sehr hohe Nachweisgrenze von etwa 1 nmol/l und wird in N-selektiven HPLC-Detektoren (CLND) genutzt.

### 1.3.5 Amperometrische $NO^-$ -Detektion

$NO$ -Elektroden sind äußerst empfindliche Sensoren für die direkte Quantifizierung von  $NO^-$  in wässrigen Medien, sowie für *in vivo* Untersuchungen.<sup>[91]</sup> Es handelt sich hierbei um Kombinationselektroden, bei denen die Arbeits- und Bezugselektrode ( $Ag/AgCl$ ) auf engstem Raum Platz finden und mit einer Nachweisgrenze von 0,3 nmol/l (entspricht einem Stromfluss von 100 fA) die empfindlichste  $NO^-$  Nachweismethode darstellen. Die mangelnde Selektivität für Stickstoffmonoxid konnte durch die Entwicklung einer selektiv gaspermeablen hydrophoben Membran ausgeglichen werden, die Teilchen je nach Größe und Ladung selektiert. Das  $NO^-$  diffundiert durch die Membran und wird an der Anodenoberfläche zum Nitrosonium Kation ( $NO^+$ ) oxidiert, welches wiederum unmittelbar mit Wasser zum Nitrit umgesetzt wird. Durch die Oxidation entsteht ein detektierbarer Redoxstromfluss, dessen Stärke der  $NO^-$  Konzentration proportional ist. Die Genauigkeit der Messungen kann noch entscheidend verbessert werden, indem eine spezielle  $NO$  Freisetzungskammer ( $NO$ -Chamber<sup>®</sup>; WPI), wie in Abbildung 11 dargestellt, verwendet wird.

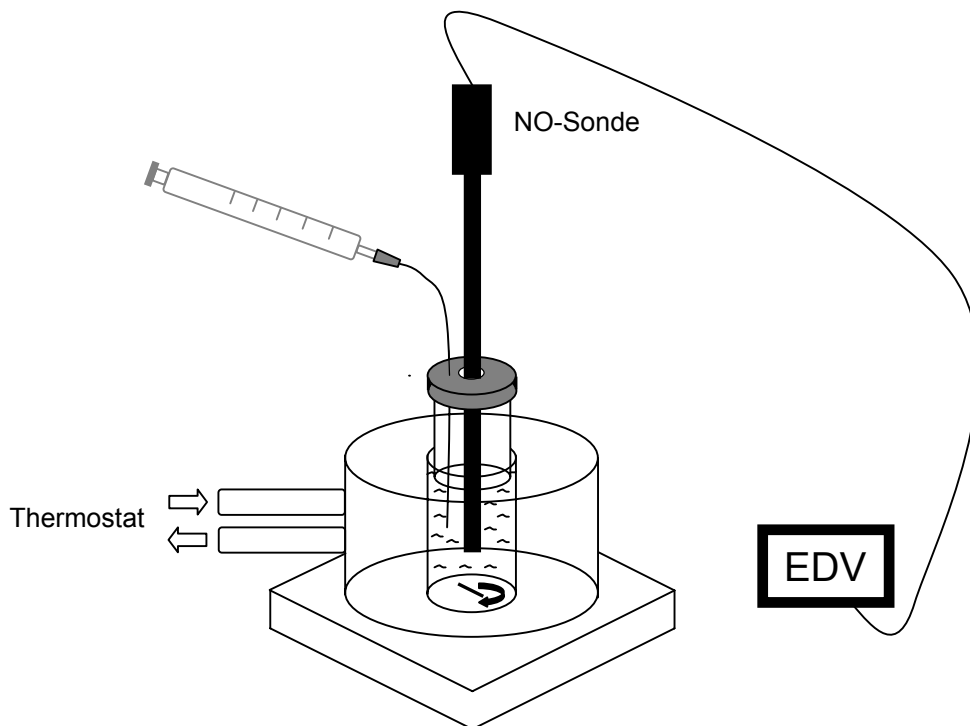


Abb. 11  $NO$ -Freisetzungskammer

Neben der Temperierbarkeit und der idealen Gefäßform ist der Hauptvorteil dieser Freisetzungskammer die Abdichtung der Flüssigkeitsoberfläche gegenüber dem Luftraum, wodurch die Messungen empfindlicher, reproduzierbarer und wegen der empfindlichen Messelektronik auch robuster werden. Diese amperometrische Nachweismethode und Messanordnung fand in dieser Arbeit Verwendung.

## 1.4 Charakterisierung des Azol-Antimykotikums Ketoconazol

Da in dieser Arbeit eine Reihe von Ketoconazol-NONOat und -Organonitrat Hybriden synthetisiert, charakterisiert und biologisch getestet wurden, soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über die Eigenschaften und Pharmakodynamik des Ketoconazols erläutert werden.

### 1.4.1 Allgemeine Eigenschaften von Ketoconazol

Als das Breitband-Antimykotikum Ketoconazol (siehe Abbildung 12) Anfang 1980 in den Handel kam, war es das erste peroral verfügbare Azol-Antimykotikum. Es handelt sich um eine weiße, pulvrige Verbindung mit einem Molekulargewicht von 531,4 g/mol, die sich schlecht in Wasser, dafür gut in Methanol und Dichlormethan löst.

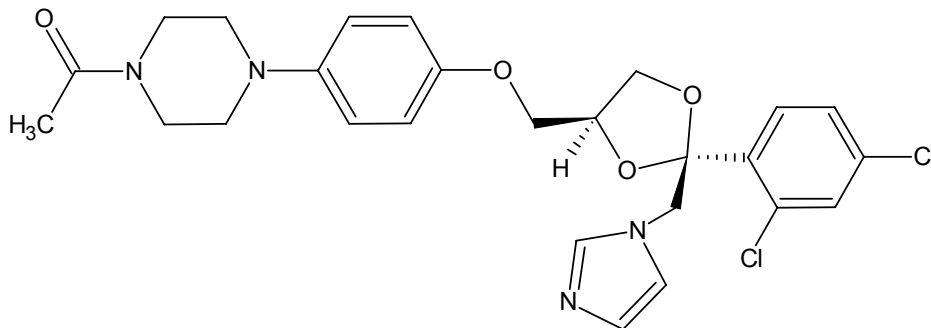


Abb. 12 Ketoconazol (INN: Ketoconazolium)

Die auf dem Markt erhältlichen Präparate Fungoral<sup>®</sup>, Nizoral<sup>®</sup> und Terzolin<sup>®</sup> zeichnen sich durch eine hohe Wirksamkeit bei Systemmykosen, Candida-Infektionen des Mundraumes und des Gastrointestinaltraktes, rezidivierenden Vaginalmykosen und Dermatophytenbefall der Haut aus.<sup>[92]</sup> Da bei der oralen Gabe lebertoxische Effekte sowie durch Hemmung der Testosteronsynthese bedingte Gynäkomastie auftreten können, steht die äußerliche Anwendung von Ketoconazol im Vordergrund.<sup>[93]</sup>

### 1.4.2 Pharmakologie von Ketoconazol

Wie alle Azol-Derivate gehört Ketoconazol zu den Hemmstoffen der Ergosterolbiosynthese, dem Cholesterin-Äquivalent des Plasmalemm der Pilze. Ein Zwischenschritt dieser Biosynthese ist die Demethylierung von Lanosterin zu 14-Desmethyl-Lanosterin, katalysiert durch ein Cytochrom P450 abhängiges Enzym, der 14- $\alpha$ -Demethylase. Dessen Hemmung erfolgt durch die Bindung des Imidazol-Restes von Ketoconazol an das Häm-Eisen der Cytochrom P450 (siehe Abbildung 13).<sup>[94]</sup>

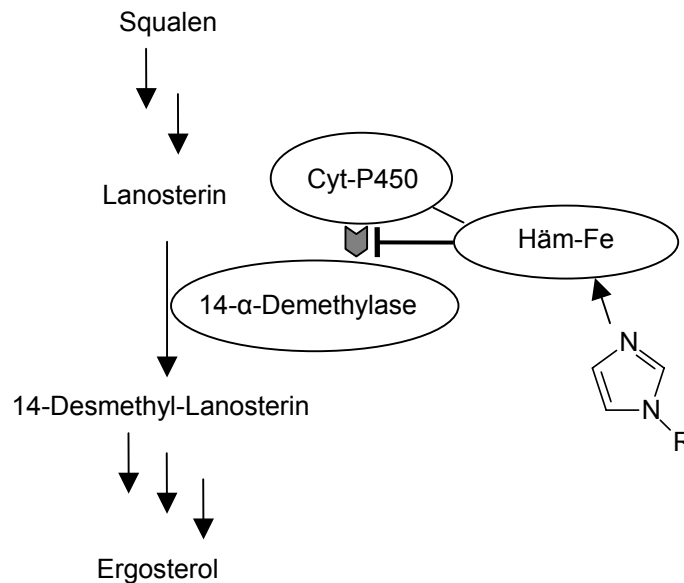


Abb. 13 Hemmung der Ergosterolbiosynthese durch Azol-Antimykotika

In der Fachliteratur werden Azol-Antimykotika aufgrund dieser Pharmakodynamik auch als DMI's (demethylation-inhibiting fungicides) bezeichnet. Die Einlagerung der falschen Sterole in die Zellwand wirkt auf das Pilzwachstum fungistatisch, verursacht durch Stabilitätsstörungen der Membran und durch die Beeinträchtigung der Funktion membranständiger Enzyme. In sehr hohen Dosierungen kommen durch die direkte Einlagerung der Azole in das Plasmalemm und dem damit verbundenen Austritt essentieller Zellbestandteile auch fungizide Effekte zustande.<sup>[93]</sup> Durch die lipophile Struktur und die sehr hohe Plasma-Eiweißbindung beträgt die Plasmaeliminationshalbwertszeit des Ketoconazol 7-10 Stunden.

## 1.5 Problemstellung und Ziele der Arbeit

### 1.5.1 Chemische Aspekte

An Stickstoff gebundene Diazen-1-ium-1,2-diolate (NONOate) stellen die einzige chemische Verbindungsklasse dar, deren Derivate in der Lage sind, ohne enzymatische Bioaktivierung und ohne

die Freisetzung anderer „reactive nitrogen species“ (RNS), den physiologisch außerordentlich bedeutsamen Botenstoff Stickstoffmonoxid (NO<sup>•</sup>) freizusetzen. Nachteile dieser Verbindungsklasse sind nicht nur eingeschränkte Stabilität gegenüber Hitze, Feuchtigkeit und Licht, sondern auch mangelnde Steuerung und Kontrollmöglichkeiten bei der Synthese aus Aminen und 4-5 Atmosphären gasförmigem Stickstoffmonoxid im Autoklaven. Als Beispiel sei genannt, dass es bisher nicht möglich ist, den individuellen Reaktionsendpunkt zu erkennen. Weiterhin gibt es praktisch keine Aufreinigungsmöglichkeiten der Produkte, was wiederum erhöhte Anforderungen an die Einheitlichkeit der Synthese stellt. So ist vor allem die Bildung von Nitrosaminen zu verhindern, die z.T. hohes karzinogenes Potential besitzen. Neue Möglichkeiten der Synthesesteuerung sollte ein in unserer Arbeitsgruppe neu entwickeltes und in der vorliegenden Dissertation weiterentwickeltes Gerät, der „NOTizer<sup>®</sup>“ sein, dessen Kernstücke eine durchsichtige Reaktionskammer, ein Druckaufnahmesensor, eine entsprechende EDV-Schnittstelle und eine Software sind, mit welcher der Umsetzungsverlauf online verfolgt werden kann. Auf diese Weise können nicht nur die Reaktionsendpunkte der Synthese erkannt werden, sondern auch die Einflüsse von strukturellen Besonderheiten der eingesetzten Amine, der Reaktionstemperatur, dem Druck, dem Lösungsmittel und der Temperatur. Konkret sollten die folgende Fragestellungen und thematischen Schwerpunkte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

- 1. Gibt es Zusammenhänge zwischen der Struktur des eingesetzten Amines und der Bildungsgeschwindigkeit des resultierenden NONOates?*

In der Literatur beschriebenen NONOat-Synthesen wurden ohne Rücksicht auf die Struktur des eingesetzten Amines in etwa gleiche, vermutlich meistens zu lange, möglicherweise in Einzelfällen aber auch zu kurze Reaktionszeiten festgesetzt. Mit dem NOTizer lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit, wie auch der Reaktionsendpunkt anhand der aufgenommenen Druckzeitkurve erkennen und damit auch die Reaktivität der unterschiedlichen Amine gegenüber Stickstoffmonoxid ermitteln. Durch die Aufnahme von Druckzeitkurven bei der Umsetzung einer sinnvollen Auswahl und nicht zu kleinen Anzahl von Aminen könnten die Zusammenhänge zwischen Struktur und Reaktionsgeschwindigkeit erkannt werden.

- 2. Welche Abhängigkeiten bestehen zwischen der Bildungsgeschwindigkeit der NONOate und Parametern wie Reaktionstemperatur, NO-Druck, Lösungsmittel und Natur der zugesetzten Base?*

Auch diese Zusammenhänge sollten durch systematische Variation der oben genannten Parameter und Aufnahme der Druckzeitkurven analysiert und charakterisiert werden.

- 3. Welche Zusammenhänge gibt es zwischen Struktur des NONOates und der Freisetzungsgeschwindigkeit von Stickstoffmonoxid aus ihnen?*

In der Literatur ist verschiedentlich über die Abhängigkeit der NO-Freisetzung aus Diazeniumdiolaten von pH-Wert, Temperatur und auch Struktur des Diazeniumdiolats berichtet worden. Nach der ohnehin geplanten Synthese einer Vielzahl von Diazeniumdiolaten kann das Freisetzungsverhalten auf einer sehr viel breiteren Basis und überdies mit einer Methode und "in einer Hand" durchgeführt werden. Es soll eine amperometrische Messmethode für NO (direkter NO-Nachweis) für diese Zwecke herangezogen werden und diese mit der anerkannten Methode des UV-spektroskopisch bestimmten Zerfalls der Diazeniumdiolate (indirekter Nachweis) kombiniert und die Ergebnisse verglichen und gegenseitig gesichert werden.

4. *Welche Zusammenhänge gibt es zwischen der Bildungsgeschwindigkeit von Diazeniumdiolaten und den NO-Freisetzungsprofilen aus ihnen?*

Alle aus den Arbeiten zu 1. bis 3. erhaltenen Ergebnisse sollten die Analyse solcher Zusammenhänge ermöglichen. Grundfragen wären, ob schnell gebildete Diazeniumdiolate auch schnell zerfallen, ob es genau umgekehrt ist oder ob kein systematischer Zusammenhang zwischen Bildung und Zerfall besteht.

5. *Synthese von Diazeniumdiolat-Prodrugs ("NO-preprodrugs").*

Die grundsätzliche Instabilität und der spontane pH-abhängige und dann weiter nicht mehr zu steuernde Zerfall von Diazeniumdiolaten kann durch die Synthese von Diazeniumdiolat-prodrugs begegnet werden. Diese sind grundsätzlich Verbindungen, die am  $O^2$ -Atom des Diazeniumdiolats alkyliert, möglicherweise auch acyliert sind. Der spontanen Freisetzung von NO aus Diazeniumdiolaten wird dadurch ein chemischer (z.B. Hydrolyse), häufig auch enzymatisch gesteuerter NO-Freisetzungsschritt voran gesetzt. Es handelt sich hier um eine wertvolle, fast unerlässliche Strategie zu einer pharmakokinetisch steuerbaren und Target-orientierten NO-Freisetzung.

6. *Synthese von Stickstoffmonoxid freisetzenden Hybridverbindungen.*

Ein weiterer Schwerpunkt ist die Herstellung von Stickstoffmonoxid freisetzenden Hybriden, d.h. Substanzen, die bereits eine Arzneimittelwirkung haben, zusätzlich jedoch in der Lage sind, NO abzugeben. Um die Stabilität der Substanzen zu gewährleisten und um das *in vivo* oder *in vitro* angezielte Target möglichst hohen Konzentrationen des Arzneistoffs auszusetzen, ist auch hier die Umsetzung der Diazeniumdiolat-Hybride zu Prodrugs unumgänglich. Da die physiologische Wirkung von NO überwiegend das Herz-Kreislauf-, aber auch das Immun- und zentrale Nervensystem reguliert, sowie antiinfektive und antimykotische Eigenschaften besitzt, sind Arzneistoffe wie Betablocker, Dihydropyridine, Antibiotika, Virustatika, Antimykotika, Lipidsenker und Neuroleptika geeignete Grundkörper für die Synthese von NONOat-Hybriden. Für die Hybridsubstanzen wurde als Forschungsschwerpunkt das antimykotisch wirksame Ketoconazol ausgewählt und entsprechende Referenzsubstanzen ohne den gesamten Arzneistoffgrundkörper sollen synthetisiert werden. Um

einen Vergleich zwischen Hybridmolekülen mit unterschiedlichen NO freisetzenden Gruppen machen zu können, sollen neben den NONOat-Hybriden und NONOat-Hybrid-Prodrugs auch Organonitrat-Hybride hergestellt werden.

### 1.5.2 Biologische Aspekte

Ausgewählte Diazeniumdiolate, Diazeniumdiolat-Prodrugs, Diazeniumdiolat-Hybride und Diazeniumdiolat-Prodrug-Hybride sollen *in vitro* und *in vivo* auf ihre biologischen Aktivitäten untersucht werden. Dies erfordert in hohem Maße Kooperation innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe, vor allem aber mit anderen Arbeitskreisen. Die beobachteten biologischen Effekte sollen dabei in Bezug auf die speziellen chemischen Charakteristika, wie z.B. Aktivierbarkeit oder NO-Freisetzungsprofil, der jeweiligen Verbindung diskutiert werden. Die Schwerpunkte liegen bei folgenden Fragestellungen:

7. *Untersuchung der vasodilatatorischen Potenz von NONOaten und NONOat-Prodrugs an isolierten Pulmonalarterien des Schweins.*

Als Kooperationspartner stehen hier Herr Apotheker Andreas König und Frau Dipl. pharm. Caro Roegler im eigenen Arbeitskreis, sowie PD Dr. Andreas Daiber, Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik, Kardiologie.

8. *Einfluss von NONOaten und NONOat-Prodrugs auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke in einem in vitro Modell mit kultivierten cerebralen Endothelzellen.*

Diese Untersuchungen erfolgen im Rahmen des Alzheimer-Verbundprojektes an der FSU Jena. Die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke stellt tatsächlich ein wesentliches Kriterium für potentielle Alzheimertherapeutika dar. Das Projekt soll in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Alfred Fahr und seinem Mitarbeiter Herr Apotheker Sven Winter, Pharmazeutische Technologie, Institut für Pharmazie, Jena, durchgeführt werden.

9. *In vivo Untersuchungen des Einflusses von NONOaten und NONOat-Prodrugs auf neuroregenerative Prozesse nach experimentell induzierten Hirninfarkten bei Ratten.*

Auch dieses Projekt ist im Rahmen des Alzheimer-Verbundprojektes zu sehen. Als Kooperationspartner steht die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Redecker, Herrn Prof. Witte und Frau Dr. Silke Keiner, Universitätsklinikum Jena, zur Verfügung.

10. *Antimykotische und antibakterielle Wirkprofile verschiedener Ketoconazol-Diazeniumdiolat-Hybride und verwandter Strukturen.*

Dieses Projekt wird in Zusammenarbeit mit dem Hans-Knöll-Institut Jena unter der Leitung von Herrn Prof. Axel Brakhage und Frau Dr. Ute Möllmann bearbeitet.

## 2 Übersicht zu den Veröffentlichungen

In der folgenden Übersicht von insgesamt sechs Veröffentlichungen, bestehend aus fünf experimentellen Arbeiten und einem Patent, tritt folgender Eigenanteil auf:

- als Erstautor: In den Veröffentlichungen 1, 2, 3 und 6 habe ich die Ausführung und Bewertung der beschriebenen Synthesen und die NO-analytischen Messungen durchgeführt, sowie die jeweiligen Manuskripte erstellt.
- Als Koautor: In Veröffentlichung 4 und 5 habe ich die Synthese und NO-Analytik der beschriebenen Diazeniumdiolate und Diazeniumdiolat-Prodrugs durchgeführt, sowie an der Erstellung der Manuskripte mitgewirkt.

### 2.1 Veröffentlichung 1

#### **The NOTizer- A Device for the Convenient Preparation of Diazen-1-ium-1,2-diolates.**

Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din Ali Ahmed Hassan; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. *Methods in Enzymology* (2005), 396 (Nitric Oxide, Part E), 17-26.

In dieser Veröffentlichung wird die neu entwickelte Apparatur für die effiziente und qualitative Synthese von Diazen-1-ium-1,2-diolaten mit dem Namen "NOTizer<sup>®</sup>" vorgestellt. Neben dem apparativen Aufbau werden detaillierte Synthesevorschriften für die effektive Herstellung literaturbekannter NONOate und deren Eigenschaften bezüglich Reaktivität, NO-Freisetzung und Lagerung beschrieben. Probleme die bei früheren Herstellungsprozeduren auftreten, wie die Entstehung von Nebenprodukten oder Ausbeuteeinbußen, konnten durch die Entwicklung dieser Methode minimiert werden.

### 2.2 Veröffentlichung 2

#### **Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Monitored by the "NOTizer" Apparatus: Relationship between Formation Rates, Molecular Structure and the Release of Nitric Oxide.**

Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din A. A.; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. *European Journal of Organic Chemistry* (2007), 4, 616-624.

In dieser Studie werden erstmals systematisch Daten über die Reaktionsverläufe verschiedener NONOat-Synthesen beschrieben und miteinander verglichen. Um eine möglichst große Vielfalt an Strukturvariationen zu erhalten, die einen Zusammenhang zwischen der Aminstruktur und dem ermittelten kinetischen Datenmaterial aus dem Syntheseverlauf erkennen lassen, wurden insgesamt 22 Diazeniumdiolate mit unterschiedlichen Alkyl-, Heteroalkyl-, Benzyl- und substituierten zyklischen Resten hergestellt. Neben dem Struktureinfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit, wird



dieser Einfluss auch hinsichtlich der NO<sup>-</sup>-Liberation aus den NONOaten beschrieben. Schließlich wird ein Zusammenhang zwischen den ermittelten Daten aus Synthese und NO<sup>-</sup>-Freisetzung zusammengefasst.

### 2.3 Veröffentlichung 3

#### **NO Donors, part 17: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs and Corresponding Nitric Oxide Donors.**

Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. *Journal of Medicinal Chemistry*. In Vorbereitung.

Die Synthese und biologische Aktivität neuartiger NO-freisetzender Ketoconazol Derivate sowie der analogen NO-Donor Derivate sind Gegenstand dieser Veröffentlichung. Während die Hemmung des Bakterienwachstums bei den untersuchten Derivaten nur geringe Unterschiede aufwies, konnte für die Inhibition des Pilzwachstums ein Zusammenhang zu der verwendeten NO-Donor Spezies hergestellt werden. Hierbei zeigten insbesondere die Ketoconazol-Hybride mit Organonitrat- und Diazeniumdiolat-Prodrug-Gruppe eine höhere Aktivität und/oder verändertes Wirkspektrum als das Ketoconazol allein.

### 2.4 Veröffentlichung 4

#### **Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate.**

Koenig, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Joerg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (2007), 50, 68-74.

Veröffentlichung 4 behandelt die *in vitro* Aktivität therapeutisch relevanter organischer Nitrate, insbesondere die des Pentaerythrityltetranitrat (PETN) und seiner *in vivo* nachgewiesenen Metabolite PEtriN, PEdiN und PEmonoN. Ebenso wird die vasodilatorische Potenz des S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP) und des Diazeniumdiolates PHEPIPERAZI/NO an dem verwendeten *in vitro* Modell ermittelt. Die beim PETN und PEtriN signifikante, jedoch beim PEdiN, PEmonoN, SNAP und PHEPIPERAZI/NO nur gering ausgeprägte Tachyphylaxie (*in vitro*) wird ausführlich beschrieben. Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts ergaben die Hypothese, dass die *in vivo* fehlende Nitat-Tachyphylaxie des PETN mit der Tatsache zusammenhängt, dass lediglich die Metabolite PEdiN und PEmonoN bioaktiv sind, jedoch das PETN und PEtriN aufgrund fehlender Resorption ausgeschieden werden.

## 2.5 Veröffentlichung 5

### **Permeability changes in response to NONOate and NONOate prodrug derived nitric oxide in a blood-brain barrier model formed by primary porcine endothelial cells.**

Winter, Sven; Konter, Joerg; Scheler, Stefan; Lehmann, Jochen; Fahr, Alfred. *Nitric Oxide*. Eingereicht (2007).

In dieser Arbeit werden drei direkt NO-freisetzende NONOate (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO) und drei NONOat-Prodrugs (Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO, Et-BUPIPERAZI/NO) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke in einem *in vitro* Modell untersucht. Die Permeabilität der Markersubstanz Carboxyfluorescein wird durch die direkten NO-Donoren verringert, während die Permeabilität bei den NONOat-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO und Tosyl-PYRRO/NO zunimmt. Das Et-BUPIPERAZI/NO nimmt in Bezug auf die Veränderung der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke eine Mittelstellung ein. Mit Methylenblau konnten die Permeabilitätsabnehmenden Effekte blockiert werden, die Permeabilitätssteigernden jedoch nicht.

## 2.6 Veröffentlichung 6

### **Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkstoffe.**

Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. Eingereicht beim Deutschen Patent- und Markenamt (25.07.2007).

Diese Offenlegungsschrift schützt rechtlich eine der in Veröffentlichung 3 beschriebenen Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen, sowie die entsprechenden Analogderivate. Der Vorteil dieser Erfindung ist die variable NO-Freisetzungskinetik gegenüber anderen antimykotisch wirksamen Hybridverbindungen durch Veränderungen an der Diazoniumdiolat-Teilstruktur. Antibakterielle und antiinflammatorische Wirksamkeit konnten dem genannten Ausführungsbeispiel ebenfalls nachgewiesen werden.

### **3. Veröffentlichungen**

## Veröffentlichung 1

### **The NOtizer- A Device for the Convenient Preparation of Diazen-1-ium-1,2-diolates**

Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din Ali Ahmed Hassan; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. *Methods in Enzymology* (2005), 396 (Nitric Oxide, Part E), 17-26.

- Yoshimura, T. (1984). Reaction of nitrosylporphyrinatoiron (II) with nitrogen oxide. *Inorg. Chim. Acta* **83**, 17–21.
- Young, C. L. (1981). Oxides of nitrogen. In “Solubility Data Series” (R. Battino, H. L. Clever, and C. L. Young, eds.) Vol. 8. Pergamon Press, New York.

## [2] The NOTizer—A Device for the Convenient Preparation of Diazen-1-ium-1,2-diolates

By JOERG KONTER, GAMAL EL-DIN ALI AHMED  
HASSAN ABUO-RAHMA, ALI EL-EMAM, and JOCHEN LEHMANN

### Abstract

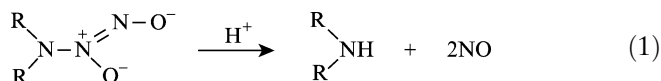
*N*-bound diazen-1-ium-1,2-diolates, also known as *NONOates* or “solid nitric oxide” (NO), have become popular tools in biomedical research since the discovery of NO as a very important multifunctional endogenous messenger. In contrast to other well-known NO donors, *NONOates* are capable of releasing NO spontaneously in aqueous media. The rate of NO liberation is determined by the molecular structure of the diazeniumdiolate and the pH value and temperature of the medium in which it is dissolved.

In this chapter, we introduce a novel device (the NOTizer) for simple and convenient preparation of diazeniumdiolates. It not only enables the user to provide all the necessary conditions for reliable synthesis such as anaerobic conditions and high pressure of NO gas in the translucent reaction chamber but also includes software that records the course of pressure and temperature online and calculates the consumption of NO by the reaction. The plot of the pressure decay shows the user completion of the reaction and allows the user to study kinetic characteristics from synthesis of different *NONOates*. A brief guide for the synthesis of *PYRRO/NO*, *DEA/NO*, *PAPA/NO*, *SPER/NO*, and *DETA/NO*, which are the most widely applied diazeniumdiolates, is presented in this chapter. Finally, characteristics of *NONOates* that need to be considered concerning analytics and storage are mentioned.

### Introduction

1-Substituted diazen-1-ium-1,2-diolates, also known as *NONOates*, are compounds of the general structure  $X-[N(O)NO]^-$ . According to the atom X, diazeniumdiolates can be classified in three major classes: *C*-, *O*-/*S*-, and *N*-bound diazeniumdiolates. Because the *N*-bound *NONOates* can directly release the endogenous mediator nitric oxide (NO), they are interesting

compounds from a biomedical point of view. One mole of diazeniumdiolate is capable of generating 2 mol of NO by acid-catalyzed dissociation according to Eq. (1) (Keefer *et al.*, 1996).



Organic nitrates are generally declared to be “NO donors,” but in contrast to diazeniumdiolates, they need to be bioactivated. The corresponding bioactivation processes are not yet completely understood, and the resulting bioactive species are still under discussion (Chen *et al.*, 2002; Chung and Fung, 1990). Nitrosothiols [e.g., *S*-nitroso-*N*-acetylpenicillamine (SNAP)] can be considered NO<sup>+</sup> donors rather than NO donors. In contrast to these compounds, *N*-diazeniumdiolates have proven to be excellent tools to demonstrate the physiological properties of NO *in vitro* and have gained importance as potential drugs for *in vivo* application. Innovative work on the development of novel NONOates and NONOate prodrugs, such as the liver-selective NO donor prodrug V-PYRRO/NO, has been performed by Saavedra *et al.* (1997) and others have reported on the development of thromboresistant NO-releasing polymeric coatings (Batchelor *et al.*, 2003; Keefer, 1998; Maragos *et al.*, 1991, 1993; Saavedra *et al.*, 1992, 1997, 2001; Woodward and Wintner, 1969; Zhang *et al.*, 2003).

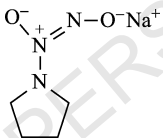
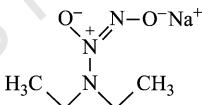
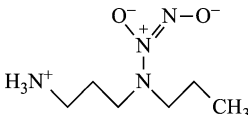
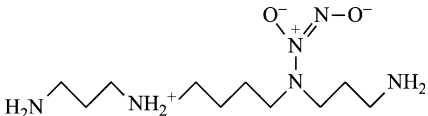
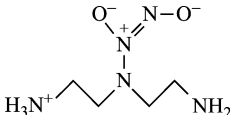
The most useful preparation of *N*-diazeniumdiolates is the direct exposure of a secondary amine, acting as a nucleophile, to several atmospheres of gaseous NO under anaerobic conditions in a suitable solvent and added base to keep the product in a stable anionic form (Keefer and Hrabie, 2002; Longhi *et al.*, 1962). We now introduce a novel device (NOtizer) that allows the convenient preparation of diazeniumdiolates, the monitoring of NO consumption, temperature pattern, and thus kinetic studies on the NONOate formation.

### NONOates as NO Donors in Biological Systems

The rate of NO release is determined by the molecular structure of the respective NONOate, pH value, and temperature of the solution in which the compound is dissolved. Concerning pH, the decomposition of diazeniumdiolates proceeds extremely slowly at a pH value of more than 9, at a moderate rate at physiological pH values, and almost instantaneously at acetic pH values (Davies *et al.*, 2001; Keefer *et al.*, 1996). Depending on the

structure of the parent nucleophile, the half-life of diazeniumdiolates ranges from a few seconds to several days, which grants access to versatile sources of NO adjustable to the requirements of the experiment (Lehmann *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2002). The structures of the most intensively described diazeniumdiolates and their corresponding half-lives are given in Table I (Hrabie *et al.*, 1993; Keefer *et al.*, 1996; Maragos *et al.*, 1991; Saavedra *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2002). Because the NO releasing rate of diazeniumdiolates may vary because of different conditions of the experiment, one should measure the NO release under study rather than rely on half-lives given in literature (Keefer *et al.*, 1996; Kröncke and Kolb-Bachofen, 1999).

TABLE I  
STRUCTURE AND HALF-LIVES OF THE MOST ESTABLISHED NONOATES

Name	Corresponding amine	Structure	Half-life (37°, pH 7.4)
PYRRO/NO	Pyrrolidine		3 s
DEA/NO	Diethylamine		2-4 min
PAPA/NO	N-propyl-1,3-propanediamine		15 min
SPER/NO	Spermine		40 min
DETA/NO	Diethylene-triamine		20 h

In addition to other advantages of diazeniumdiolates as direct NO donors ("solid NO"), NO production *in vitro* is not influenced by catalytic copper or iron ions, which guarantees the predictability and reproducibility of NO release. Besides delivering NO, NONOates themselves interact very little with other compounds in media, but nevertheless pharmacological investigations should go along with control experiments, using the amines resulting by cleavage of the respective diazeniumdiolates (Keefer *et al.*, 1996; Kröncke and Kolb-Bachofen, 1999; Thomas *et al.*, 2002). For example, the physiologically important polyamine spermine is the resulting nucleophile generated by dissociation of SPER/NO (Keefer *et al.*, 1996; Maragos *et al.*, 1993).

### Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Using the NOTizer

In the 1960s, Drago and Paulik (1960) and Drago and Karstetter (1960) reported on the reaction of NO with anhydrous diethylamine dissolved in ether at a temperature of  $-78^{\circ}$  using a three-necked flask and passing NO through the reaction mixture. In the 1990s, when the role of endogenous NO was recognized, interest in NO donors increased and the synthesis of diazeniumdiolates was reinvestigated and improved, mainly by Keefer, Saavedra, Hrabie, and others. These authors used a glass bottle placed in a standard hydrogenation apparatus with a pressure of up to 5 atm NO at room temperature (Lehmann, 2000; Maragos *et al.*, 1991).

To shift the equilibrium toward the product and to keep the evolving diazeniumdiolate in the stable anionic form, the presence of base is necessary (Keefer *et al.*, 1996). Usually, equimolar quantities of sodium or potassium methylate are added. Dry methanol or mixtures of methanol and ether can be considered solvents of first choice. It is important to consider that ethanol (specifically ethoxide), under alkaline conditions, reacts with NO to yield undesired products by Traube's degeneration (Keefer *et al.*, 2001; Traube, 1898; Woodward and Wintner, 1969). A study by Arnold *et al.* (2002) shows that commonly used acetonitrile is not recommendable, because it reacts with NO, yielding a C-bound polydiazeniumdiolate as byproduct. Because oxygen or water will lead to the corresponding ammonium nitrite salts or even toxic nitrosamines, dry solvents and anaerobic conditions are obligatory (Bonner, 1996; Hansen *et al.*, 1982; Keefer, 1998; Masuda *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2001).

Together with the Hyscho company, Bonn, Germany, we developed the NOTizer (Fig. 1), which is a modified hydrogenation apparatus.

As illustrated in Fig. 1, the NOTizer consists of a translucent pressure vessel as reaction chamber, stirrer, protective grating, regulator valves, indicators for pressure and temperature, and a computer with the



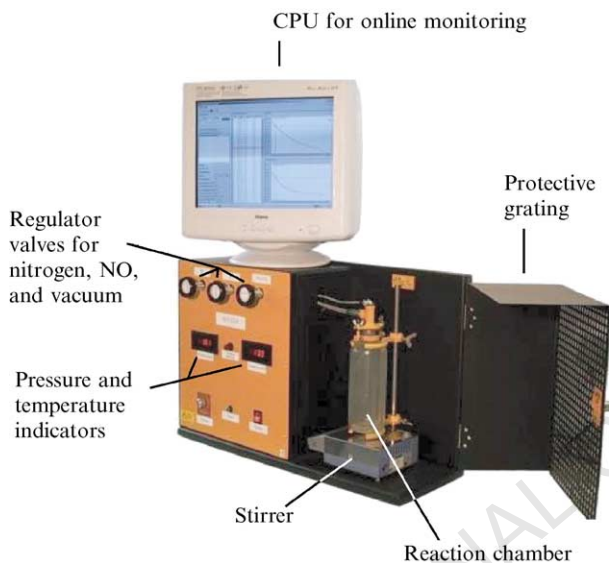


FIG. 1. The NOTizer for the preparation of diazeniumdiolates.

appropriate software to record the data obtained. The computer can plot the numerical values of pressure and temperature changes and calculate the consumption of NO in the course of the synthesis. Particularly, the pressure decay curves are of interest, because they inform about the progression of the synthesis and can be fitted with appropriate software. The fit of these curves permits the user to gain information about the reaction rate, the kinetic rate constant, and the kinetic order of the reaction.

To demonstrate the benefits of the NOTizer, we have synthesized the diazeniumdiolates displayed in Table I. Exactly 0.05 mol of the respective amines was assorted with dry methanol to give a final volume of 100 ml. Before adding the solvent to the amine, 0.05 mol of elementary sodium was dissolved in the methanol to produce the necessary base. The vessel was placed in the NOTizer, evacuated, and filled with nitrogen four consecutive times, and then it was evacuated again and NO was administered to give a pressure of 4 bar. The recording of the reaction was ended when no more decrease of pressure occurred. All reactions were performed at room temperature, and the (either immediately or after concentration) precipitated diazeniumdiolates were obtained by suction filtration and washed with ether. To compare the reaction rate of the respective amines, one can superpose the pressure decay curves (Fig. 2).

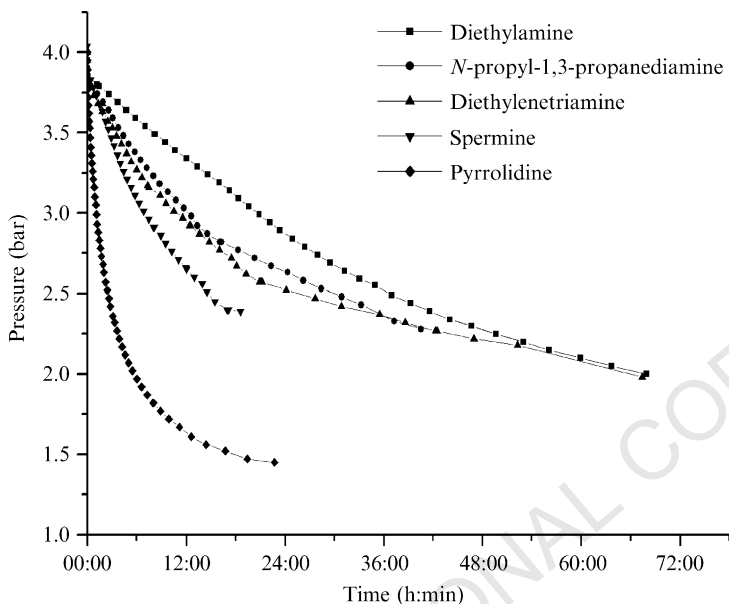


FIG. 2. Pressure decay curves for the reaction of diethylamine, *N*-propyl-1,3-propanediamine, diethylenetriamine, spermine, and pyrrolidine with nitric oxide.

The pressure decay curves in Fig. 2 show that steric and electronic effects have great influence on the reaction rate. For example, in reflection to the course of pressure decline, diethylamine shows a much slower reaction in comparison to pyrrolidine. These attained curves can be fitted with the appropriate computer software to reveal clues about the kinetic properties of the respective reaction.

It is noteworthy that if only formation of the product is desired, the addition of NO to give a pressure of 4–5 atm should be repeated until no appreciable amount of NO is consumed by the reaction, thus resulting in a higher yield. Figure 3 demonstrates how the consumption of NO decreases each time the pressure is raised back to 4.0 bar.

Because the software of the NOTizer also records the temperature pattern, we could demonstrate that formation of diazeniumdiolates is an exothermic reaction. Furthermore, it is possible to analyze the changes in reaction rate that occur with changes in temperature. Figure 4 shows the superposed pressure decay curves for the synthesis of PYRRO/NO at room temperature and under cooled conditions to point out this aspect.

As is expected from the collision theory, under ice-cold conditions the reaction rate slows and the yield of the product is slightly lower. It is

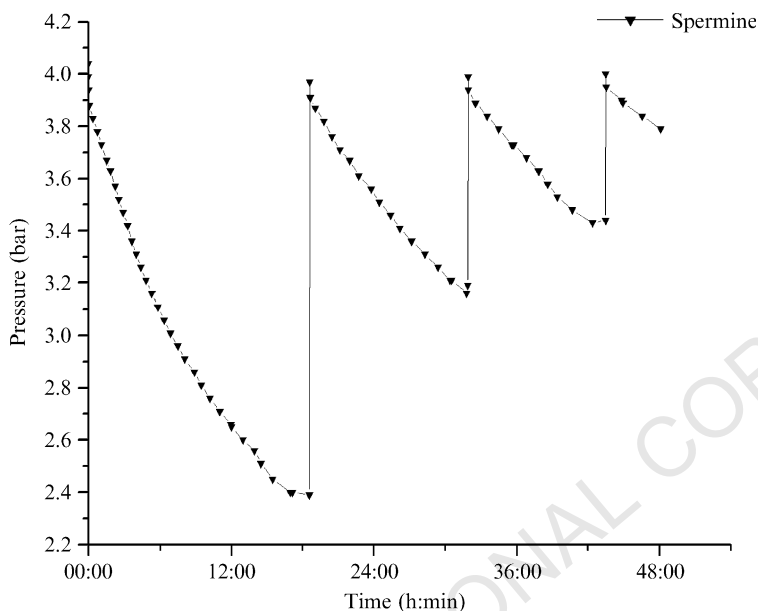


FIG. 3. Pressure decay curve for the synthesis of SPER/NO when inflowing NO repeatedly.

noteworthy that no improvement in quality or purity was attained at low temperature.

#### Characteristics of Diazeniumdiolates to be Considered

To confirm quality and purity of the synthesized NONOates, nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and elemental analysis are the most reliable techniques. A suitable solvent for the NMR spectroscopic analysis is  $D_2O$  with NaOD for alkaline conditions in which the compounds are kept in their stable anionic form. Using  $^1H$ -NMR spectroscopy, the signal of the protons bound to the alpha-C-atoms shows a downfield shift usually about 0.4–0.5 ppm compared to the amine. Another criterion for the quality of the formed product is, of course, that NO is released by the compound when dissolved in aqueous media. A commercially available NO-selective sensor can be used to determine the amount of NO being released. If the compound is pure, 1 mol of NONOate will generate 2 mol of NO. Because of the volatility of NO from solution, this method is not very convincing for the evaluation of purity (Thomas *et al.*, 2002). A superior method for quantitative acquisition of NO from solution is laser magnetic

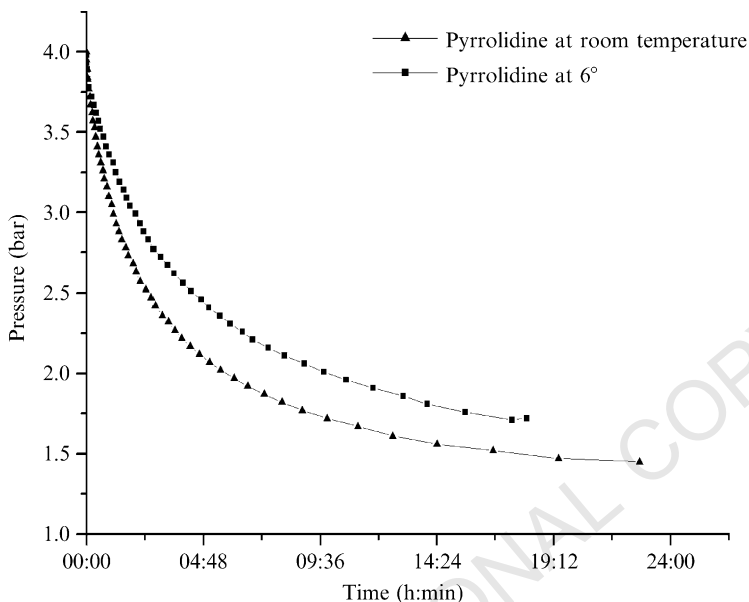


FIG. 4. Pressure decay curves when synthesizing PYRRO/NO at room temperature and under cooling.

resonance spectroscopy (LMRS) because NO is detected in its gaseous form and accumulatively over longer periods (Lehmann *et al.*, 2002).

Concerning the storage of diazeniumdiolates, Keefer *et al.* (1996) recommend storage in a refrigerator at 4° under dry nitrogen or argon atmosphere protected from moisture. Initial indications for the decomposition are agglutination and especially change in color.

## References

- Arnold, E. V., Citro, M. L., Keefer, L. K., and Hrabie, J. A. (2002). A nitric oxide-releasing polydiazeniumdiolate derived from acetonitrile. *Org. Lett.* **4**(8), 1323–1325.
- Batchelor, M. M., Reoma, S. L., Fleser, P. S., Nuthakki, V. K., Callahan, R. E., Shanley, C. J., Politis, J. K., Elmore, J., Merz, S. I., and Meyerhoff, M. E. (2003). More lipophilic dialkyldiamine-based diazeniumdiolates: Synthesis, characterization, and application in preparing thromboresistant nitric oxide release polymeric coatings. *J. Med. Chem.* **46**, 5153–5161.
- Bonner, F. T. (1996). Nitric oxide gas. *Methods Enzymol.* **268**, 50–57.
- Chen, Z., Zang, J., and Stamler, J. S. (2002). Identification of the enzymatic mechanism of the nitroglycerin bioactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 8306–8311.
- Chung, S. J., and Fung, H. L. (1990). Identification of the subcellular site for nitroglycerin metabolism to nitric oxide in bovine coronary smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **253**, 614–619.

- Davies, K. M., Wink, D. A., Saavedra, J. E., and Keefer, L. K. (2001). Chemistry of the diazeniumdiolates, 2: Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 5473–5481.
- Drago, R. S., and Karstetter, B. R. (1960). The reactions of nitrogen(II) oxide with various primary and secondary amines. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1819–1822.
- Drago, R. S., and Paulik, F. E. (1960). The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 96–98.
- Hansen, T. J., Croisy, A. F., and Keefer, L. K. (1982). *N*-nitrosation of secondary amines by nitric oxide via the “Drago complex.” *IARC Sci. Publ.* **41**, 21–29.
- Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. A., and Keefer, L. K. (1993). New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.* **58**, 1472–1476.
- Keefer, L. K. (1998). Nitric oxide-releasing compounds: From basic research to promising drugs. *Chemtech.* **28**(8), 30–35.
- Keefer, L. K., Flippen-Anderson, J. L., George, C., Shanklin, A. P., Dunams, T. M., Christodoulou, D., Saavedra, J. E., Sagan, E. S., and Bohle, D. S. (2001). Chemistry of the diazeniumdiolates, I: Structural and spectral characteristics of the [N(O)NO]-functional group. *Nitric Oxide* **5**(4), 377–394.
- Keefer, L. K., and Hrabie, J. A. (2002). Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate (“nitrosohydroxylamine”) functional group and its oxygen-substituted derivatives. *Chem. Rev.* **102**, 1135–1154.
- Keefer, L. K., Nims, R. W., Davies, K. M., and Wink, D. A. (1996). “NONOates” (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol.* **268**, 281–293.
- Kröncke, K. D., and Kolb-Bachofen, V. (1999). Measurement of nitric oxide-mediated effects on zinc homeostasis and zinc finger transcription factors. *Methods Enzymol.* **301**, 126–135.
- Lehmann, J. (2000). Nitric oxide donors—Current trends in therapeutic applications. *Expert Opin. Ther. Pat.* **10**(5), 559–574.
- Lehmann, J., Horstmann, A., Menzel, L., Gäbler, R., Jentsch, A., and Urban, W. (2002). Release of nitric oxide from novel diazeniumdiolates monitored by laser magnetic resonance spectroscopy. *Nitric Oxide Biol. Ch.* **6**(2), 135–141.
- Longhi, R., Ragsdale, R. O., and Drago, R. S. (1962). Reactions of nitrogen(II) oxide with miscellaneous Lewis bases. *Inorg. Chem.* **1**, 768–770.
- Maragos, C. M., Morley, D., Wink, D. A., Dunams, T. M., Saavedra, J. E., Hoffman, A., Bove, A. A., Isaac, L., Hrabie, J. A., and Keefer, L. K. (1991). Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *J. Med. Chem.* **34**(11), 3242–3247.
- Maragos, C. M., Wang, J. M., Hrabie, J. A., Oppenheim, J. J., and Keefer, L. K. (1993). Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the *in vitro* proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res.* **53**, 564–568.
- Masuda, M., Mower, H. F., Pignatelli, B., Celan, I., Friesen, M. D., Nishino, H., and Ohshima, H. (2000). Formation of *N*-nitrosamines and *N*-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxyxynitrite and other reactive nitrogen species: Comparison with nitrotyrosine formation. *Chem. Res. Toxicol.* **13**(4), 301–308.
- Saavedra, J. E., Billiar, T. R., Williams, D. L., Kim, Y.-M., Watkins, S. C., and Keefer, L. K. (1997). Targeting nitric oxide (NO) delivery *in vivo*. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *J. Med. Chem.* **40**, 1947–1954.
- Saavedra, J. E., Dunams, T. M., Flippen-Anderson, J. L., and Keefer, L. K. (1992). Secondary amine/nitric oxide complex ions, R<sub>2</sub>N[N(O)NO]-. O-Functionalization chemistry. *J. Org. Chem.* **57**(23), 6134–6138.

- Saavedra, J. E., Srinivasan, A., Bonifant, C. L., Chu, J., Shanklin, A. P., Flippen-Anderson, J. L., Rice, W. G., Turpin, J. A., Davies, K. M., and Keefer, L. K. (2001). The secondary amine/nitric oxide complex ion  $R(2)N[N(O)NO](-)$  as nucleophile and leaving group in  $S_NAr$  reactions. *J. Org. Chem.* **66**(9), 3090–3098.
- Srinivasan, A., Kebede, N., Saavedra, J. E., Nikolaitchik, A. V., Brady, D. A., Yourd, E., Davies, K. M., Keefer, L. K., and Toscano, J. P. (2001). Chemistry of the diazenium-diolates, 3: Photoreactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **123**(23), 5465–5472.
- Thomas, D. D., Miranda, K. M., Espey, M. G., Citrin, D., Jourdain, D., Paolucci, N., Hewett, S. J., Colton, C. A., Grisham, M. B., Feelisch, M., and Wink, D. A. (2002). Guide for the use of nitric oxide (NO) donors as probes of the chemistry of NO and related redox species in biological systems. *Methods Enzymol.* **359**, 84–105.
- Traube, W. (1898). Über synthesen stickstoffhaltiger verbindungen mit hilfe des stickoxyds. *Liebigs Ann. Chem.* **300**, 81–128.
- Woodward, R. B., and Wintner, C. (1969). The methoxazonyl group. *Tetrahedron Lett.* **32**, 2689–2692.
- Zhang, H., Annich, G. M., Miskulin, J., Stankiewicz, K., Osterholzer, K., Merz, S. I., Bartlett, R. H., and Meyerhoff, M. E. (2003). Nitric oxide-releasing fumed silica particles: Synthesis, characterization, and biomedical application. *J. Am. Chem. Soc.* **125**(17), 5015–5024.

### [3] Quantum Mechanical Determinations of Reaction Mechanisms, Acid Base, and Redox Properties of Nitrogen Oxides and Their Donors

By ANDREW S. DUTTON, JON M. FUKUTO, and K. N. HOUK

#### Abstract

This chapter reviews computational methods based on quantum mechanics and commonly used commercial programs for the exploration of chemical phenomena, particularly in the field of nitrogen oxides. Examples from the literature are then used to demonstrate the application of these methods to the chemistry and biochemistry of various nitrogen oxides. These examples include determining reaction mechanisms using computed reaction energies, predicting rates of reactions using transition state theory, and determining chemical properties such as hydration equilibria,  $pK_{a,s}$ , and reduction potentials.

#### Introduction

Nitrogen oxides have a rich history in the study of atmospheric and biological chemistry. The studies of Paul Crutzen and others demonstrate that nitrogen oxides could catalyze the decomposition of ozone. This work led to the Nobel Prize in Chemistry for Crutzen in 1995. Three years later,

## Veröffentlichung 2

**Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Monitored by the "NOtizer" Apparatus: Relationship between Formation Rates, Molecular Structure and the Release of Nitric Oxide**

Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din A. A.; El-Emam, Ali;  
Lehmann, Jochen. *European Journal of Organic Chemistry* (2007), 4,  
616-624.

# Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Monitored by the “NOTizer” Apparatus: Relationship between Formation Rates, Molecular Structure and the Release of Nitric Oxide<sup>[‡]</sup>

Joerg Konter,<sup>[a]</sup> Gamal El-Din A. A. Abu-Rahma,<sup>[b]</sup> Ali El-Emam,<sup>[c]</sup> and Jochen Lehmann\*<sup>[a]</sup>

**Keywords:** Diazeniumdiolate / NONOate / Nitric oxide / NO donors

Nitrogen-bound diazen-1-ium-1,2-diolates (diazeniumdiolates, “NONOates”, “solid NO”) are generally prepared from secondary amines and nitric oxide and are compounds of first choice for the direct release of nitric oxide (NO). First, we report on the relationships between the structures of the amines and the formation rates of the corresponding NONOates, second on the structures of the NONOates and the rate of NO release and finally between the rates of NONOate formation and NO release from these species. A series of differently sized and substituted cyclic and aliphatic amines were used to quantify the reactivity of amines towards NO by monitoring the decrease in NO pressure with the NOTizer, an apparatus developed for this study. The release of NO was measured amperometrically with an NO-sensitive electrode and the half-lives of novel diazeniumdiolates were determined by UV spectroscopy. It was found that steric hindrance

and heteroatomic substituents in the amines' side chains reduce the formation rates of the sodium salts of the NONOates and also slow down NO release from them. Exceptions were found with piperidine-2-carboxylic acid derivatives which react to give NONOates more slowly than piperidine but release NO much faster despite steric hindrance. A secondary amine carrying an additional primary amine reacted quickly with NO, but the corresponding NONOate showed slower release of NO owing to the formation of an intramolecular NONOate salt as well as the sodium salt derivative. Azetidine reacts faster with NO than all of the other amines, but decomposition of the corresponding NONOate proved to be unexpectedly slow.

(© Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, Germany, 2007)

## Introduction

Nitrogen-bound diazen-1-ium-1,2-diolates **2** (NONOates) are used as biomedical tools to mimic the physiological role of nitric oxide in vitro, but they are also potential drugs and have uses as molecular components in NO-releasing prodrugs, biomaterials and hybrid drugs.<sup>[2–6]</sup> NONOates imply the functional group [N(O)NO]<sup>–</sup> and in solution they are capable of donating NO directly into the media in a pH-, temperature- and structure-dependent manner. The release of NO is accelerated by lowering the pH and increasing the temperature.<sup>[7]</sup> Literature data demonstrate that decomposition rates of NONOates are mainly determined by their structure (Figure 1).<sup>[7–11]</sup> Zwitterionic oligoamine NONOates such as DETA/NO, SPER/NO and PAPA/NO

have rather long half-lives, whereas sodium salt diazeniumdiolates like DEA/NO, PYRRO/NO, Na-PIPERAZI/NO and PIPECO/NO are comparatively quick releasers and within both groups the rate of decomposition is modulated by the individual structures.

NONOates are generally synthesized in a stainless steel standard hydrogenation apparatus or an autoclave in which the dissolved amine is exposed to several atmospheres of nitric oxide.<sup>[8,9]</sup> Sodium methoxide is used in the synthesis of sodium salt diazeniumdiolates [Equation (1)], whereas no additional base is needed in the formation of intermolecular ammonium salts [Equation (2)] or zwitterionic compounds [Equation (3)].

We recently developed the “NOTizer”, a modified and improved hydrogenation apparatus for the specific synthesis of NONOates.<sup>[12]</sup> Besides several attributes that simplify the synthesis, the NOTizer features a PC-interface linked to a computer with appropriate software that allows the continuous on-line recording and graphical illustration of the pressure and temperature pattern in the reaction chamber. Further details are provided in the Experimental Section.

The effect of pH, temperature, light and the NONOates' molecular structure on dissociation rates has been described in previous publications.<sup>[8,9,13–23]</sup> The influence of these pa-

[‡] NO Donors, Part 11. Part 10: Ref.<sup>[1]</sup>

[a] Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Friedrich-Schiller-University Jena, Philosophenweg 14, 07743 Jena, Germany  
Fax: +49-3641-949802

[b] Faculty of Pharmacy, Medicinal Chemistry Department, Minia University, Minia, 61519 Egypt

[c] College of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, King Saud University, P. O. Box 2457, Riyadh, 11451 Egypt



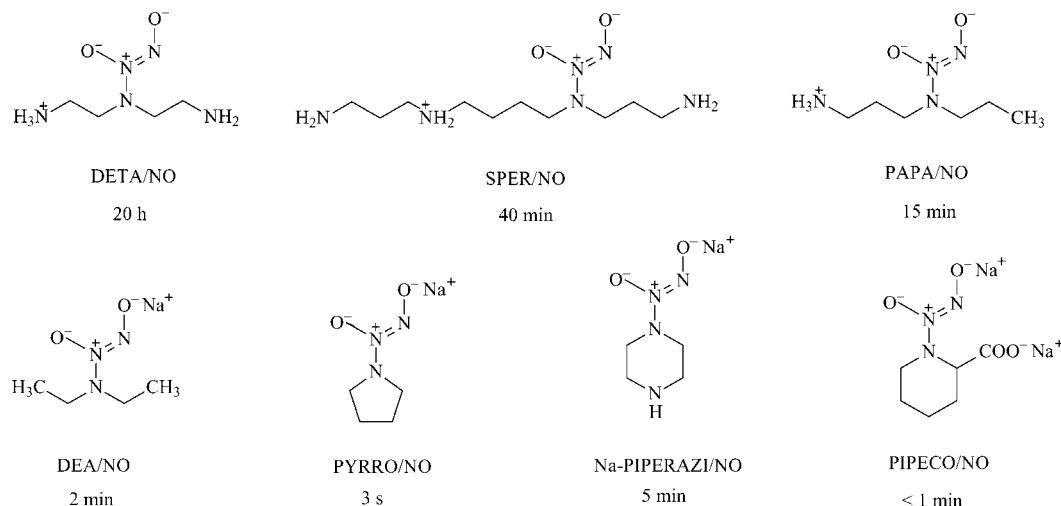
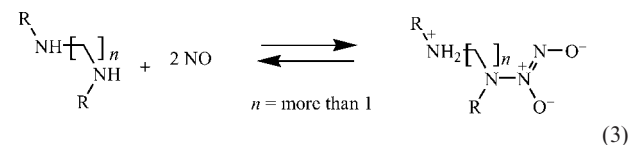
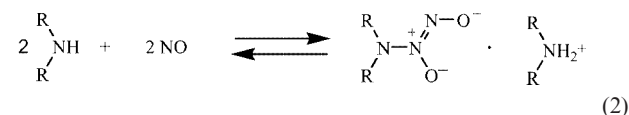
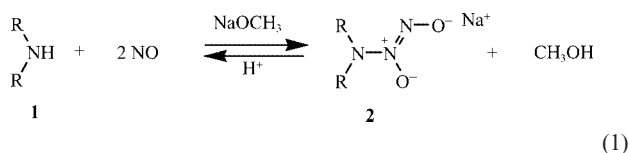


Figure 1. Zwitterionic and sodium salt NONOates with their corresponding half-lives at pH 7.4 and 37 °C.<sup>[7–11]</sup>



Parameters on diazeniumdiolate formation, however, has not been investigated systematically to date. By using the NOTizer we have been able to study the relationships between the steric (i.e. constraints due to hybridization of the amine nitrogen atom or congestion near to it) and electronic properties of the secondary amine acting as a nucleophile and the progress and rate of NONOate formation by measuring the amount (volume) of NO removed per unit time. Because we would rather focus on the “practical” reactivity of the amines under conditions that are commonly applied in diazeniumdiolate synthesis and not on the theoretical formation rates, and because all of the experiments were performed under identical standard conditions, comparison of the reactivities of different amines is meaningful. To simplify matters we use the term “formation rate” to describe the data we have obtained from the recording of NO consumed in the reaction with amines. Furthermore, we have investigated the correlation between the formation rates of NONOates and their dissociation in order to design compounds that allow controlled release of nitric oxide.

## Results and Discussion

The structures of amines **1a–v** leading to corresponding diazeniumdiolates **2a–v** [see Equation (1)] are given in Figure 2.

### Effect of Ring Size of Cyclic Amines/NONOates

A set of cyclic amines with 3–6 methylene groups was transformed into the corresponding NONOate sodium salts. The pressure–time plots were recorded in order to estimate the formation rates. The NO release from isolated NONOates was characterized with a nitric oxide sensor. The half-lives of the diazeniumdiolates were determined by UV spectroscopy at pH 7.4 at 37 °C. The results are illustrated in Figure 3 and Table 1(I). The decrease in ring size of the cyclic amine parallels the higher reactivity of the amine towards nitric oxide. The formation rate for compound **2a** is a factor of 1.73 higher than for **2c**, and for **2b** it is 1.44 higher than that of **2c**. The formation rates for **2c**, **2d** and **2e** are nearly identical. Steric ring strain due to abnormal bonding angles exists in **1a** but not significantly in **1b**. It can be concluded, therefore, that the reactivity of cyclic amines towards NO increases as the steric interference around the basic nitrogen atom decreases. This can be demonstrated impressively by comparing the reactivities of the sterically rigid pyrrolidine (**1b**) and the highly flexible diethylamine (**1l**) (see Figure 3). Furthermore, when comparing the mole ratio of NO consumed/amine for cyclic (Table 1, column D) and aliphatic amines (Table 2, column D) it is found that all of the cyclic amines, with the exception of compounds **1h** and **1k**, have a higher reactivity towards NO than the aliphatic and benzylamines.

Unexpectedly, **2a** turned out to be a rather slow releaser, whereas the other cyclic NONOates did not show significant differences in dissociation at pH 6.4. To verify this result, the decomposition of NONOates **2a**, **2b** and **2c** was monitored by UV spectroscopy. Figure 4(A) illustrates the decrease in UV absorption of these compounds dissolved

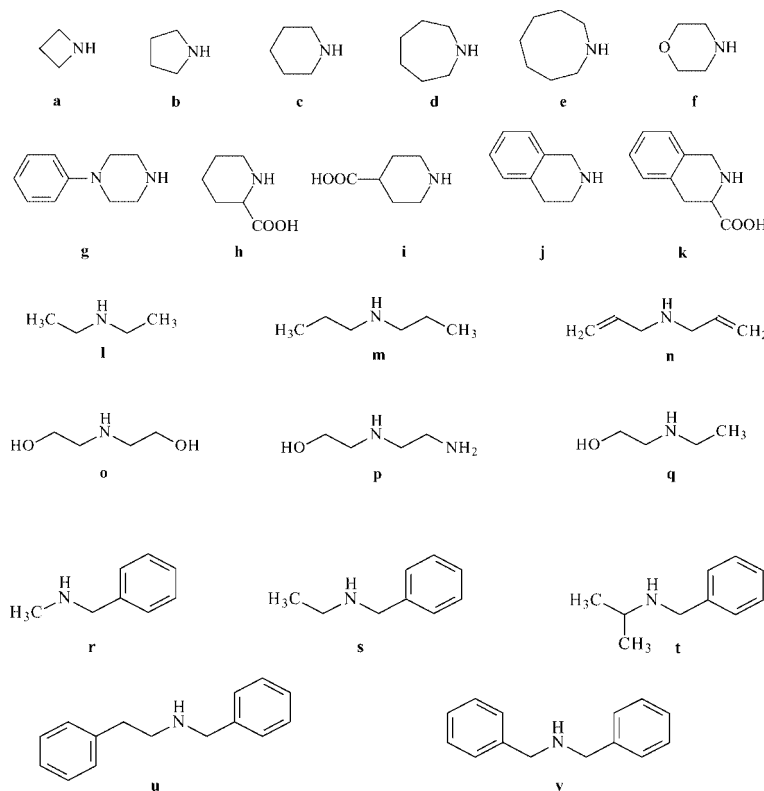


Figure 2. Amines **1a–v** used in the preparation of diazeniumdiolates **2a–v** [see Equation (1)].

in phosphate buffer at pH 7.4 at 37 °C. Again, compound **2a** decomposes much more slowly ( $k = 8.13 \times 10^{-3}$ ; half-life ca. 1.5 min) following a first-order kinetic curve [Figure 4(B)], as demonstrated previously for other NONOates.<sup>[8,14]</sup> It could be expected that the rate of decomposition of the NONOates increases with decreasing ring size; however, this only tends to be the case when comparing **2c–e** with **2b**. Possible reasons for the slower release of NO from **2a** are being explored.

#### Effect of Molecular Modifications in Six-Membered Cyclic Amines/NONOates

Not only steric but also electronic properties affect the formation and dissociation of NONOates. Some modified piperidine derivatives (**1f–k**) were selected to measure the progress of the reaction with NO and to compare it with the release of NO from corresponding NONOates **2f–k**. Figure 5 and Table 1(II) illustrate the results obtained using

Table 1. Formation and NO release data for cyclic amines **1/2a–k**.

Compound	Formation				NO release		
	A <sup>[a]</sup>	B <sup>[b]</sup>	C <sup>[c]</sup>	D <sup>[d]</sup>	Maximum [s] (NO electrode)	Half-life [s] (UV spectr.)	
I	<b>1a<sup>[e]</sup>/2a</b>	2.55 (1.73)	16:45	1.25	1.51	75.3 ± 2.8	85.2
	<b>1b<sup>[e]</sup>/2b</b>	2.11 (1.44)	19:24	1.45	1.39	29.3 ± 1.5	3.6
	<b>1c<sup>[e]</sup>/2c</b>	1.47 (1.00)	19:48	1.99	1.10	36.3 ± 3.2	18.9
	<b>1d<sup>[e]</sup>/2d</b>	1.43 (0.97)	31:15	1.82	1.08	29.3 ± 2.3	3.6
	<b>1e<sup>[e]</sup>/2e</b>	1.52 (1.03)	21:02	1.92	1.12	29.0 ± 2.6	4.7
II	<b>1f<sup>[e]</sup>/2f</b>	1.40 (0.95)	26:31	1.69	1.08	100.0 ± 11.9	152.3
	<b>1g<sup>[e]</sup>/2g</b>	1.17 (0.80)	24:32	2.16	1.00	82.0 ± 3.4	263.5
	<b>1h<sup>[e]</sup>/2h</b>	0.48 (0.33)	23:48	2.78	0.65	32.0 ± 1.0	6.1
	<b>1i<sup>[e]</sup>/2i</b>	1.24 (0.84)	20:14	2.19	0.98	39.6 ± 3.0	22.6
	<b>1j<sup>[e]</sup>/2j</b>	1.36 (0.93)	21:28	2.01	1.08	38.3 ± 2.8	29.3
	<b>1k<sup>[e]</sup>/2k</b>	0.45 (0.31)	45:48	2.65	0.61	27.3 ± 3.2	6.8

[a] Decrease in pressure (pressure descent) [bar] within the first 7 h (ratio compd./1e). [b] End of reaction [hh:mm]. [c] Remaining pressure [bar]. [d] Mole ratio of NO consumed/amine. [e] 0.05 mol amine was used in the synthesis.

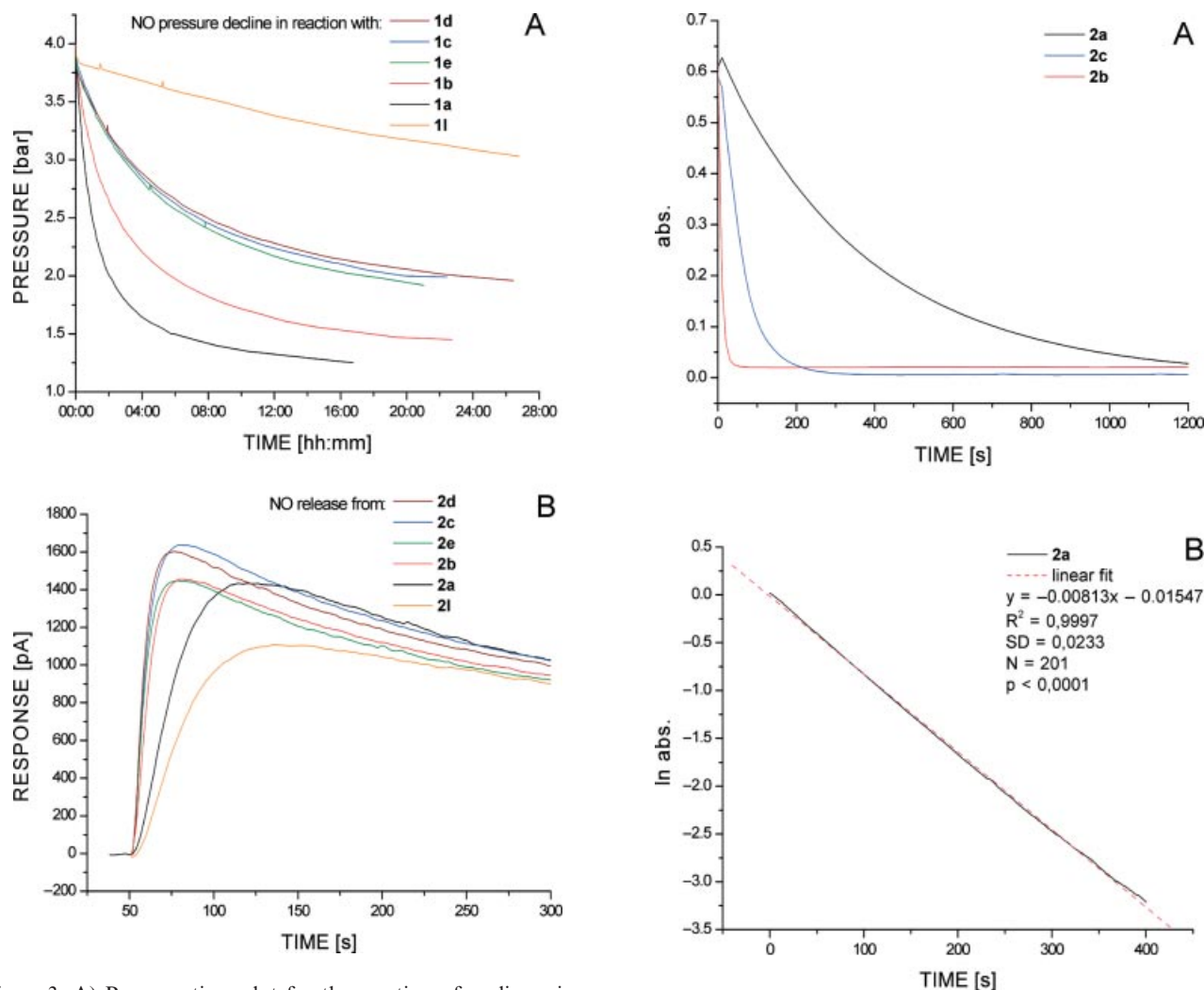


Figure 3. A) Pressure–time plot for the reaction of cyclic amines and **2l** with NO. B) NO release measured with an NO electrode.

**2c** as a reference. Substituents and heteroatoms attached or incorporated into the cyclic molecules cause a decrease in the rate of NONOate formation. This is especially pro-

Figure 4. A) UV absorption for NONOates **2a–c** at 251 nm in phosphate buffer at pH 7.4 at 37 °C over 30 min. B) Linear fit of the natural logarithm of the UV absorption with time for compound **2a**.

Table 2. Formation and NO release data for aliphatic and benzylamines **1/2l–v**.

Compound	Formation				NO release		
	A <sup>[a]</sup>	B <sup>[b]</sup>	C <sup>[c]</sup>	D <sup>[d]</sup>	Maximum [s] (NO electrode)	Half-life [s] (UV spectr.)	
<b>I</b>	<b>1l</b> <sup>[e]</sup> / <b>2l</b>	1.04 (1.12)	37:29	1.87	0.57	85.5 ± 4.4	112.3
	<b>1m</b> <sup>[e]</sup> / <b>2m</b>	0.93 (1.00)	61:54	1.70	0.56	70.2 ± 9.8	93.2
	<b>1n</b> <sup>[e]</sup> / <b>2n</b>	1.20 (1.29)	38:01	1.68	0.63	131.2 ± 14.9	246.6
<b>II</b>	<b>1o</b> <sup>[e]</sup> / <b>2o</b>	0.73 (0.78)	44:04	2.11	0.59	266.0 ± 2.0	456.0
	<b>1p</b> <sup>[e]</sup> / <b>2p</b>	1.29 (1.39)	37:25	1.55	0.66	1765.0 ± 209.0	7498.9
	<b>1q</b> <sup>[e]</sup> / <b>2q</b>	1.04 (1.12)	62:48	1.56	0.65	116.4 ± 18.7	206.9
<b>III</b>	<b>1r</b> <sup>[e]</sup> / <b>2r</b>	2.11 (2.26)	36:54	0.94	0.84	50.6 ± 0.5	56.7
	<b>1s</b> <sup>[e]</sup> / <b>2s</b>	1.00 (1.07)	60:34	1.71	0.62	146.6 ± 16.6	302.0
	<b>1t</b> <sup>[e]</sup> / <b>2t</b>	0.55 (0.59)	69:39	2.66	0.37	911.0 ± 147.2	7036.1
	<b>1u</b> <sup>[e]</sup> / <b>2u</b>	0.82 (0.88)	65:57	1.88	0.56	233.0 ± 11.0	537.3
	<b>1v</b> <sup>[e]</sup> / <b>2v</b>	0.78 (0.84)	38:28	2.10	0.53	260.3 ± 5.0	679.5

[a] Decrease in pressure [bar] within the first 7 h (ratio compd./**1m**). [b] End of reaction [hh:mm]. [c] Remaining pressure [bar]. [d] Mole ratio of NO consumed/amine. [e] 0.1 mol amine was used in the synthesis.

nounced for amines with a carboxylic functional group in the *ortho*-position to the reactive nitrogen atom (**1h** and **1k**). The neighbouring carboxylic function slows down NONOate formation. On the other hand, the carboxylic group clearly catalyses the decomposition of the corresponding NONOates to produce NO very rapidly, which was first demonstrated by Saavedra et al. with PROLI/NO (proline).<sup>[17]</sup> The presence of heteroatoms, for example in **2f** or **2g**, slows down the release of NO relative to **2c** by a factor of two to three.

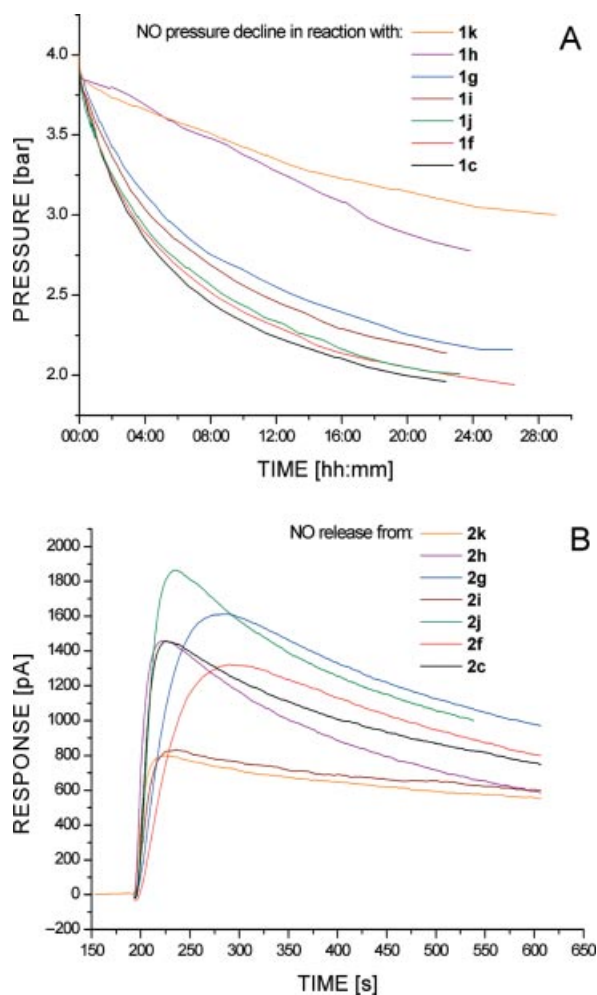


Figure 5. A) Pressure–time plot for the reaction of substituted cyclic amines with NO. B) NO release measured with an NO electrode.

### Influence of Substitution in Noncyclic Derivatives

A series of noncyclic amines with different alkyl chains were transformed into NONOates. Diethyl- (**1l**), dipropyl- (**1m**) and diallylamine (**1n**) served as simple alkylamines, the latter to study the effect of double bonds in the  $\beta$ - $\gamma$  position with respect to the secondary amine, whereas different hydroxy-, amino- and benzyl-substituted amines were studied to exemplify other electronic and steric effects. Figures 6, 7 and 8 as well as Table 2 show the kinetics for the synthesis of NONOates and the release of NO.

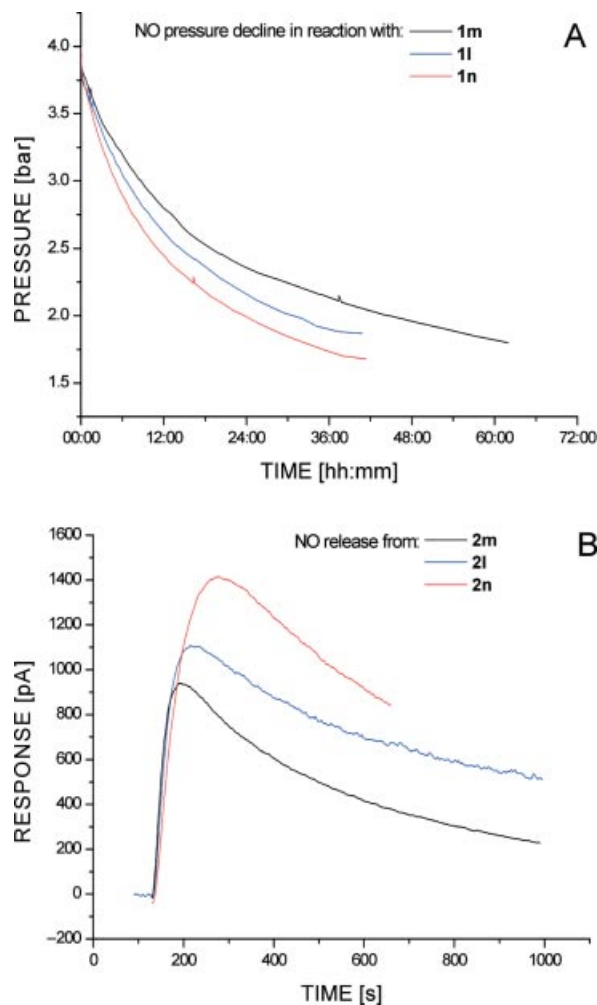


Figure 6. A) Pressure–time plot for the reaction of alkylamines with NO. B) NO release measured with an NO electrode.

The data in Figure 6 and Table 2(I) demonstrate that the double bonds in **1n** accelerate the synthesis relative to saturated analog **1m**, whereas **1l** has an intermediate reactivity. The same sequence, but reversed, appears in the rate of liberation of NO, with **2n** being the slowest releaser and **2m** the fastest liberator. The results presented in Figure 7 and Table 2(II) show that hydroxy groups (**1o** compared with **1l** and **1m**) generally hamper the formation of NONOates. In contrast, the formation of **2q** is faster than the formation of non-hydroxylated **2m** since ethyl is less bulky than propyl (see Figure 6). The NO release rate is generally reduced by the presence of hydroxy groups. Accordingly, the maximum NO release is shifted to the right to a greater extent with two hydroxy groups (**2o**) than with just one (**2q**). By far the slowest NO releaser is **2p**. It is likely that **1p** and NO produce the usual NONOate sodium salt but also the intramolecular ammonium salt as well, which is a slow releaser, as outlined in the Introduction section. The <sup>1</sup>H NMR spectrum of **2p** exhibits a minor triplet (20 mol-%) at  $\delta = 2.6$  ppm for the methylene group neighbouring the protonated amine and a major triplet at  $\delta = 2.27$  ppm for the corresponding methylene group in the so-

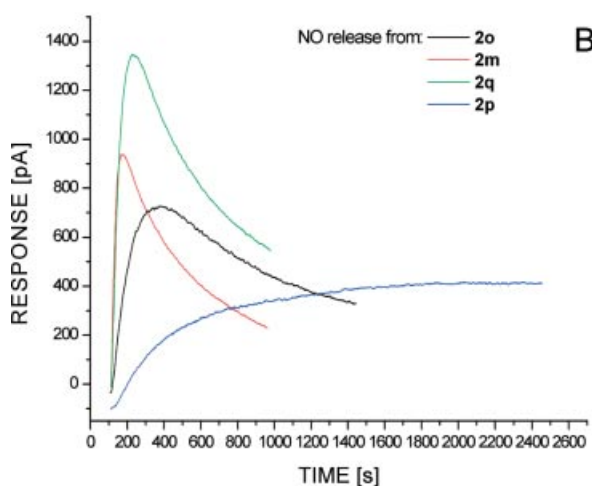
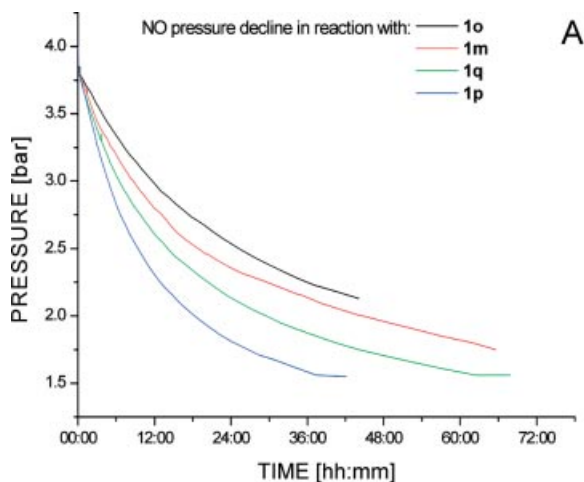


Figure 7. A) Pressure–time plot for the reaction of substituted alkylamines with NO. B) NO release measured with an NO electrode.

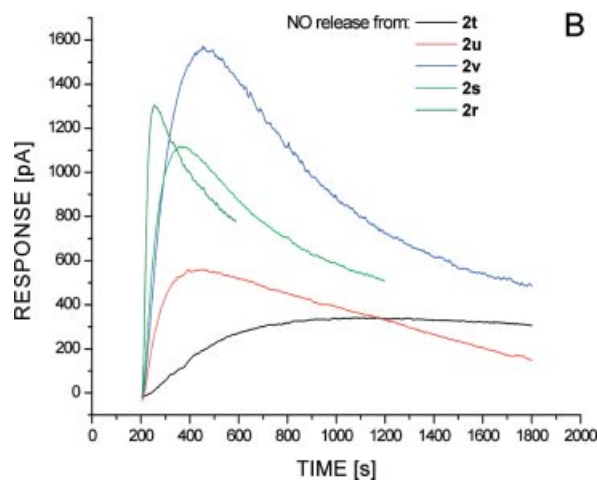
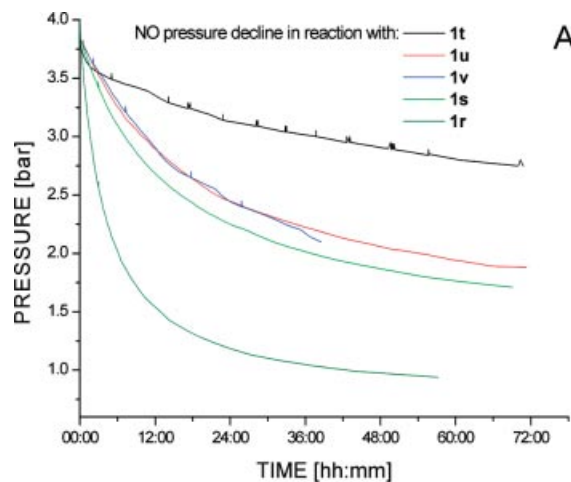


Figure 8. A) Pressure–time plot for the reaction of benzylamines with NO. B) NO release measured with an NO electrode.

dium salt. Nevertheless, the additional primary amino function in **1p** accelerates the formation of the corresponding NONOate.

Furthermore, the effect of steric hindrance in the secondary aliphatic amines reacting with NO can be demonstrated with the benzylamine derivatives. As shown in Figure 8 and Table 2(III), an isopropyl moiety (**1t**) causes a total NO consumption of just over 1.3 bar within a reaction time of 70 h, while the amine with a methyl moiety (**1r**) consumes more than 3 bar of NO in total and an amount four-fold higher in the first 7 h. Only minor differences in the reaction rates of **1u**, **1v** and **1s** could be observed. Analysis of the release of NO again demonstrates that an increase in steric hindrance decelerates the rate of NO liberation from the NONOates in solution (compare **2r** with **2s**, **2s** with **2t** and **2u** with **2v**). The synthesis of diazeniumdiolates derived from amines like diisopropylamine, di-*sec*-butylamine, dicyclohexylamine or 2,2,6,6-tetramethylpiperidine was not successful, as evidenced by an NO consumption that was close to zero.

### Correlation between NONOate Formation and Decomposition

The correlation between NONOate formation and decomposition is visualized in Figure 9. It can be observed that steric hindrance around the secondary amine as well as heteroatomic substitutions in the amine's backbone clearly hamper the bonding of NO to the amine's nitrogen atom and the formation of the NONOate is slowed. Because of their reduced conformational flexibility, cyclic amines show much higher reaction rates than aliphatic amines, whereas the effect of heteroatomic substituents on slowing the reaction progress can be observed in both cyclic and aliphatic amines. Phenyl substituents in the  $\alpha$  position are well-tolerated with regard to NONOate formation (compare **1l** with **1s** and **1u** with **1v** in Table 2), whereas the introduction of a second substituent in the  $\alpha$  position – even a small methyl group giving an isopropyl derivative (**1t**) – inhibits the reaction with NO dramatically (compare **1c** with **1h** and **1j** with **1k** in Table 1 and **1s** with **1t** in Table 2).

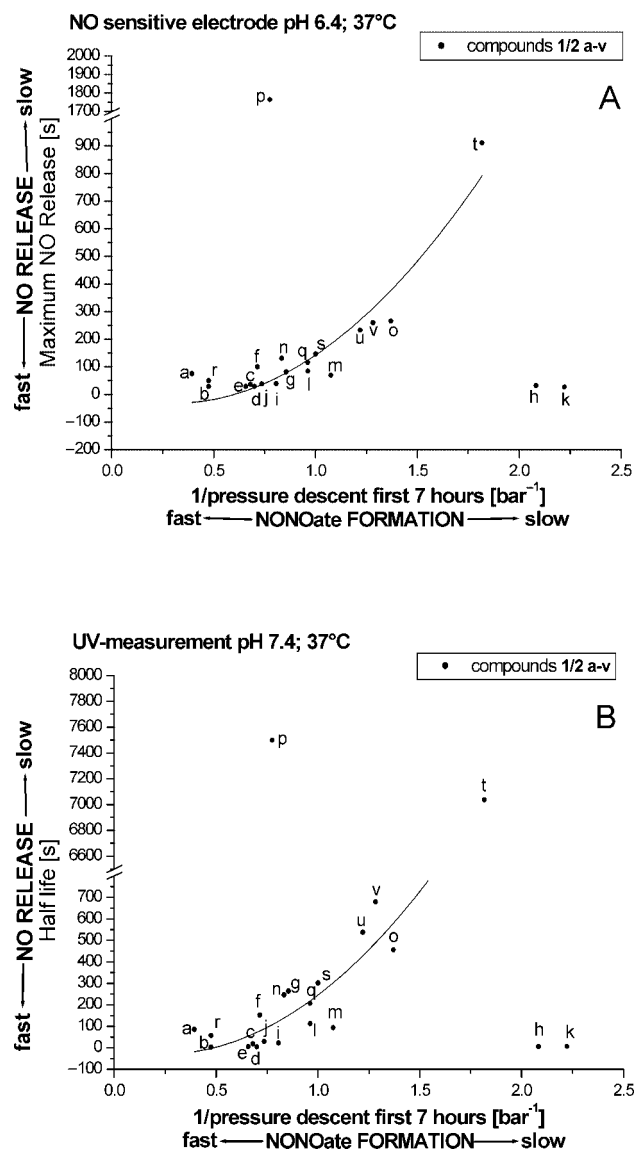


Figure 9. Relationship between NONOate formation and NO release for compounds 1/2a–v. A) Ordinate: maximum release [s] measured with an NO-sensitive electrode at pH 6.4 at 37 °C. B) Ordinate: half-lives from UV measurements at pH 7.4 at 37 °C.

In general, a slow formation of NONOates yields slow NO releasers and vice versa, but remarkable exceptions, for example, 1/2h,k,p, are evident. Sterically demanding substitution by carboxy or dimethyl (i.e. the isopropyl moiety) groups in the position  $\alpha$  to the amine, as found in compounds 1h, 1k and 1t, causes slow NONOate formation, but only compound 2t shows the expected slow NO release. The *ortho*-carboxy function in 2h and 2k is certainly considered to be bulky, but on the other hand it clearly catalyzes the decomposition of the NONOates. Compounds 1/2p are exceptional as well; the partial formation of the intramolecular salt contributes to a rather fast formation the NONOate, but this product is the slowest NO releaser of all the compounds investigated. Less obvious, owing to the scaling in Figure 9, is the exceptional pair of compounds 1/2a. Compound 1a was found to be the fastest reacting

amine, but 2a was not the fastest NO releaser. In fact it was found to be the slowest releaser of the unsubstituted cyclic NONOates.

### Significance of the Results

The direct controlled release of nitric oxide from water-soluble compounds is of great interest not only for their use as tools to simulate physiological conditions in vitro, but also in drugs and biomaterials with therapeutic roles.<sup>[4,24]</sup> The “NOtizer” represents a modified hydrogenation apparatus which simplifies the synthesis of NONOates and allows the decrease in NO pressure to be recorded on-line. The rates of formation of the NONOates and the end of the reaction can be easily determined by this approach. The collected data can be used to predict NONOate formation and decomposition rates for novel compounds and therefore simplify their design.

We have also demonstrated that both amperometry and UV spectroscopy can be used to determine the liberation profile of different NONOates. Whether the pH is 6.4 or 7.4, the order of decreasing rate of NO release from NONOates is nearly identical [compare Figure 9(A) and (B)]. The advantage of the NO-sensitive electrode lies in its higher throughput which allows the rate of NO release from the tested NONOate to be assessed. However, the half-life cannot be determined by this method which can be regarded as a disadvantage.

### Experimental Section

**Acquisition of Pressure-Time Plots in the Formation of NONOates:** Chemicals were purchased from VWR International Merck KGaA, Darmstadt, and Linde AG, Unterschleissheim, Germany (NO gas 2.5 UN–Nr. 1660), and used without further treatment unless noted otherwise. All reactions in the NOtizer were conducted without any heating or cooling. The structures of amines 1a–v, leading to the corresponding diazeniumdiolates 2a–v [see Equation (1)], are given in Figure 2. To ensure comparability, all reactions were performed in methanol, which was dried before use and kept under an atmosphere of dry nitrogen. Elementary sodium was dissolved in methanol and the solution was filtered and added to an equimolar amount of amine, although two-fold molar quantities of sodium were added to amines 1h, 1i and 1k. The initial quantity of amine was 0.05 mol for cyclic amines 1a–k and 0.1 mol for alkyl- and benzylamines 1l–v. The final volume for every experiment was adjusted to 100 mL by adding methanol and the solution poured into the reaction chamber and tightly sealed. In order to provide an anaerobic atmosphere, the chamber was evacuated and flushed with dry nitrogen four times and then evacuated again. Finally an initial pressure of 4.0 bar of nitric oxide was applied, all the regulatory valves were closed, the solution stirred magnetically at 700 rpm and the pressure was recorded on-line producing the plots shown in Figures 3(A), 5–8(A).

The complete NO pressure–time plots were recorded and we also defined a further four reaction parameters. The end of the reaction [hh:mm] was fixed at the point when a drop in pressure of 0.05 bar takes longer than 3 h. The remaining pressure [bar] at this point was also used to describe the extent of the reaction. The remaining

pressure at the end of the reaction is due to unreacted NO, but side reactions such as the disproportionation of NO cannot be excluded. Furthermore, we compared the reduction in pressure (pressure descent) [bar] within the first 7 h and the mol ratio of NO consumed by the amine. Because 2 mol of NO bind to 1 mol of amine the maximum theoretical ratio is 2. Note that after recording the pressure–time plots the pressure was raised back to high pressure several times until the NO consumption in the reaction was close to zero to improve the yield of the product as reported previously.<sup>[12]</sup>

**Isolation and Characterization of the NONOates:** The NONOates precipitated as solids during the reaction or after concentrating the final solution. Compounds **2o**, **2p** and **2q** formed as resin-like residues after solvent evaporation. The solids were separated by filtration, washed with diethyl ether and dried in a desiccator under reduced pressure overnight. Melting points were measured with a Mel-Temp II, Laboratory Devices Inc., USA. The identity and purity of the products were verified by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy (Bruker Advance 250 spectrometer) and elemental analyses were performed with a Hereaus Vario EL apparatus. Compounds **2b,c,f-i,l,m,q,r** have previously been reported in the literature and analytical data were confirmed.<sup>[9,11,25–30]</sup>

**Sodium 1-(Azetidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (2a):** Prepared from **1a** (2.86 g, 0.05 mol). Yield: 6.41 g (92%) as white crystals. M.p. 173–175 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 1.93 (q, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.75 (t, <sup>3</sup>J = 7.5 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>) ppm. C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (139.09): calcd. C 25.91, H 4.35, N 30.21; found C 25.59, H 4.25, N 29.88.

**Sodium 1-(Azepan-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (2d):** Prepared from **1d** (4.96 g, 0.05 mol). Yield: 4.23 g (47%) as a white solid. M.p. 198 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 1.39–1.67 (m, 8 H, 4 × CH<sub>2</sub>), 3.01 (t, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>) ppm. C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (181.17): calcd. C 39.78, H 6.68, N 23.19; found C 39.50, H 6.46, N 22.79.

**Sodium 1-(Azocan-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (2e):** Prepared from **1e** (5.66 g, 0.05 mol). Yield: 7.13 g (73%) as a white solid. M.p. 238 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 1.36–1.65 (m, 10 H, 5 × CH<sub>2</sub>), 2.98 (t, <sup>3</sup>J = 5.5 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>) ppm. C<sub>7</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (195.20): calcd. C 43.07, H 7.23, N 21.53; found C 43.05, H 7.22, N 21.41.

**Sodium 1-(1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolin-2-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (2j):** Prepared from **1j** (6.66 g, 0.05 mol). Yield: 3.74 g (35%) as a pale yellow solid. M.p. 171 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 2.95 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.25 (t, <sup>3</sup>J = 6.0 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 4.17 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 6.97–7.20 (m, 4 H, Ar–H) ppm. C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (215.18): calcd. C 50.23, H 4.68, N 19.53; found C 50.00, H 4.93, N 19.21.

**Disodium 1-(3-Carboxylato-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (2k):** Prepared from **1k** (8.86 g, 0.05 mol). Yield: 6.46 g (46%) as a white solid. M.p. 282–286 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 2.60–3.16 (m, 2 H, NCHCH<sub>2</sub>), 3.73–3.95 (m, 2 H, NCH<sub>2</sub>), 4.14–4.38 (m, 1 H, NCH), 6.92–7.20 (m, 4 H, Ar–H) ppm. C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (281.18): calcd. C 42.72, H 3.23, N 14.94; found C 43.02, H 3.23, N 14.95.

**Sodium 1-(N,N-Diallylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (2n):** Prepared from **1n** (9.7 g, 0.1 mol). Yield: 11.47 g (64%) as a beige solid. M.p. 147 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 3.36 (d, <sup>3</sup>J = 6.63 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>), 4.96–5.19 (m, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>), 5.52–5.74 (m, 2 H, 2 × NCH<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>) ppm. C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (179.15): calcd. C 40.23, H 5.63, N 23.46; found C 39.96, H 5.60, N 23.15.

**Sodium 1-[N,N-Bis(2-hydroxyethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (2o):** The use of **1o** (10.5 g, 0.1 mol) did not produce a solid compound but rather a viscous fluid which yielded a colourless highly hygroscopic solid after prolonged drying under reduced pressure. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 2.89 (t, <sup>3</sup>J = 5.74 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>), 3.48 (t, <sup>3</sup>J = 5.74 Hz, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) ppm. C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>4</sub> (187.13): calcd. C 25.67, H 5.39, N 22.46; found C 25.85, H 5.60, N 22.12.

**Sodium 1-[N-(2-Aminoethyl)-2-hydroxyethylamino]diazen-1-ium-1,2-diolate + 1-[N-(2-Ammonioethyl)-2-hydroxyethylamino]diazen-1-ium-1,2-diolate (2p):** The use of **1p** (10.4 g, 0.1 mol) produced a highly viscous and hygroscopic amber fluid. <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 2.27 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.75 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2.81 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 3.30 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) +  $\delta$  = 2.60 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 2.75 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 2.81 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH), 3.30 (t, <sup>3</sup>J = 5.93 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) ppm.

**Sodium 1-(N-Benzyl-N-ethylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (2s):** Prepared from **1s** (13.5 g, 0.1 mol). Yield: 8.47 g (39%) as a white solid. M.p. 175 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 0.60 (t, <sup>3</sup>J = 7.10 Hz, 3 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.69 (q, <sup>3</sup>J = 7.10 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.67 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>Ar), 6.87–7.10 (m, 5 H, Ar–H) ppm. C<sub>9</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (217.20): calcd. C 49.77, H 5.57, N 19.35; found C 49.62, H 5.80, N 18.98.

**Sodium 1-(N-Benzyl-N-isopropylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (2t):** Prepared from **1t** (14.9 g, 0.1 mol). Yield: 3.4 g (15%) as a beige solid. The solid was filtered off from a large amount of unchanged **1t** and washed with diethyl ether. M.p. 298 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 0.99 (d, <sup>3</sup>J = 6.31 Hz, 6 H, NCH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.90–4.00 (m, 1 H, NCH), 3.56 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>Ar), 7.10–7.22 (m, 5 H, Ar–H) ppm. C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (231.23): calcd. C 51.94, H 6.10, N 18.17; found C 51.63, H 6.15, N 17.84.

**Sodium 1-[N-Benzyl-N-(2-phenylethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate (2u):** Prepared from **1u** (21.1 g, 0.1 mol). Yield: 14.33 g (49%) as a white solid. M.p. 217 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 2.45 (t, <sup>3</sup>J = 7.27 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ar), 2.99 (t, <sup>3</sup>J = 7.27 Hz, 2 H, NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Ar), 3.86 (s, 2 H, NCH<sub>2</sub>Ar), 6.99–7.25 (m, 10 H, Ar–H) ppm. C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (293.30): calcd. C 61.43, H 5.50, N 14.33; found C 61.11, H 5.55, N 14.42.

**Sodium 1-(N,N-Dibenzylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (2v):** Prepared from **1v** (19.7 g, 0.1 mol). Yield: 9.2 g (33%) as a white voluminous solid. M.p. 201–203 °C (dec.). <sup>1</sup>H NMR (250 MHz, D<sub>2</sub>O/NaOD):  $\delta$  = 4.01 (s, 4 H, 2 × NCH<sub>2</sub>), 7.20 (m, 10 H, Ar–H) ppm. C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub> (279.27): calcd. C 60.21, H 5.05, N 15.05; found C 60.41, H 4.80, N 14.99.

**NO Release Measurement:** NO release was measured by using the Apollo 4000 free-radical analyser system with an ISO-NOP nitric oxide selective sensor built into a multiport measurement chamber by World Precision Instruments Inc., USA. The measurement chamber was tempered with a Lauda M3 circulating thermostat at 37 °C and stirred at 800 r.p.m. All experiments were started after the initial background signal had fallen below 7000 pA in a channel range of 10 nA for the electrode. The apparatus was calibrated daily with 2.0 mL of a 0.1 M KI/0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in the chamber and an increasing amount of 50 μM NaNO<sub>2</sub> solution to produce nitric oxide by reduction. The nitrite solution was applied with an Eppendorf pipette (10, 20, 30, 40 and 60 μL) to give 249, 493, 728, 952 and 1388 nM solutions of NO, respectively. The dissociation of the diazeniumdiolates was measured by injecting a 50 μM NONOate/0.01 M NaOH solution (20 μL) into phosphate buffer (2.0 mL,

pH 6.4) resulting in a 495 nM solution of NONOate. Because 1 mol NONOate produces 2 mol NO, the redox current flow of a 990 nM NO solution was measured. Note that the nitric oxide sensor measurement is not accumulative and only measures the arising current at any given time. For this reason the phosphate buffer at pH 6.4 was used to ensure a sharper signal for slower releasing NONOates. The maximum of the signal was chosen as a parameter with which to compare dissociation rates. Figure 10 shows a typical signal evolving from the decomposition of a diazeniumdiolate (here **2r**). This parameter represents the maximum concentration of nitric oxide reaching the electrode at a certain time. Every measurement was carried out at least three times and the mean value with the corresponding standard deviation was calculated.

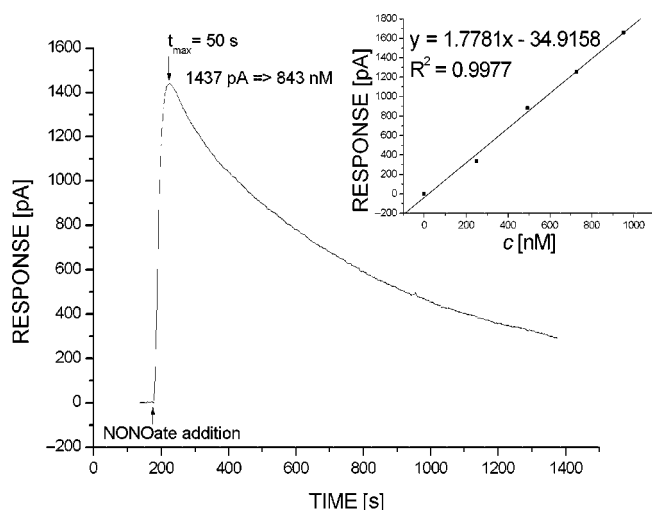


Figure 10. Calibration and NO release-time plot of NONOate **2r** in phosphate buffer at pH 6.4 at 37 °C.

The dissociation of the  $-\text{[N(O)NO]}^-$  functional group rather than NO release was measured with a Jasco V-570 UV spectrometer in phosphate buffer at pH 7.4 at 37 °C with a NONOate concentration of  $10^{-4}\text{M}$ . The decrease in the absorption was measured at a wavelength of 251 nm over a period of 30 min. By plotting the absorption logarithmically and performing a linear regression analysis the rate constants ( $k$ ) were determined and used to calculate the half-lives of the respective NONOates using the formula  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .  $R^2$  values were greater than 0.998 and every measurement was carried out at least three times to ensure reproducibility to within  $\pm 5\%$ .<sup>[8]</sup>

- [1] A. Seeling, J. Lehmann, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *40*, 1131–1136.  
 [2] C.-F. Lam, S. Svirni, K. F. Ilett, P. V. Van Heerden, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2002**, *11*, 897–909.  
 [3] J. Liu, C. Li, W. Qu, E. Leslie, C. L. Bonifant, G. S. Buzard, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, M. P. Waalkes, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 709–714.  
 [4] B. J. Nablo, A. R. Rothrock, M. H. Schoenfisch, *Biomaterials* **2005**, *26*, 917–924.

- [5] K. C. Young, J. Ladino, C. Navarrete, K. Dabrowska, D. Hehre, E. Bancalari, C. Suguihara, *Biol. Neonate* **2004**, *85*, 195–202.  
 [6] C. Velázquez, E. E. Knaus, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3831–3840.  
 [7] L. K. Keefer, R. W. Nims, K. M. Davies, D. A. Wink, *Meth. Enzymol.* **1996**, *268*, 281–293.  
 [8] J. A. Hrabie, J. R. Klose, D. A. Wink, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 1472–1476.  
 [9] A. Horstmann, L. Menzel, R. Gaebler, A. Jentsch, W. Urban, J. Lehmann, *Nitric Oxide* **2002**, *6*, 135–141.  
 [10] H. C. Champion, T. J. Bivalacqua, R. Wang, P. J. Kadowitz, L. K. Keefer, J. E. Saavedra, J. A. Hrabie, P. C. Doherty, W. J. G. Hellstrom, *J. Urol.* **1999**, *161*, 2013–2019.  
 [11] J. E. Saavedra, T. R. Billiar, D. L. Williams, Y.-M. Kim, S. C. Watkins, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1947–1954.  
 [12] J. Konter, G. E.-D. A. A. Abu-Rahma, A. El-Emam, J. Lehmann, *Meth. Enzymol.* **2005**, *396*, 17–26.  
 [13] K. M. Davies, D. A. Wink, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5473–5481.  
 [14] C. M. Maragos, D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 3242–3247.  
 [15] L. A. Hammad, P. H. Ruane, N. A. Kumar, J. P. Toscano, P. G. Wenthold, *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *222*, 269–279.  
 [16] B. J. Nablo, M. H. Schoenfisch, *Biomaterials* **2005**, *26*, 4405–4415.  
 [17] J. E. Saavedra, G. D. Southan, K. M. Davies, A. Lundell, C. Markou, S. R. Hanson, C. Adrie, W. E. Hurford, W. M. Zapol, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4361–4365.  
 [18] G. E.-D. A. A. Abu-Rahma, A. Horstmann, M. F. Radwan, A. El-Emam, E. Glusa, J. Lehmann, *Eur. J. Med. Chem.* **2005**, *40*, 281–287.  
 [19] H. Zhang, G. M. Annich, J. Miskulin, K. Stankiewicz, K. Osterholzer, S. I. Merz, R. H. Bartlett, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5015–5024.  
 [20] A. Srinivasan, N. Kebede, J. E. Saavedra, A. V. Nikolaitchik, D. A. Brady, E. Yourd, K. M. Davies, L. K. Keefer, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5465–5472.  
 [21] P. H. Ruane, K. M. Bushan, C. M. Pavlos, R. A. D'Sa, J. P. Toscano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9806–9811.  
 [22] M. M. Batchelor, S. L. Reoma, P. S. Flester, V. K. Nuthakki, R. E. Callahan, C. J. Shanley, J. K. Politis, J. Elmore, S. I. Merz, M. E. Meyerhoff, *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5153–5161.  
 [23] D. K. Taylor, I. Bytheway, D. H. R. Barton, C. A. Bayse, M. B. Hall, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 435–444.  
 [24] Z. Zhou, M. E. Meyerhoff, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 780–789.  
 [25] J. E. Saavedra, A. Srinivasan, C. L. Bonifant, J. Chu, A. P. Shanklin, J. L. Flippen-Anderson, W. G. Rice, J. A. Turpin, K. M. Davies, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3090–3098.  
 [26] F. Herrmann, N. List (Transdermal therapeutic system for administration of nitric oxide), DE 4305881, **1993**.  
 [27] J. E. Saavedra, M. N. Booth, J. A. Hrabie, K. M. Davies, L. K. Keefer, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5124–5131.  
 [28] R. S. Drago, B. R. Karstetter, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 1819–1822.  
 [29] S. E. Price, D. Jappar, P. Lorenzo, J. E. Saavedra, J. A. Hrabie, K. M. Davies, *Langmuir* **2003**, *19*, 2096–2102.  
 [30] J.-T. Nguyen, C. A. Velázquez, E. E. Knaus, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 1725–1738.

Received: July 31, 2006  
 Published Online: November 27, 2006



## **Veröffentlichung 3**

### **NO Donors, part 17: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs and Corresponding Nitric Oxide Donors**

Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. *Journal of Medicinal Chemistry*. In Vorbereitung.

**NO Donors, part 17<sup>1</sup>: Synthesis and antimicrobial activity of novel ketoconazole-NO-donor hybrid drugs and corresponding nitric oxide donors possessing a diazen-1-ium-1,2-diolate or organic nitrate moiety**

Joerg Konter<sup>†</sup>, Ute Möllmann<sup>‡</sup>, Jochen Lehmann<sup>†,\*</sup>

<sup>†</sup> Institute of Pharmacy, Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry,  
Friedrich-Schiller-University Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany

<sup>‡</sup> Hans Knöll-Institute for Natural Products Research, Beutenbergstr. 11a, D-07745 Jena, Germany

\* To whom correspondence should be addressed. Tel.: 0049-3641-949803, Fax.: 0049-3641-949802,  
E-mail: j.lehmann@uni-jena.de

**Abstract**

Novel nitric oxide donors and hybrid drugs combining the modified antifungal drug ketoconazole with a diazen-1-ium-1,2-diolate or an organic nitrate moiety were synthesized and their activities against a broad variety of bacteria and fungal strains were tested. Whereas the efficacy of the compounds against bacteria showed little variation, the ketoconazole-NO-donor hybrid drugs differed in their effectiveness and susceptibility against fungi. The NO-donors alone showed insufficient effectiveness.

## Introduction

Ketoconazole (**1a**, KT) is a synthetic broad spectrum antifungal drug that was released in the early 1980s and is used to prevent and treat mycotic infections systemically, but also externally. Due to its variable bioavailability, liver toxicity and inhibition of steroid biosynthesis, the role of KT as an orally administered drug has been limited to few indications such as candida-oesophagitis of patients with acquired immune deficiency syndrome or to suppress glucocorticoid synthesis in the treatment of Cushing's disease, for example. Pharmacodynamically, all azole-antimycotics prevent the fungal synthesis of ergosterole, which is a major constituent in fungal cell membranes, by enzyme inhibition of the cytochrome P450 dependent 14- $\alpha$ -demethylase [2]. The inhibitory effect of KT against bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes is based on the interaction with cytochrome P450 as well [3].

Previous studies have demonstrated the antimicrobial activity of endogenously derived nitric oxide (NO) from the inducible NO synthase isoform (iNOS) as well as from exogenously NO-delivering NO-donors[4-8]. Nitrogen bound diazen-1-ium-1,2-diolates (diazoniumdiolates, NONOates, "solid NO") represent a commonly used biological tool in nitric oxide related research and are NO-donating compounds with the general structure  $R_1R_2N[N(O)NO]$ . The predictable and exclusive release of the reactive nitrogen species (RNS)  $NO\cdot$  in a temperature, pH and structure dependent manner with half-lives reaching from a few seconds to many hours, depending on the compound used, are the most mentionable advantages of this class of NO-donor [9-12]. In order to prevent the immediate decomposition when dissolved in aqueous solution and further modulate the liberation of NO, NONOates can be derivatized to prodrugs that require enzymatic and/or chemical activation to result in the corresponding diazeniumdiolate. Recent reports show that not only the NONOate DETA/NO itself exerts inhibitory effects against *Candida* species, but also in synergy when applied in combination with azole antimycotics such as KT, fluconazole and miconazole [13].

Contrary to NONOates, organic nitrates require reduction of the nitrogen from oxidation state +V to +II in order to deliver NO. Glutathione reductase, cytochrome P450, xanthine oxidoreductase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase were recognized to be mediators in the bioactivation of organic nitrates [14-18]. Furthermore, organic nitrates are supposed to induce NO-like biological effects without generating free NO radicals and may be addressed as NO-mimetics rather than NO-donors. Therapeutically, organic nitrates are used for prophylaxis and acute treatment of angina pectoris, whereas most of the nitrate hybrid drugs introduced up to now possess a dihydropyridine or NSAID structure as second active principle [19,20].

In this investigation we report on the synthesis of a series of phenylpiperazine – which is a part of the ketoconazole structure - and ketoconazole derivatives bearing a diazen-1-ium-1,2-diolate or organic nitrate moiety and the NO-liberation profile of the NONOate compounds. The NO-donors and KT-NO-donor hybrid drugs were tested for their in vitro antimicrobial activity on a series of bacterial- and fungal strains by determining the zone of inhibition and minimum inhibitory concentration (MIC).

## Chemistry

For the conversion of KT (**1a**) into a NO-donating hybrid drug, we focused on the phenylpiperazine substructure as pointed out in Scheme 1. In order to make **1a** accessible for

derivatization, the acetyl residue was cleaved from the phenylpiperazine moiety with NaOH solution. As mentioned above, the time profile of NO liberation from NO-donors (e.g. NONOates) depends greatly on their individual chemical structure. To differentiate whether biologic effects rise from the released NO or from the synergy of KT and NO, all of the chemical modifications of the deacetylated KT (**2a**) were performed with phenylpiperazine (**2b**) as well.

The sodium salt NONOates **3a** and **3b** were produced by exposing the respective amines to 5 bar of NO under exclusion of oxygen and water in 1:1 methanol/THF for **3a** and dry methanol for **3b** [21]. We used the NOTizer<sup>®</sup> apparatus as described previously [12,22]. The half-lives ( $t_{1/2}$ ) of the NONOates were determined both via UV-spectroscopic decomposition of the diazeniumdiolate group and by direct NO measurement with a nitric oxide sensitive electrode reported previously [23,12]. The half-life of NO release for **3a/3b** was approximately  $t_{1/2}$  = 4.5 min with no significant difference in kinetics (see Supporting Information). The alkylation of **3a/3b** with bromoethane and chloromethyl methylether yielded **4a/4b** and **5a/5b** respectively, which do not release NO until the residues bonded to the O<sup>2</sup>-atom of the diazen-1-ium-1,2-diolate group are cleaved. While the metabolism of **4a/4b** in vitro is enzyme related, compounds **5a/5b** are capable of being hydrolyzed chemically to the respective NONOate, formaldehyde and methanol.

The NONOates **6a/6b**, resulting from the reaction of **2a/2b** with chloroacetyl chloride followed by the addition of the sodium salt of 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PYRRO/NO), are reliant on bond cleavage as well in order to liberate NO, yielding the bare NONOate and the hydroxyethanone derivative. The half-life of the resulting PYRRO/NO is approximately  $t_{1/2}$  = 3-5 s under physiologic conditions [24]. In contrast to **4a/4b** and **5a/5b**, this prodrug synthesis strategy advantageously allows the design of drugs with any kinetic of NO-release just by appropriate modification on the NONOates structure. For instance, the NO release from **6a/6b** can be slowed down easily by changing the amine backbone linked to the diazeniumdiolate group to a bulky alkylamine or polyamine [12,23]. Additionally, the amide carbonyl function attached to the phenylpiperazine moiety enhances the similarity to KT.

The organic nitrates **7a/7b** differ to **8a/8b** only through the carbonyl group, introduced by acylation of **2a/2b** with carbonyldiimidazole (CDI) activated nitroacetic acid, whereas **8a/8b** was prepared by alkylation of **2a/2b** with 2-bromoethyl nitrate. These two sets of organic nitrates were designed to assess the importance of the amide moiety in association with the NO mimetic group. Furthermore, the nitratopivalinic acid amides **9a/9b** were synthesized to study the effect of structural changes in the organic nitrate moiety on biologic activity.

## Biological Testing

For antimicrobial activity assays we used *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* SG 511, *S. aureus* SG 134/94 (MRSA), *Escherichia coli* SG 458, *Pseudomonas aeruginosa* SG 137, *P. aeruginosa* K799/61, *Enterococcus faecalis* 1528 (VRE), *Mycobacterium vaccae* IMET 10670, *Aspergillus fumigatus* ATCC 46645, *A. terreus* DSM 826, *A. niger* DSM 737, *Fusarium oxysporum* i1205, *Candida albicans* BMSY 212, *C. glabrata* DSM 6525, *Sporobolomyces salmonicolor* SG 549 and *Penicillium notatum* JP 36.

Antimicrobial activity was determined qualitatively by agar diffusion tests according to: European Pharmacopoeia, 3ed Edition, 1997; 13: 118, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, as described [25]. Shortly, 100  $\mu\text{L}$  suspension of the test organism with a density of McFarland standard 0.5 were inoculated into 32 mL of sterile melted agar medium and poured into petri dishes. Holes of 9 mm in diameter were cut in the agar and filled with 50  $\mu\text{L}$  of a 0.2 mM (or as stated otherwise) solution of the compound. Exceptionally, compounds **3a/3b** were diluted in 0.1 M NaOH solution, only the last dilution step was performed in the given media and used immediately. Inhibition zones were read after overnight incubation.

Antifungal activity of the compounds was studied quantitatively by determination of minimal inhibitory concentrations (MIC) according to the NCCLS guidelines using the broth microdilution method [26,27]. The bacteria were grown overnight at 37 °C in Mueller-Hinton broth (MHB)(Difco). 50  $\mu\text{L}$  of a compound solution of 2 mM in DMSO/Methanol (1:10) were serially diluted by factor two with MHB. Exceptionally, compounds **3a/3b** were diluted in 0.1 M NaOH solution, only the last dilution step was performed in the given media and used immediately. Then the wells were inoculated with 50  $\mu\text{L}$  of testorganisms to give a final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/mL. After microtiter plates were incubated at 37 °C for 24 h, the MIC values were read with a Nepheloscan Ascent 1.4 automatic plate reader (Labsystems, Vantaa, Finland) as the lowest dilution of antibiotic allowing no visible growth. *Candida albicans* was grown in yeast nitrogen base (Difco) supplemented with 1 % glucose and incubated at 30 °C.

## Results and Discussion

In order to compare the antimicrobial activity of compounds **1a-9a** qualitatively, a 200  $\mu\text{M}$  solution of the respective KT-NO-donor-hybrid drug was exposed to the different bacterial strains mentioned in Table 1. No considerable inhibition of growth was found for any of the compounds when applied to *E. coli*, *P. aeruginosa* or *E. faecalis*. Significant differences in the zone of inhibition diameter or spectrum change were found for the compounds **3a**, **6a**, **7a** and **9a** in comparison to the KT-derivative **1a**. The NONOate-group leading to spontaneous NO release from **3a** enhances the antibacterial activity slightly for all KT sensitive strains, but especially for *M. Vaccae*. Interestingly, the derivatives **6a**, **7a** and **9a** loose their efficacy against methicillin-resistant *S. aureus* SG 134/94 (MRSA) compared to the other tested compounds, which showed similar results against *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*. The only chemical structure similarity of these three compounds is the derivatisation of the acetyl moiety on the phenylpiperazine which may represent an essential element in *S. aureus* susceptibility, since the deacetylated KT (**2a**) showed no activity against *S. aureus* or MRSA.

Significant differences were found in the zone of inhibition diameter for compounds **1a-9a** tested on fungal strains of *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Sporobolomyces salmonicolor* and *Penicillium notatum* (Data in Table 1 of Supporting Information) necessitating MIC-value determination. Table 2 displays the MIC for the KT-NO-donor Hybrids **3a-9a** compared to KT (**1a**) and N-deacetyl-KT (**2a**) on the different fungal strains. For better comparison, the respective fractional inhibitory concentration (FIC = MIC compound / MIC KT) was calculated, whereas values under 1 represent higher antifungal activity than KT alone. The N-

deacetyl-ketoconazole **2a** is a major metabolite of KT and its activity has been tested on *Plasmodium falciparum*, *Candida albicans* and *C. tropicalis* previously [28,29]. Literature data of no significant differences between **1a** and **2a** in activity against these *Candida* isolates could be confirmed by us for *C. glabrata* as well. However, major loss of antifungal activity for **2a** against *Aspergillus* isolates and *Penicillium notatum* can be recognized in our study. The MIC of **2a** is 30-60 fold higher for some of the strains compared to the N-acetylated **1a**. The direct NO-donor derivative of KT carrying a diazeniumdiolate moiety (**3a**) shows similar antifungal potency against all strains tested compared to **1a**. NO-donor **3a** exclusively releases the redox-species NO<sup>•</sup> with a half-life of approximately  $t_{1/2} = 4.5$  min at pH 7.4 and 37 °C (see Supporting Information). After complete NO liberation from **3a**, the secondary amine equivalent to structure **2a**, remains. Obviously the NO released from **3a** is beneficial for the antifungal activity due to the higher activity compared to **2a**, but not synergistic enough to pursue **1a**. The strategy of synthesizing diazeniumdiolate-prodrugs **4a** and **5a** with an ethyl- and methoxymethyl moiety bound to the O<sup>2</sup>-atom of the NONOate-group respectively, enhances the antifungal properties of these compounds tremendously compared to the sodium salt NONOate **3a**. Both of these compounds are more active than KT, especially against the tested *Aspergillus* strains, but no significant differences were found on *Candida albicans*. A possible explanation is that this species lacks the means necessary to metabolize **4a** and **5a** to its active NO-donor. No difference in efficacy is observed when comparing compound **6a** to KT. Cleavage of **6a** results, amongst other, in the fast releasing NONOate PYRRO/NO with  $t_{1/2} = 3$  s for NO release. Perhaps the low synergistic effect of this KT-NO-donor hybrid is due to higher immobility thru membranes compared to the NONOate-prodrugs **4a/5a** or maybe a result of the very short half life of the NO-donor.

The synergistic antimicrobial effects of organic nitrates with KT have not been investigated before. With this NO-donor class it is difficult to distinguish if the observed activity results from the synergy of KT with NO, another nitrogen species or even receptor-related interaction. The organic nitrates **7a** and **9a**, which are bound to the KT structure as amides, showed to be more potent than KT alone, especially compound **9a** against the tested *Aspergillus* strains. It is clearly recognizable, that the spectrum of antifungal activity of the tested KT-NO-donors is different from the spectrum of KT, mainly a higher potency against *Aspergillus* species. Unexpectedly, the alkyl nitrate residue incorporated in compound **8a** turned out to be less potent than KT, suggesting that the combination of amide linkage and organic nitrate is obligatory if antifungal properties are desired.

The NO-donor compounds **2b-9b** lacking the KT structure showed no inhibition of test organism growth in all agar diffusion tests on a broad spectrum of bacterial and fungal strains at a concentration of 0.2 mM. The NONOate DETA/NO has been previously reported to have a MIC-value of about 2000  $\mu\text{g/mL}$  (12.5 mM) on *Candida* species, DPTA/NO even up to 5000  $\mu\text{g/mL}$  (26.2 mM) [13,30]. Therefore, as expected, the NONOate, NONOate-prodrugs and organic nitrates of the phenylpiperazine derivative (**2b-9b**) showed no reckonable antimicrobial activity at a concentration of 200  $\mu\text{M}$  if applied exclusively, but only in synergy with the antifungal KT-backbone.

The difference in antimicrobial activity of the KT-NO-donors in comparison to KT can be explained thru several possible mechanisms that can vary in the respective pathogen species. For instance, from a chemical point of view the entry of the hybrids into microbial cells can differ thru properties such as lipophilicity or molecular weight of the compounds. Microbial cellular targets for NO

such as proteins, lipids or DNA can be altered or detoxified by pathogen specific defense mechanisms such as NO-scavengers like homocysteine or glutathione, detoxifying enzymes or DNA repair mechanisms [6]. Concerning the synergistic effect of KT with NO it is also conceivable that NO interacts with the hemoprotein CYP450 of the 14- $\alpha$ -demethylase and hence amplifies the antimicrobial target of KT.

## Conclusion

Ketoconazol-NO-donor hybrid drugs represent a useful approach in antimicrobial and antifungal treatment. For KT carrying a diazeniumdiolate moiety, derivatization to prodrugs is obligatory to ensure stability of the compounds. Hybrid drugs of KT with an organic nitrate group are highly active against the tested strains as well, whereas variation in structure seems to have greater influence on in vitro efficacy than for NONOate-hybrids. This study demonstrates that it is not regardless which type of NO-donor is used to show synergy with antimycotic agents, but also that the spectrum of susceptibility against different strains can alter from the one of the antimycotic agent alone. The KT-NO-donor Hybrids would advantageously ensure a kind of drug targeting for the NO and other RNS in comparison to fixed combinations of KT and NO-donor that have different distribution properties in vitro and in vivo. It is also considerable that the antiinfective properties of these compounds in vivo could be much greater, since amongst the versatile NO activities is its important regulatory role in the immune system or in inflammatory processes that would indirectly contribute against microbial pathogens.

## Experimental Section

**(i) Deacetylation of 1a to 2a.** KT (**1a**) was purchased from Caesar & Loretz GmbH Hilden, Germany (Art. Nr. 5270-25G) and 8 g (15 mmol) were dissolved in 175 mL methanol under reflux. Afterwards, 20 % aqueous NaOH solution (40 mL) was slowly added and kept under reflux until completion of the reaction (TLC controlled). Chopped ice was added to the solution and the precipitated product was filtered and dried under vacuum to give **2a** in quantitative yield.

**(ii) General Procedure for Synthesis of 3a/3b.** Equimolar amounts of elementary sodium were dissolved in dry methanol (75 mL) and the solution filtered and added to **2a** (5 mmol) and **2b** (50 mmol) respectively. Additionally, dry tetrahydrofuran (75 mL) was only poured to the mixture containing **2a**. The solutions were transferred into the reaction chamber of the NOtizer<sup>®</sup> apparatus and closed tightly. The chamber was evacuated and flushed with dry nitrogen four consecutive times, then evacuated again. An initial pressure of 5 bar nitric oxide was applied and the solutions stirred magnetically at 700 rpm. The pressure was raised back to 5 bar until remaining constant. The precipitated products after solvent concentration were filtered, washed with ether and dried in a desiccator under reduced pressure over night.

**(iii, iv) General Procedure for Synthesis of 4a/4b and 5a/5b.** A mixture of pulverized anhydrous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g) and **3a/3b** suspended in 50 mL hexamethylphosphoric triamide (HMPA) was stirred at 4 °C and an equimolar amount of the respective alkyl halide added dropwise. After ice bath removal, the mixtures were stirred at room temperature for 72 h. Insoluble solids were removed by filtration and the solution poured into NaHCO<sub>3</sub> saturated water. The products were extracted with ethyl

acetate (2 x 30 mL) and washed with water (5x30 mL). The residues after solvent evaporation were purified by column chromatography on silica gel using the given eluent to furnish **4a**, **4b**, **5a** or **5b** respectively.

**(v) General Procedure for Synthesis of 6a/6b.** A mixture of pulverized anhydrous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 g) and 1.5 molar excess chloroacetyl chloride in 20 mL dichloromethane (DCM) was stirred at 4 °C and **2a/2b** dissolved in 40 mL DCM added dropwise and stirred until completion of the reaction (TLC controlled), respectively. Solids were filtered off and the filtrate washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (1x50 mL) and water (3x50 mL). The organic phase was dropped to a freshly prepared suspension of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and equimolar amount of sodium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PYRRO/NO) in 50 mL HMPA *in situ* at room temperature. A stream of dry nitrogen was passed through the mixture until the DCM was disposed and stirred for 72 h afterwards. The suspension was filtered into 60 mL of NaHCO<sub>3</sub> saturated water, extracted with ethyl acetate (2x50 mL) and the organic phase washed with water (5x75 mL). The residues after solvent evaporation were purified by column chromatography on silica gel using the given eluent to furnish **6a** or **6b** respectively.

**(vi and viii) General Procedure for Synthesis of 7a/7b and 9a/9b.** Compounds **2a/2b** (1 mmol) dissolved in 30 mL dichloromethane were slowly added via a syringe through a septum to a solution of CDI activated nitroacetic acid or nitratopivalinic acid (1.5 mmol) in 20 mL dichloromethane under dry nitrogen atmosphere and stirred for 24 h at room temperature. The solutions were washed with NaHCO<sub>3</sub> saturated water (3x40 mL) and the organic phase evaporated to yield residues of **7a**, **7b**, **9a** or **9b** that were purified thru silica gel column chromatography or recrystallization respectively.

Note that the much simpler acetylation of the secondary nitrogen atom with bromoacetyl bromide and subsequent nitration using silver nitrate in acetonitrile to produce compounds **7a/7b** only worked for the preparation of **7b**. The acetal group incorporated in the KT molecule was cleaved upon work up preventing this reaction to furnish **7a**.

**(vii) General Procedure for Synthesis of 8a/8b.** A given amount of **2a/2b** dissolved in dichloromethane (10 mL) was slowly added to a twofold excess of 2-bromoethyl nitrate and stirred at 60 °C for 48 h. The organic phase was washed with NaHCO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (3x20 mL) and evaporated to give brown fluids that required column chromatography purification on silica gel to yield **8a/8b**.

**Acknowledgement:** We thank Uta Wohlfeld and Gabi Schwinger for the antimicrobial/antifungal testing and excellent technical assistance.

**Supporting Information Available:** Includes detailed experimental protocols, physical-, spectroscopic- and elemental analysis data for compounds **2a**, **3-9a/b** and NO-release measurements data for compounds **3a/3b**. Inhibition zones for all compounds on a broad spectrum of fungi is presented.

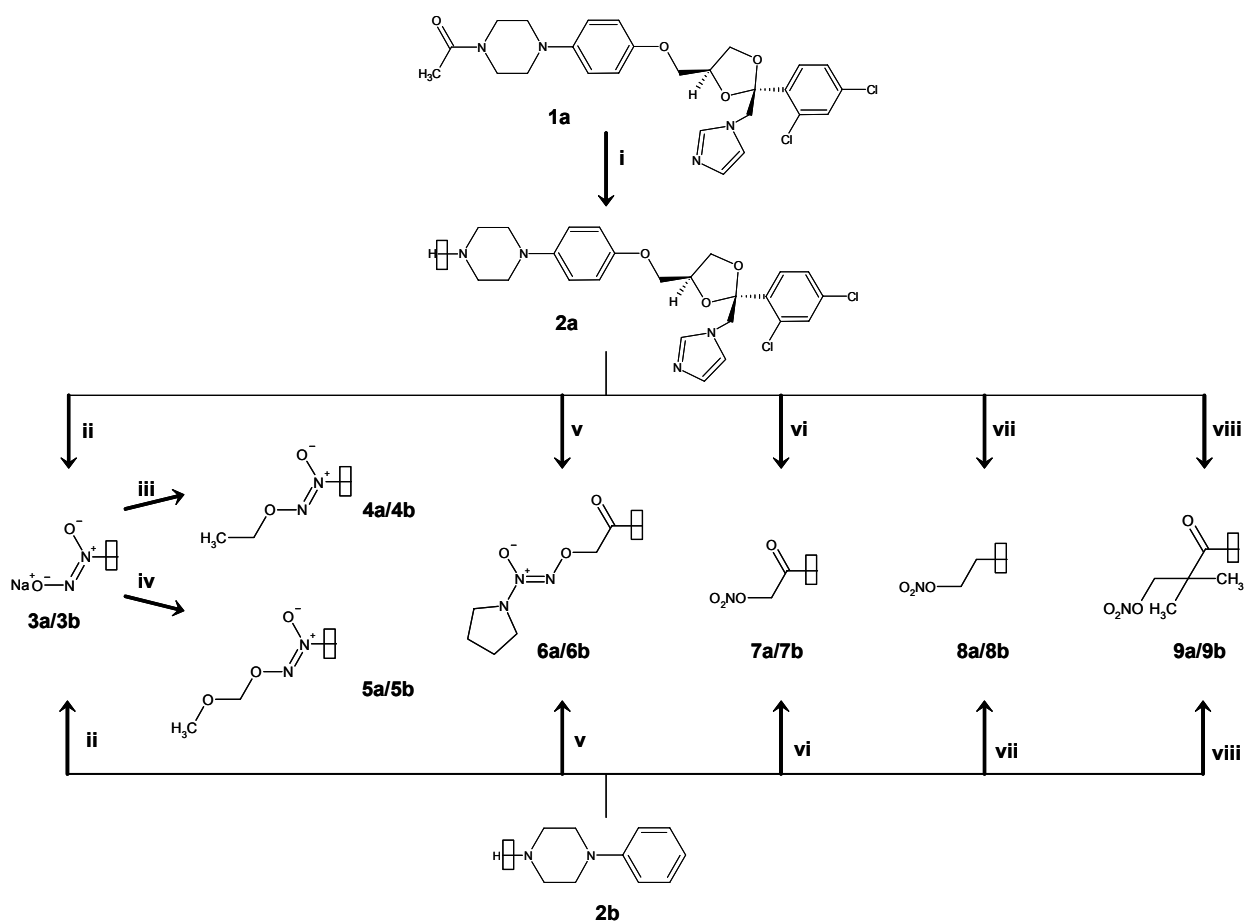


## References

- (1) Koenig, A.; Roegler, C.; Lange, K.; Daiber, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. NO donors. Part 16: Investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, accepted.
- (2) Van Tyle, J. H. Ketoconazole. Mechanism of action, spectrum of activity, pharmacokinetics, drug interactions, adverse reactions and therapeutic use. *Pharmacotherapy* **1984**, *4*, 343-373.
- (3) McLean, K. J.; Marshall, K. R.; Richmond, A.; Hunter, I. S.; Fowler, K.; Kieser, T.; Gurcha, S. S.; Besra, G. S.; Munro, A. W. Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 monooxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology* **2002**, *148*, 2937-2949.
- (4) Ochoa, J. B.; Udekwu, A. O.; Billiar, T. R.; Curran, R. D.; Cerra, F. B.; Simmons, R. L.; Peitzman, A. B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Annals of Surgery* **1991**, *214*, 621-626.
- (5) Keller, C. C.; Kremsner, P. G.; Hittner, J. B.; Misukonis, M. A.; Weinberg, J. B.; Perkins, D. J. Elevated nitric oxide production in children with malarial anemia: Hemozoin-induced nitric oxide synthase type 2 transcripts and nitric oxide in blood mononuclear cells. *Infection and Immunity* **2004**, *72*, 4868-4873.
- (6) Fang, F. C. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *100*, 43-50.
- (7) He, Q.; Leitch, G. J.; Visvesvara, G. S.; Wallace, S. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **1996**, *40*, 179-185.
- (8) Wheeler, M. A.; Smith, S. D.; Garcia-Cardena, G.; Nathan, C. F.; Weiss, R. M.; Sessa, W. C. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, *99*, 110-116.
- (9) Drago, R. S.; Paulik, F. E. The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, *82*, 96-98.
- (10) Keefer, L. K.; Nims, R. W.; Davies, K. M.; Wink, D. A. "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology* **1996**, *268*, 281-293.
- (11) Keefer, L. K. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2003**, *43*, 585-607.
- (12) Konter, J.; Abuo-Rahma, G. E.-D.; El-Emam, A.; Lehmann, J. Synthesis of diazen-1-ium-1,2-diolates monitored by the "NOTizer" apparatus: relationship between formation rates, molecular structure and the release of nitric oxide. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *4*, 616-624.
- (13) McElhane-Feser, G. E.; Rauli, R. E.; Cihlar, R. L. Synergy of nitric oxide and azoles against *Candida* species in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1998**, *42*, 2342-2346.

- (14) Needleman, P.; Harkey, A. B. Role of endogenous glutathione in the metabolism of glyceryl trinitrate by isolated perfused rat liver. *Biochemical Pharmacology* **1971**, *20*, 1867-1876.
- (15) Servent, D.; Delaforge, M.; Ducrocq, C.; Mansuy, D.; Lenfant, M. Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of the cytochrome P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**, *163*, 1210-1216.
- (16) Millar, T. M.; Stevens, C. R.; Blake, D. R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischemia. *Biochemical Society Transactions* **1997**, *25*, 528.
- (17) Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, *99*, 8306-8311.
- (18) Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; Lange, K.; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Muenzel, T.; Daiber, A. Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2<sup>-/-</sup> mice. *British Journal of Pharmacology* **2007**, *150*, 526-533.
- (19) Velazquez, C.; Knaus, E. E. Synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydropyridine calcium channel modulators having a diazen-1-ium-1,2-diolate nitric oxide donor moiety for the potential treatment of congestive heart failure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12*, 3831-3840.
- (20) Davies, N. M.; Roseth, A. G.; Appleyard, C. B.; Mcknight, W.; Del Soldato, P.; Calignano, A.; Cirino, G.; Wallace, J. L. NO - naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **1997**, *11*, 69-79.
- (21) Bonifant, C.; Saavedra, J.; Keefer, L.; Citro, M.; Buzard, G.; Fitzhugh, A.; Donovan, P.; Ji, X.; Shami, P.; Singh, S.; Srinivasan, A. Preparation of arenediazoniumdiolates capable of generating nitric oxide and superoxide. *PCT Int. Appl.* **2001**, *71*. WO 2001092215.
- (22) Konter, J.; Abuo-Rahma, G. E.-D.; El-Emam, A.; Lehmann, J. The NOTizer-A device for the convenient preparation of diazen-1-ium-1,2-diolates. *Methods in Enzymology* **2005**, *396*, 17-26.
- (23) Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; Keefer, L. K. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 1472-1476.
- (24) Saavedra, J. E.; Billiar, T. R.; Williams, D. L.; Kim, Y.-M.; Watkins, S. C.; Keefer, L. K. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 1947-1954.
- (25) Afonin, S.; Glaser, R. W.; Berditchevskaia, M.; Wadhvani, P.; Guehrs, K.-H.; Moellmann, U.; Perner, A.; Ulrich, A. S. 4-fluorophenylglycine as a label for <sup>19</sup>F NMR structure analysis of membrane-associated peptides. *Chem.Bio.Chem.* **2003**, *4*, 1151-1163.
- (26) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6th edn. Document M7-A6. Wayne, USA: NCCLS, **2003**.

- (27) Heinisch, L.; Wittmann, S.; Stoiber, T.; Berg, A.; Ankel-Fuchs, D.; Moellmann, U. Highly antibacterial active aminoacyl penicillin conjugates with acylated bis-catecholate siderophores based on secondary diamino acids and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* **2002**, *45*, 3032-3040.
- (28) Whitehouse, L. W.; Menzies, A.; Dawson, B.; Zamecnik, J.; Sy, W. W. Deacetylated ketoconazole: a major ketoconazole metabolite isolated from mouse liver. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **1990**, *8*, 603-606.
- (29) Pfaller, M. A.; Segal, J. J.; Krogstad, D. J. Activity of ketoconazole and its deacyl derivative against *Plasmodium falciparum* and *Candida* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1982**, *22*, 917-919.
- (30) Falahati, M.; Shabani, M.; Rodaki, M. M. A.; Jahaniani, F.; Bagheri, K. P.; Ahmed Ebrahimi, S. Interaction between ketoconazole, amphotericin B and terbinafine and three diazenumdiolates in concomitant uses against some fungal species. *Daru, Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* **2006**, *14*, 87-92.

Scheme 1<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Reagents and conditions: (i) 20% aq. NaOH, rx, 24 h; (ii) 5 bar NO,  $n_{\text{eq}}$  CH<sub>3</sub>ONa, rt; (iii) bromoethane, 72 h; (iv) chloromethyl methylether, 72 h; (v) 1.chloroacetyl chloride, 4°C, 2. PYRRO/NO, rt, 72 h; (vi) CDI activated nitroacetic acid, rt, 24 h; (vii) 2-bromoethyl nitrate, rt, 72 h; (viii) CDI activated nitropropionic acid, rt, 24 h.

**Table 1.** Antibacterial Activities In Vitro of Ketoconazole and the Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs **1a-9a** and the Phenylpiperazine Analogs **2b-9b**. Inhibition Zone [mm].

Compd 200 $\mu$ M	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. faecalis</i>	<i>M. vaccae</i>
	ATCC 6633	SG 511	SG 134/94	SG 458	SG 137	K 199/61	1528 (VRE)	IMET 10670
<b>1a</b>	10.5/17p	9.5/15p	9.5/15p	0	0	0	0	17.5p
<b>2a</b>	10	0	0	0	0	0	0	17.5p
<b>3a</b>	12/21.5p	17.5p	15p	0	0	0	0	<b>24/34p</b>
<b>4a</b>	11.5/17p	14.5	11p	0	0	0	0	16.5/24p
<b>5a</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>6a</b>	10.5/15p	11.5/15p	<b>0</b>	0	0	0	0	10/19p
<b>7a</b>	11/18p	13/16p	<b>0</b>	0	0	0	0	22p
<b>8a</b>	15	14	14	10.5p	0	0	10p	16
<b>9a</b>	13p	10p	<b>0</b>	0	0	0	0	10/16p
<b>2b-9b</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

p = partial inhibition  
n.t. = not tested

**Table 2.** Antifungal Activities In Vitro of Ketoconazole and the Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs **1a-9a**. MIC-Value [ $\mu$ M].

Compd.	<i>Asperg. fumigatus</i>	<i>Asperg. terreus</i>	<i>Asperg. niger</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Sporobolom. salmonicolor</i>	<i>Penicillium notatum</i>
<b>1a</b> = KT	62.5	31.25	62.5	500	25	12.5	1.56	8
<b>2a</b>	2000 (32)	2000 (64)	2000 (32)	2000 (4)	25 (1)	50 (4)	25 (16)	250 (31.25)
<b>3a</b>	200 (3.2)	100 (3.2)	100 (1.6)	200 (0.4)	100 (4)	12.5 (1)	1.25 (0.8)	20 (2.5)
<b>4a</b>	12.5 (0.2)	3.13 (0.1)	1.56 (0.025)	50 (0.1)	50 (2)	3.13 (0.25)	0.16 (0.1)	1.25 (0.16)
<b>5a</b>	8 (0.13)	8 (0.26)	4 (0.06)	250 (0.5)	25 (1)	3.13 (0.25)	2 (1.3)	1.56 (0.2)
<b>6a</b>	125 (2)	62.5 (2)	62.5 (1)	1000 (2)	25 (1)	12.5 (1)	2 (1.3)	8 (1)
<b>7a</b>	25 (0.4)	12.5 (0.4)	12.5 (0.2)	100 (0.2)	25 (1)	1.56 (0.12)	0.16 (0.1)	2.5 (0.31)
<b>8a</b>	1000 (16)	1000 (32)	250 (4)	1000 (2)	12.5 (0.5)	6.25 (0.5)	15.6 (10)	62.5 (7.81)
<b>9a</b>	3.13 (0.05)	1.56 (0.05)	1.56 (0.025)	25 (0.05)	6.25 (0.25)	3.13 (0.25)	0.6 (0.38)	8 (1)

(FIC = MIC Compound / MIC KT)

## Supporting Information

## NO Donors, Part 17: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Nitric Oxide Donors; Ketoconazole-Hybrid Drugs Possessing a Diazen-1-ium-1,2-diolate or Organic Nitrate Moiety

Joerg Konter<sup>‡</sup>, Ute Möllmann<sup>‡</sup> and Jochen Lehmann<sup>†,\*</sup>

The supporting Information contains detailed experimental protocols, physical-, spectroscopic- and elemental analysis data for compounds **2a**, **3-9a/b** and NO-release measurements data for compounds **3a/3b**. Purity of the compounds is in the "Purity Appendix" in tabular form. Supporting results from biological testing are presented.

**General Methods and Materials:** Chemicals (including **2b**) were purchased from VWR International Merck KGaA, Darmstadt and Linde AG, Unterschleissheim, Germany (NO gas 2.5 UN-Nr. 1660) and used without further treatment unless noted otherwise. Ketoconazole (**1a**) was purchased from Caesar & Loretz GmbH Hilden, Germany (Art. Nr. 5270-25G). Melting points are uncorrected and were measured in open capillary tubes, using a Gallenkamp melting point apparatus. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR spectral data were obtained from a Bruker Advance 250 spectrometer (250 MHz) and Advance 400 spectrometer (400 MHz), respectively. Elemental analysis was performed on a Hereaus Vario EL apparatus and TLC on silica gel F254 plates (Merck). MS data were determined by GC/MS, using a Hewlett Packard GCD-Plus (G1800C) apparatus (HP-5MS column; J&W Scientific) or a mass spectrometer type SSQ-710 from Finnigan MAT (EI and FAB).

**NO Release Measurements:** NO release was measured using the Apollo 4000 free radical analyzer system with an ISO-NOP nitric oxide selective sensor built in a multi-port measurement chamber by World Precision Instruments Inc., USA. The measurement chamber was tempered with a Lauda M3 circulating thermostat at 37 °C and stirred at 800 RPM. All experiments were started after the initial background signal was below 7000 pA at a channel range of 10 nA for the electrode. Calibration was conducted daily with 2.0 mL of 0.1 M KI / 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in the chamber and an increasing amount of 50 μM NaNO<sub>2</sub> solution to produce nitric oxide by reduction. The nitrite solution was applied with an Eppendorf pipette (10, 20, 30, 40, 60 μL) resulting in 249, 493, 728, 952 and 1388 nM solutions of NO, respectively. The dissociation of the diazeniumdiolates was measured by injecting 20 μL of a 50 μM NONOate / 0.01 M NaOH solution into 2.0 mL of phosphate buffer pH 6.4 resulting in a 495 nM solution of NONOate. Since one mol NONOate produces two moles NO, the redox current flow of a 990 nM NO solution was measured. Note that the nitric oxide sensor measurement is not accumulative and only measures the arising current at the given time. For this reason a phosphate buffer pH 6.4 was used to ensure a sharper signal.<sup>1</sup> Figure 1 shows the amperometric NO release signal for **3a** and **3b**. Both signals reach their maximum after approximately 120 s and quantification resulted in 95 % for **3a** and 94 % for **3b** of theoretical 100 % detection.

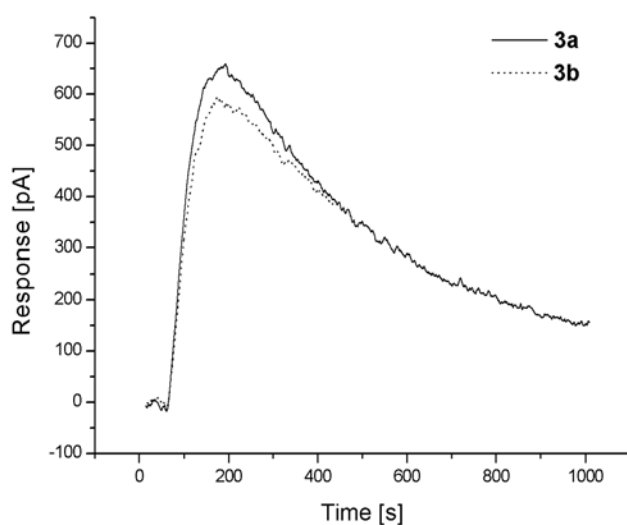


Figure 1. Nitric oxide redox current from compounds **3a** and **3b** measured with an NO sensitive electrode at pH 6.4, 37 °C.

Not directly NO release, but the dissociation of the  $-\text{[N(O)NO]}^-$  functional group was measured with a Jasco V-570 UV-spectrometer in phosphate buffer pH 7.4 at 37 °C with a NONOate concentration of  $10^{-4}$  M. The decrease of absorption was

measured at a wavelength of 251 nm over a period of 30 minutes. By plotting the absorption logarithmically and linear regression analysis the rate constants ( $k$ ) were determined and used to calculate the half-lives [s] of the respective NONOates using the formula  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .  $R^2$ -values were higher than 0,998 and every measurement was carried out at least three times to ensure reproducibility within  $\pm 5\%$ .<sup>2,1</sup> The decrease in UV-absorption for compound **3a** and **3b** is presented in Fig. 2. The calculated half-life for **3a** is  $t_{1/2} = 256$  s with a rate constant of  $k = 2.705 \times 10^{-3}$  and  $t_{1/2} = 264$  s with  $k = 2.63 \times 10^{-3}$  for **3b**.

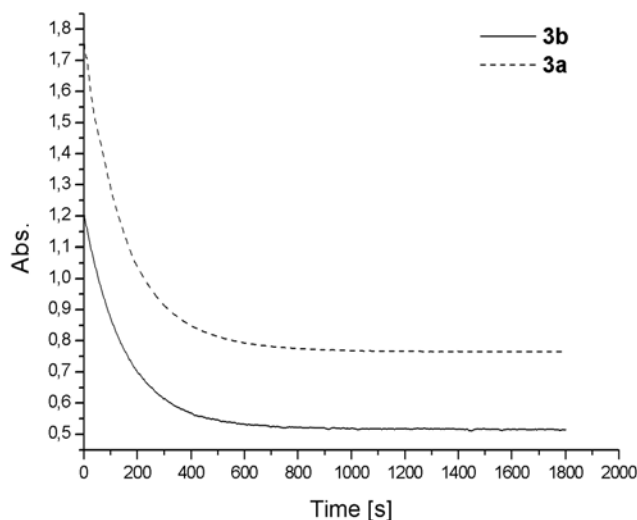


Figure 2. UV-absorption of the [N(O)NO]<sup>-</sup> group at 251 nm for compounds **3a** and **3b** at pH 7.4, 37 °C.

#### Biological Testing:

**Table 1.** Antifungal Activities In Vitro of Ketoconazole and the Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs **1a-9a** and the Phenylpiperazine Analogs **2b-9b**. Inhibition Zone [mm].

Compd.	<i>Asperg. fumigatus</i>	<i>Asperg. terreus</i>	<i>Asperg. niger</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Sporobolom. salmonicolor</i>	<i>Penicillium notatum</i>
<b>1a</b>	21	25	25	19pp	20/42p	22	42	30
<b>2a</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<b>3a</b>	15pp	18pp	19	0	20	23	44	24
<b>4a</b>	22	25	27	20p	18p	30	48	30
<b>5a</b>	24	27	29	0	19	29	46	30
<b>6a</b>	15p	14	19	0	16p	18	40	25
<b>7a</b>	25	27	29	20p	18p	31	48	32
<b>8a</b>	0	0	0	0	19	19p	26	12
<b>9a</b>	25/33p	30	31	15pp	20/42p	26	38	25
<b>2b-9b</b>	0	0	0	n.t.	0	n.t.	0	0

p = partial inhibition  
pp = weak partial inhibition  
n.t. = not tested

#### Chemistry:

**1-(4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl)piperazine (2a):** White powder (99 % yield); mp 173 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  3.03 (s, 8H), 3.32-3.36 (dd,  $J = 9.6, 6.7$  Hz, 1H), 3.72-3.77 (dd,  $J = 8.2, 4.9$  Hz, 2H), 3.86-3.90 (dd,  $J = 6.7, 6.6$  Hz, 1H), 4.31-4.37 (quin,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.39-4.53 (dd,  $J = 40.7, 14.8$  Hz, 2H), 6.76 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 13.6$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 14.7$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  46.3, 51.3, 51.8, 67.6, 67.8, 74.9, 108.0, 115.3, 118.1, 121.1, 127.2, 128.6, 129.5, 131.3, 133.0, 134.7, 135.9, 138.8, 146.8, 152.3; EI-MS  $m/z$  (%): 83 (15), 173 (20), 183 (39), 432 (28), 445 (61), 460 (100), 471 (32), 489 (16, [M+H]<sup>+</sup>) Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>26</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>): C, H, N.

**Sodium 1-(4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl)-4-(diazen-1-ium-1,2-diolat)piperazine (3a):** Crude white solid (82 % yield); mp 165-170 °C dec.; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (DMSO-D<sub>6</sub>):  $\delta$  3.05 (m, 4H), 3.28-3.41 (m, 5H), 3.72-3.77 (dd,  $J = 8.2, 4.9$  Hz, 2H), 3.86-3.90 (dd,  $J = 6.7, 6.6$  Hz, 1H), 4.31-4.37 (quin,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 4.39-4.53 (dd,  $J = 40.7, 14.8$  Hz, 2H), 6.76 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.88 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 6.97 (d,  $J = 13.6$  Hz, 2H), 7.25 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.48 (d,  $J = 14.7$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H); Anal. (C<sub>24</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>5</sub>): C, H, N.

**Sodium 1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (3b):** White powder (86 % yield); mp 148 °C dec.; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (NaOD):  $\delta$  3.10-3.31 (m, 8H), 6.82-6.94 (m, 3H), 7.15-7.21 (m, 2H); Anal. (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>NaO<sub>2</sub>): C, H, N.

**1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)-4-(*O*<sup>2</sup>-ethyl-diazen-1-ium-1,2-diolat)piperazine (4a):** From 1.4 mmol **3a** a brown solid after column purification with ethanol:acetone (1:1) as eluent (62 % yield); mp 181 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.39 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.07 (m, 4H), 3.26-3.41 (m, 5H), 3.72-3.77 (dd, *J* = 8.2, 4.9 Hz, 2H), 3.86-3.90 (dd, *J* = 6.7, 6.6 Hz, 1H), 4.25-4.53 (m, 5H), 6.74 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 7.59 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.4, 46.3, 51.3, 51.8, 67.6, 67.8, 69.8, 74.9, 108.0, 115.3, 118.6, 121.1, 127.2, 128.6, 129.3, 131.7, 133.0, 134.7, 135.9, 138.8, 145.8, 152.9; Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>): C, H, N.

***O*<sup>2</sup>-Ethyl-1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (4b):** Brown plates (72 % yield); mp 198 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.40 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 3.37 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.58 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 3.31 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.88-6.96 (m, 3H), 7.26-7.33 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 14.5, 48.8, 51.3, 69.8, 117.2, 120.6, 129.3, 150.3; Anal. (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>): C, H, N.

**1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)-4-(*O*<sup>2</sup>-methoxymethyl-diazen-1-ium-1,2-diolat)piperazine (5a):** From 1.0 mmol **3a** a beige solid after column purification with dichloromethane:methanol (9:1) as eluent (47 % yield); mp 186 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.05 (m, 4H), 3.28-3.41 (m, 5H), 3.52 (s, 3H), 3.73-3.77 (dd, *J* = 8.2, 4.9 Hz, 2H), 3.83-3.95 (dd, *J* = 6.7, 6.6 Hz, 1H), 4.30-4.39 (quin, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.39-4.53 (dd, *J* = 40.7, 14.8 Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.73 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 49.3, 51.3, 51.7, 57.0, 67.7, 67.8, 74.7, 97.9, 108.0, 115.3, 118.7, 121.1, 127.2, 128.4, 129.5, 131.3, 133.0, 134.6, 135.9, 138.8, 145.8, 152.4; FAB-MS *m/z* (%): 255 (40), 257 (33), 307 (100), 432 (20), 446 (28), 459 (33), 487 (43), 518 (50), 593 (24, [M+H]<sup>+</sup>); Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>): C, H, N.

***O*<sup>2</sup>-Methoxymethyl-1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (5b):** Yellow solid (61 % yield); mp 187 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.36 (mc, 4H), 3.51 (s, 3H), 3.64 (mc, 4H), 5.24 (s, 2H), 6.89-6.97 (m, 3H), 7.25-7.29 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 48.3, 51.0, 57.0, 97.9, 117.2, 121.2, 129.3, 150.3; Anal. (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>): C, H, N.

***O*<sup>2</sup>-(1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (6a):** Column purification on silica gel with ethylacetate:acetonitrile (1:1) then methanol washout to give orange solid (38 % yield); mp 237 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.93 (m, 4H), 3.02-3.13 (m, 8H), 3.32-3.36 (m, 1H), 3.55 (mc, 4H), 3.72-3.77 (m, 2H), 3.86-3.90 (dd, *J* = 6.7, 6.6 Hz, 1H), 4.31-4.37 (quin, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.39-4.53 (dd, *J* = 40.7, 14.8 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 22.9, 36.8, 51.3, 51.7, 53.5, 67.6, 67.7, 71.4, 74.8, 108.0, 115.3, 118.8, 121.2, 127.2, 128.4, 129.5, 131.3, 133.0, 134.6, 135.9, 138.8, 145.6, 152.9, 166.7; FAB-MS *m/z* (%): 202 (48), 217 (55), 235 (50), 255 (100), 432 (38), 446 (51), 459 (70), 471 (63), 489 (64), 517 (39), 547 (82), 600 (69), 660 (42, M<sup>+</sup>+H), 682 (19, [M+Na]<sup>+</sup>), 698 (17, M<sup>+</sup>+K); Anal. (C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>): C, H, N.

***O*<sup>2</sup>-[(1-Phenylpiperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)]diazen-1-ium-1,2-diolate (6b):** Column purification with ethanol:acetone (1:1) as eluent gave orange oil (58 % yield); <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.80 (m, 4H), 2.58 (m, 4H), 3.16 (mc, 4H), 3.37 (s, 2H), 3.76 (mc, 4H), 6.87-6.95 (m, 3H), 7.25-7.31 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 23.8, 41.7, 43.4, 49.4, 49.9, 53.9, 58.5, 116.5, 120.4, 129.3, 151.0, 168.6; Anal. (C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>): C, H, N.

**1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazine-4-carboxymethylnitrate (7a):** Crude light orange solid after column purification with methanol on silica gel (86 % yield); mp >250 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.03 (m, 4H), 3.27 (m, 5H), 3.47 (s, 2H), 3.72-3.78 (m, 2H), 3.83-3.90 (dd, *J* = 6.6, 6.6 Hz, 1H), 4.30-4.57 (m, 3H), 6.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.88-6.98 (m, 4H), 7.25 (mc, 1H), 7.48 (d, *J* = 14.4 Hz, 2H), 7.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 39.6, 50.1, 50.7, 51.2, 51.7, 67.5, 67.6, 74.7, 108.0, 115.3, 119.2, 121.2, 127.2, 128.5, 129.5, 131.4, 133.0, 134.6, 135.9, 138.8, 145.1, 153.3; Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>): C, H, N.

**1-Phenylpiperazine-4-carboxymethylnitrate (7b):** Red crystals after recrystallization with ethanol/ether (74 % yield); mp 243 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 3.21 (m, 4H), 3.70 (mc, 4H), 5.07 (s, 2H), 6.91-6.97 (m, 3H), 7.26-7.34 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 42.0, 44.5, 49.4, 67.7, 116.9, 121.0, 129.3, 150.6, 162.9; Anal. (C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): C, H, N.

**1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazine-4-ethylnitrate (8a):** Yellow plates after column purification with methanol on silica gel (62 % yield); mp >250 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.64-2.81 (m, 6H), 3.22 (mc, 4H), 3.35 (mc, 1H), 3.72-3.91 (m, 3H), 4.30-4.37 (quin, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.42-4.65 (m, 4H), 6.76-6.91 (m, 4H), 6.97 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 7.25-7.53 (m, 4H); <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 49.1, 52.9, 53.4, 57.7, 67.6, 67.8, 70.4, 74.6, 108.0, 115.3, 117.9, 121.0, 127.2, 128.6, 129.5, 131.3, 133.2, 134.7, 136.0, 138.8, 146.7, 152.3; Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>29</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub>): C, H, N.

**1-Phenylpiperazine-4-ethylnitrate (8b):** Yellow solid after column chromatography first with methanol, then dichloromethane:n-hexane (2:8) as eluent (55 % yield); mp >250 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 2.65-2.79 (m, 6H), 3.50 (mc, 4H), 4.62 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 6.85-6.95 (m, 3H), 7.25-7.30 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 49.0, 52.9, 55.0, 70.7, 116.2, 119.9, 129.0, 151.1; Anal. (C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>): C, H, N.

**1-(4-{[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)-4-(2,2-dimethyl-3-oxopropyl)nitrate)piperazine (9a):** White crude product after column purification with dichloromethane:ethanol (9:1) as eluent (70 % yield); mp >250 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.41 (s, 6H), 3.03-3.20 (mc, 8H), 3.28 (m, 1H), 3.67-3.90 (m, 3H), 4.34-4.53 (m, 3H), 4.59 (s, 2H), 6.74-6.88 (mc, 4H), 6.99 (d, *J* = 13.6 Hz, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.48-7.55 (m, 3H); <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 18.4, 22.4, 42.1, 45.0, 50.8, 51.3, 58.4, 67.6, 67.8, 74.8, 108.0, 115.3, 118.6, 121.2, 127.2, 128.4, 129.5, 131.4, 133.0, 134.6, 135.9, 138.8, 145.5, 153.0, 172.7; EI-MS *m/z* (%): 203 (24), 215 (29), 245 (46), 255 (100), 257 (74), 432 (38), 446 (56), 459 (30), 487 (32), 488 (21), 556 (48), 587 (33), 634 (45, [M+H]<sup>+</sup>); Anal. (C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>): C, H, N.

**1-Phenyl-4-(2,2-dimethyl-3-oxopropyl)nitrate)piperazine (9b):** Colourless crystals after recrystallization from dichloromethane:n-hexane (1:1) (92 % yield); mp >250 °C; <sup>1</sup>H-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.42 (s, 6H), 3.19 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 3.80 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 4.60 (s, 2H), 6.89-6.95 (m, 3H), 7.26-7.33 (m, 2H); <sup>13</sup>C-NMR: 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 22.4, 42.1, 44.9, 49.5, 79.2, 116.5, 120.6, 129.3, 150.8, 172.7; Anal. (C<sub>15</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): C, H, N.



**Intermediate compounds** for synthesis of **6a/6b**, **7a/7b**, **8a/8b** and **9a/9b**: Sodium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate, nitrateacetic acid, 2-bromoethyl nitrate and nitratopivalinic acid were synthesized as described in literature and analytical data was confirmed.<sup>[1,3,4,5,6]</sup>

#### Appendix (Purity):

Compd.	Formula	M <sub>w</sub> (g/mol)	Calcd			Found		
			%C	%H	%N	%C	%H	%N
<b>2a</b>	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	489.4	58.90	5.35	11.45	58.90	5.36	11.38
<b>3a</b>	C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> NaO <sub>5</sub>	571.4	50.45	4.41	14.71	50.54	4.06	14.37
<b>3b</b>	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>2</sub>	244.2	49.18	5.37	22.94	49.22	5.37	22.88
<b>4a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	577.5	54.08	5.24	14.55	53.98	5.23	14.22
<b>4b</b>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	250.3	57.58	7.25	22.38	57.69	7.28	22.22
<b>5a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	593.5	52.62	5.10	14.16	52.95	5.21	13.82
<b>5b</b>	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	266.3	54.12	6.81	21.04	54.25	6.78	20.86
<b>6a</b>	C <sub>30</sub> H <sub>35</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub>	660.5	54.55	5.34	14.84	54.17	5.43	14.78
<b>6b</b>	C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>	333.4	57.64	6.95	21.01	57.53	6.99	21.17
<b>7a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	592.4	52.71	4.59	11.82	53.01	4.53	11.68
<b>7b</b>	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	265.3	54.33	5.70	15.84	54.01	5.56	15.56
<b>8a</b>	C <sub>26</sub> H <sub>29</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub>	578.4	53.99	5.05	12.11	54.02	4.78	12.14
<b>8b</b>	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	251.3	57.36	6.82	16.72	57.47	7.09	16.63
<b>9a</b>	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	634.5	54.89	5.24	11.04	54.91	5.61	10.94
<b>9b</b>	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	307.3	58.62	6.89	13.67	58.75	6.89	13.62

#### Reference List:

- (1) Konter, J.; Abu-Rahma, G. E.-D.; El-Emam, A.; Lehmann, J. Synthesis of diazen-1-ium-1,2-diolates monitored by the "NOTizer" apparatus: relationship between formation rates, molecular structure and the release of nitric oxide. *European Journal of Organic Chemistry* **2007**, *4*, 616-624.
- (2) Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; Keefer, L. K. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 1472-1476.
- (3) Saavedra, J. E.; Billiar, T. R.; Williams, D. L.; Kim, Y.-M.; Watkins, S. C.; Keefer, L. K. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, *40*, 1947-1954.
- (4) Kochergin, P. M.; Titkova, R. M.; Tsyganova, A. M. Synthesis of organic preparations and intermediates based on nitro esters. XII. New synthesis of glyoxylic acid and its ethyl ester from glycolic acid. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **1967**, *1*, 30-32.
- (5) Olah, G.; Noszko, L.; Kuhn, I.; Szelke, M. Preparation of nitrosamines, alkylnitriles, and alkyl nitrates with nitrosyl and nitril tetrafluoroborate. *Hung. Acad. Sci.* **1956**, *89*, 2374-2377.
- (6) Decker, M.; Koenig, A.; Glusa, E.; Lehmann, J. Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the  $\beta$ -receptor blocking drug propranolol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 4995-4997.

## **Veröffentlichung 4**

### **Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate**

Koenig, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Joerg; Daiber, Andreas;  
Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Journal of  
Cardiovascular Pharmacology* (2007), 50, 68-74.

# Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate

Andreas Koenig, MS,\* Kathrin Lange, MS,\* Joerg Konter, MS,\* Andreas Daiber, PhD,†  
Dirk Stalleicken, MD,‡ Erika Glusa, MD,\* and Jochen Lehmann, PhD\*

**Abstract:** Neither therapeutic dosage of nitrovasodilators nor the development of tolerance correlates with nitrate groups in these molecules. Clinically, low dosages of glyceryl trinitrate (GTN) develop tolerance, but 100-fold higher dosages of pentaerythrityl tetranitrate (PETN) do not. Vasorelaxation was studied on prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGF $_{2\alpha}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries in organ bath procedure. In vitro tolerance was induced by incubating the arteries with different nitrate concentrations and thereafter concentration-response curves were repeated. Furthermore, 14 mg/kg PETN were daily administered to rats by gavage; PETN and metabolites were measured in feces and blood. In vitro, the vasodilator potencies increased from mononitrates to tetranitrates (pD $_2$ : 4.14 to 8.18); PETN was the most potent vasodilator. In vitro tolerance was found with PETN and trinitrates but not with dinitrates and mononitrates. Thus, in vitro tolerance correlated with the in vitro potency of nitrates but not with the vasodilator potency of NO donors in general, because S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine and N-phenylpiperazine-NONOate were more potent than GTN but did not induce tolerance. After feeding of rats with PETN, pentaerythrityl dinitrate (PEdiN) and mononitrate (PEmonoN) but neither PETN nor PEtriN (both detected in feces) were found in the blood. The missing systemic bioavailability of PETN and PEtriN may explain the discrepancy between in vitro and in vivo findings. We conclude that the partially denitrated metabolites PEdiN and PEmonoN contribute to the moderate and tolerance-devoid clinical activity of PETN.

**Key Words:** organic nitrates, pentaerythrityl tetranitrate, vasodilation, nitrate tolerance, bioavailability

(*J Cardiovasc Pharmacol*<sup>TM</sup> 2007;50:68–74)

Organic mononitrates, dinitrates, trinitrates, and tetranitrates are used therapeutically for vasodilation in cardiovascular diseases. Among these, pentaerythrityl tetranitrate (PETN) develops little or no nitrate tolerance and fewer

patients suffer from headaches in comparison to a treatment with other nitrates such as glyceryl trinitrate (GTN).<sup>1–3</sup> Various explanations for the phenomenon of nitrate tolerance have been proposed and investigations are still ongoing.<sup>4,5</sup> Detailed studies with GTN suggest a mechanism of tolerance that is based in part on the inhibition of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH-2), which catalyzes the bioactivation of highly potent vasodilators such as GTN.<sup>6</sup> Inhibition of ALDH-2 diminishes the GTN-induced vasorelaxation tenfold. However, because bioactivation of higher concentrations of GTN is thought to be performed by an ALDH-2-independent mechanism that is not susceptible to exhibit tolerance, a reduced vasodilator activity is still maintained. These findings were confirmed by studies with mtALDH<sup>-/-</sup> mice.<sup>7</sup> Furthermore, tolerance to GTN is accompanied by an increase in vascular reactive oxygen species production.<sup>5</sup>

Peroral therapeutic dosage of organic nitrates differs extremely from each other. Clinically, there is no correlation between the number of nitrate groups and the vasodilators efficacy represented by the dosage, or to the development of nitrate tolerance. Application of a comparatively low dose of the trinitrate GTN (0.4 to 2.4 mg/day) develops tolerance; the tetranitrate PETN, which has to be administered in high dosage of 100 to 240 mg/day, does not. One objective of our pharmacological in vitro study using isolated vessels was to investigate and compare the vasorelaxant effects and the development of acute tolerance, respectively, for PETN and for its potential metabolites pentaerythrityl trinitrate (PEtriN), pentaerythrityl dinitrate (PEdiN), pentaerythrityl mononitrate (PEmonoN), as well as for other nitrates such as GTN, isosorbide-dinitrate (ISDN), and isosorbide-5-mononitrate (ISMN). The NO/NO<sup>+</sup> donor S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine (SNAP), which is bioactivated differently from the nitrates, and sodium 1-(Phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO), which releases NO spontaneously without bioactivation, were also included. In preliminary studies, we found that porcine pulmonary arteries respond very sensitively and reproducibly to organic nitrates. These vessels possess an endothelium with a high capacity for NO synthesis, and therefore they are suitable for measuring NO-mediated endothelium-dependent relaxation.<sup>8</sup> Porcine pulmonary arteries are simple to handle with regard to the preparation and the measurement of vascular tone.

So far, such a wide range of NO-based vasodilators have not been investigated under the same conditions and the same

Received for publication November 30, 2006; accepted March 6, 2007.  
From the \*Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Germany; †Klinikum der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, II. Medizinische Klinik Kardiologie, Mainz, Germany; and ‡Actavis Deutschland, Langenfeld, Germany.  
Reprints: Jochen Lehmann, PhD, Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Philosophenweg 14, D-07743 Jena, Germany (e-mail: j.lehmann@uni-jena.de).

Copyright © 2007 by Lippincott Williams & Wilkins

vessel. The objectives of our study are to identify the relations between the structure of a NO donor and its vasodilator potency and its tendency to induce in vitro tolerance, respectively. Furthermore, in combination with in vivo bio-availability studies on rats with PETN, we want yield new insights into the moderate and tolerance-devoid clinical activity of PETN.

## MATERIALS AND METHODS

### Substances

The following drugs were used: bradykinin triacetate and prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ; Serva, Heidelberg, Germany),  $N^G$ -nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME) and 1H-[1,2,4]oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; Sigma, Deisenhofen, Germany), GTN (Merck, Darmstadt, Germany). ISDN and ISMN were obtained as gifts from Schwarz-Pharma AG (Monheim). SNAP was synthesized in our laboratory as described recently.<sup>9</sup> Pure PETN was synthesized by treating pentaerythritol with a mixture of nitrous and sulfuric acid. PEtriN, PEdiN, and PEmonoN were obtained by selectively reducing PETN using hydrazine hydrate. Sodium 1-(Phenylpiperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO) was prepared by treating N-phenylpiperazine and sodium methoxide with four bar nitric oxide in the NOTizer.<sup>10</sup>

### Tissue Preparation

According to a previously described protocol,<sup>11</sup> lungs from adult pigs were obtained from the local slaughterhouse. Small branches of pulmonary arteries were removed, cleared of parenchyma and connective tissue, and kept in a modified Krebs-Henseleit solution composed of the following compounds (mM): NaCl 118, KCl 4.7,  $CaCl_2$  2.5,  $MgSO_4$  1.2,  $KH_2PO_4$  1.2,  $NaHCO_3$  25.0, and glucose 11.5 (pH 7.4). Vessels to be used the next day were kept in the refrigerator (4°C) overnight.

### Measurement of Vascular Tone

Pulmonary arteries were cut into rings (2-mm long, 1.5 to 2 mm diameter). In experiments with endothelium-denuded rings, the endothelium was removed by gently rubbing the inner surface with a rough plastic rod. The rings were suspended between two L-shaped platinum hooks and mounted in a 10-mL organ bath filled with modified Krebs-Henseleit solution. The solution was kept at 37°C and aerated with 95%  $O_2$ /5%  $CO_2$ . Preparations were connected to an isometric force transducer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Germany) to continuously measure changes in tension. A resting tension of 20 mN was maintained throughout the experiment. After an equilibration period of 60 min, contractions were induced at intervals of 45 min. The ring segments were initially made to contract with KCl (45 mM) and subsequently with  $PGF_{2\alpha}$  ( $2-3 \times 3 \mu M$ ) until the contractions became constant. Endothelial integrity was assessed by the bradykinin (10 nM)-induced relaxation of  $PGF_{2\alpha}$ -precontracted vessels. In mechanically endothelium-denuded arterial rings, pretreated with 0.2 mM L-NAME, the relaxation induced by bradykinin was less than 10%. The relaxation response to organic nitrates was studied after

the second or third  $PGF_{2\alpha}$ -induced contraction had stabilized, by constructing a cumulative concentration-response curve. Relaxation responses were expressed as a percentage of the  $PGF_{2\alpha}$  ( $3 \mu M$ )-induced contraction in each tissue.

### Measurement of In Vitro Tolerance

To study the relaxation responses after a repeated exposure of the vessels to the vasodilators, two different experimental protocols were used. In protocol A, the compounds were given cumulatively up to a maximum relaxation of 100% and after 30 min a washout time of 45 min was performed (3 times changing the medium). Thereafter the cumulative concentration-response curve was repeated. In protocol B, after 30-min incubation with a bolus of 300  $\mu M$  of the compound and a washout period of 45 min, the cumulative concentration-response curve for the relaxation by the respective nitrates was performed again. In protocol A, the arterial rings were pretreated with concentrations of equivalent vasorelaxation potency; in protocol B, concentrations of the same molarity were added.

### Quantification of PETN Metabolites in Rat Blood and Feces

The levels of PETN and its metabolites in whole blood and feces samples were measured on three consecutive days, using an improved high-performance liquid chromatography (HPLC)-based method with chemoluminescence nitrogen detection (CLND) as described previously.<sup>12</sup> After cleavage of conjugates by an aryl sulfatase/glucuronidase-mixture (VWR International; 5 hours at 40°C), blood samples were diluted 1:1 with methanol and centrifuged 15 min at 3000 rpm, completely separating denaturated proteins. Then 100  $\mu L$  of the clear supernatant were injected directly into the HPLC. Feces samples were solubilized by freeze drying and then extracted under reflux with ethyl acetate, isopropanol, and acetonitrile. The extracts were dried in a nitrogen stream, resolved in 1 mL of the eluent (methanol/water), and analyzed by HPLC.

The animal experiments were carried out in the laboratories of the Second Medical Clinic, Johannes Gutenberg-University Mainz, Germany; details of the experimental procedures are described elsewhere.<sup>6</sup> Male Wistar rats (200 g, Charles River, Sulzfeld, Germany) were fed by gavage (feeding tube) at intervals of 12 hours with either 7 mg/kg PETN (suspension in water) or the solvent for 3 days. After 3 days, rats were sacrificed after blood samples were taken from anesthetized rats. Feces were collected during the last day of treatment. All animal treatment was in accordance with the Declaration of Helsinki and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as adopted and promulgated by the U.S. National Institutes of Health. The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Eppendorf and the University Hospital Mainz.

### Data Analysis

Data are given as means  $\pm$  SEM for tissues from n animals. Agonist concentration-response curves were constructed using GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA). The calculated  $pD_2$  presented the negative

logarithm of the molar concentration producing 50% of the maximum response. Results were compared using Student's *t* test followed by Bonferroni corrected *t* test for stepwise comparison. *P* values <0.05 were considered to be significant.

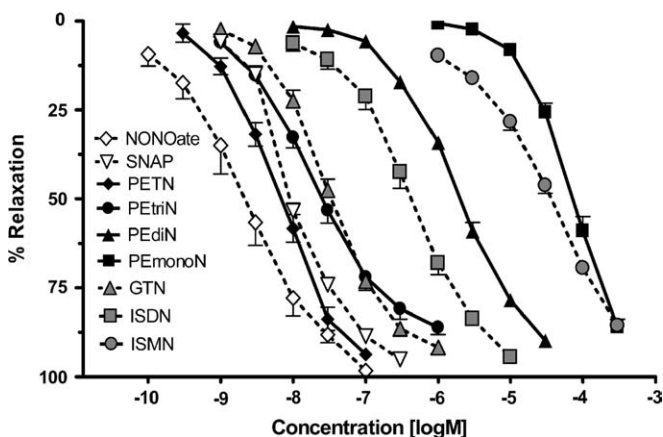
## RESULTS

### Vasorelaxant Effects of Nitrates, SNAP, and PHEPIPERAZI/NO

In PGF<sub>2α</sub>-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium, all of the compounds were able to elicit a vasodilation in a concentration-dependent manner (Fig. 1). In all experiments, a maximum vasodilation has been achieved ( $E_{max} \sim 100\%$ ). PETN proved to be the most potent nitrate, followed by PEtriN and GTN; the pD<sub>2</sub>-values of these trinitrates did not differ significantly (Table 1). The dinitrates and mononitrates induced less vasodilation. However, ISDN exhibited a more pronounced relaxant response than did the respective pentaerythrityl derivative PEdiN. In conclusion, the results demonstrate that the relaxation potency of the organic nitrates investigated correlated with the number of nitrate groups in the molecule. The nitrosothiol SNAP was found to be nearly equipotent and the phenylpiperazine-derived diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO even more potent than the most active nitrate PETN (Fig. 1, Table 1).

In order to examine whether the relaxant effects of the organic nitrates depends on the integrity of endothelium, endothelium-denuded vessels that did not relax to bradykinin were used. In addition, the endothelial NO-synthase (eNOS) was inhibited by preincubation with L-NAME (0.2 mM). Compared to the vessels with intact endothelium, the concentration-response curves in the endothelium-denuded vessels did not shift significantly, with the exception of PEmonoN, which was clearly more effective in denuded arteries (Table 1).

To ensure that all tested organic nitrates stimulate the soluble guanylyl cyclase (sGC) in smooth muscle cells, the



**FIGURE 1.** Concentration-response curves for the vasorelaxant effects of the NONOate PHEPIPERAZI/NO, *S*-nitroso-*N*-acetyl-D-penicillamine (SNAP), PETN, PEtriN, PEdiN, PEmonoN, GTN, ISDN, ISMN, on PGF<sub>2α</sub> (3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries in vitro. Data are means ± SEM from 3 to 9 independent experiments.

vessels were treated with ODQ, a selective inhibitor of the NO-sensitive sGC. Preincubation of isolated pulmonary arteries with 10 μM ODQ shifted the concentration-response curves for the nitrate-induced relaxation significantly to the right (data not shown).

### Studies of In Vitro Tolerance

Two different procedures (see Methods) were used to investigate any development of in vitro tolerance by repeated exposure to the vasodilators. Preincubation was performed with concentrations of the same vasodilator potency (protocol A: EC<sub>100</sub>) and in some experiments with a 300 μM bolus (protocol B) depending on the EC<sub>50</sub>-values of the tested compounds.

The tetranitrate PETN and the trinitrates PEtriN and GTN were significantly less potent in the second exposure (Figs. 2 and 3, Table 2). Depending on the preincubation procedure, the EC<sub>50</sub> values were enhanced by factors ranging from 11 to more than 30 compared to the control. The bolus application induced the strongest rightward shift of the concentration-relaxation curves. Due to its low solubility and high vasorelaxation potency, a 300 μM bolus could not be applied to PETN; only a prerelaxation to 100% (protocol A) was used for this compound (Fig. 3), resulting in a significant increase of the EC<sub>50</sub> value from 7 nM to 102 nM. The trinitrates PEtriN and GTN induced in vitro tolerance in the same order of magnitude (Figs. 2 and 3). ISDN developed some in vitro tolerance after preincubation with a 300 μM bolus, but generally and in contrast to the trinitrate and the tetranitrate, the dinitrates (PEdiN, ISDN) and mononitrates (PEmonoN, ISMN) exhibited no or negligible in vitro tolerance in all experimental procedures (Table 2, Figs. 4 and 5). Protocol B was not performed with mononitrates because the EC<sub>100</sub> values were already in the range of the 300 μM bolus. SNAP and the diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO were more potent vasodilators than GTN but did not induce in vitro tolerance, which was exemplified by using protocol A (Table 2, Fig. 6).

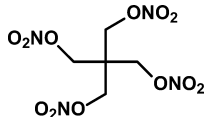
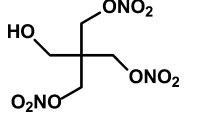
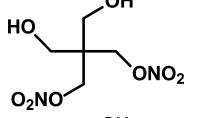
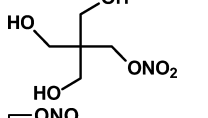
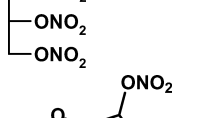
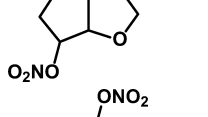
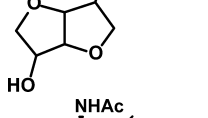
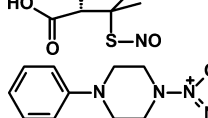
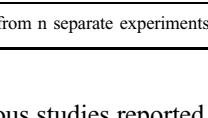
### Studies on Bioavailability of PETN in Rats

After feeding rats with 7 mg/kg PETN 2 times per day by gavage for 3 days, on day 3 we found considerable amounts of PETN (up to 120.8 to 136.7 ng/g), low amounts of PEtriN (18.1 to 21.9 ng/g), and very low amount PEdiN (6.4 to 11.6 ng/g) in the feces (Table 3). Neither PETN nor PEtriN was found in the blood (LOD: 4 ng/mL). PEdiN was quantified in blood (17 to 33 ng/mL), PEmonoN could not be quantified because the short retention time of this compound in the HPLC protocol applied caused it to coelute with other nitrogen-containing compounds in the blood, but it was indicated by peak-broadening.

## DISCUSSION

The results of our comparative study demonstrate the vasorelaxant responses of isolated porcine pulmonary arteries to different types of nitric-oxide-based vasodilators, including therapeutically used organic nitrates, their bioactive metabolites, a nitrosothiol (SNAP), and a diazeniumdiolate

**TABLE 1.** Vasodilatory Effects ( $pD_2$  Values) of Organic Nitrates and Other NO Donors on  $PGF_{2\alpha}$ -Precontracted Porcine Pulmonary Arteries With Intact Endothelium and on Endothelium-Denuded + L-NAME (0.2 mM) Pretreated Vessels In Vitro

Vasodilator	Structure	$pD_2$ (n)	
		Intact Vessels	Denuded Vessels
PETN		8.18 ± 0.03 (7)	8.28 ± 0.04 (5)
PEtriN		7.53 ± 0.04 (8)	7.94 ± 0.08 (4)
PEdiN		5.68 ± 0.02 (6)	5.72 ± 0.03 (6)
PEmonoN		4.14 ± 0.02 (7)	4.70 ± 0.02 (6)
GTN		7.44 ± 0.02 (6)	7.60 ± 0.04 (5)
ISDN		6.37 ± 0.03 (7)	6.24 ± 0.01 (3)
ISMN		4.48 ± 0.03 (9)	4.48 ± 0.07 (3)
SNAP		7.97 ± 0.02 (6)	ND
PHEPIPERAZI/NO		8.67 ± 0.06 (5)	ND

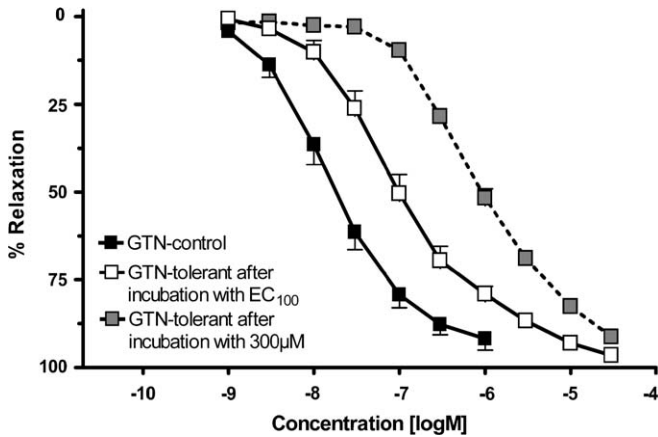
Data are means ± SEM from n separate experiments.

(PHEPIPERAZI/NO). In contrast to previous studies reported in the literature, for the first time the complete set of therapeutically relevant organic nitrates together with other types of NO donors were tested comparatively at the same vascular preparation and under the same experimental conditions.

The most potent nitrates were PETN, PEtriN, and GTN. These findings agree with previous organ-bath studies on isolated vessels from different species, such as rabbit aorta and bovine coronary arteries, resulting in  $pD_2$  values for the relaxant effects which are in the same range as those found in our study.<sup>13-15</sup> The dinitrates and mononitrates were less effective than the tetranitrates and trinitrates; similar results were shown by other groups with rat and rabbit aortas.<sup>6,13</sup> The dinitrate and mononitrate of isosorbide exhibit a stronger relaxant response than the corresponding pentaerythryl

derivatives. The correlation between vasodilator potency and number of nitrate groups in the vasodilator substances became obvious from our results. But apart from this, it is noteworthy that different physicochemical parameters of the nitrate carrier molecule further influence the vasorelaxant potency. Using isolated porcine coronary arteries, we have previously demonstrated that in a group of mononitrates the benzyl mononitrate induces a vasorelaxation that was 300 times stronger than that of cyclohexyl mononitrate.<sup>16</sup> Furthermore, it was shown that the vasodilator potency of differently substituted benzyl nitrates varied significantly depending on the nature and the position of the substituents in the benzyl nitrate molecule.<sup>16</sup>

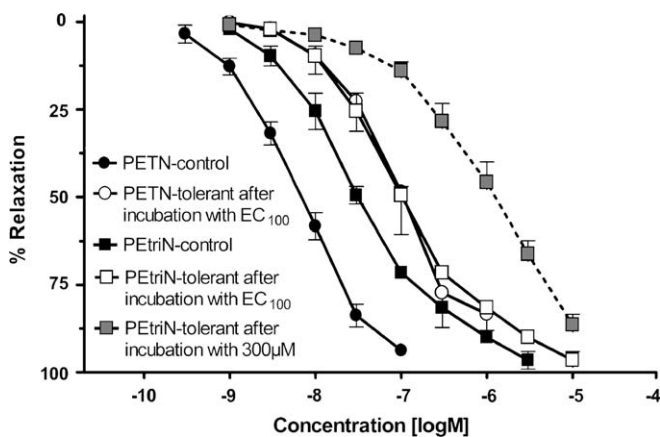
There are contrary reports about the influence of endothelium on the GTN-induced relaxation. Alheid et al found an increase in the response to nitrates after removal of



**FIGURE 2.** The relaxation to GTN in control and GTN-tolerant  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The  $\text{EC}_{50}$  values of tolerant vessels are significantly different from the control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 4 to 8 independent experiments.

endothelium,<sup>17</sup> whereas Kojda et al found an endothelium-independent relaxation.<sup>18</sup> Our studies revealed that the concentration-dependent relaxations induced by the tested nitrates in pulmonary arteries were roughly similar in vessels with denuded and with intact endothelium. Moreover, the results confirmed that the mechanism underlying the vaso-relaxant response is mediated by the activation of guanylyl cyclase because inhibiting the enzyme by ODQ diminished the vasodilator effects of nitrates.

So far, investigations into development of tolerance in vitro have mainly been carried out for GTN and ISMN.<sup>13,19</sup> The strong attenuation of the vasodilator response to GTN after repeated administration was also seen in our studies with isolated porcine pulmonary arteries. Furthermore, we now demonstrate the appearance of in vitro tolerance for PETN and PErtriN similarly to GTN. The dinitrates and mononitrates



**FIGURE 3.** PETN- and PErtriN-induced in vitro tolerance of  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The "tolerant" curves are significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 4 to 8 independent experiments. Details shown in Methods.

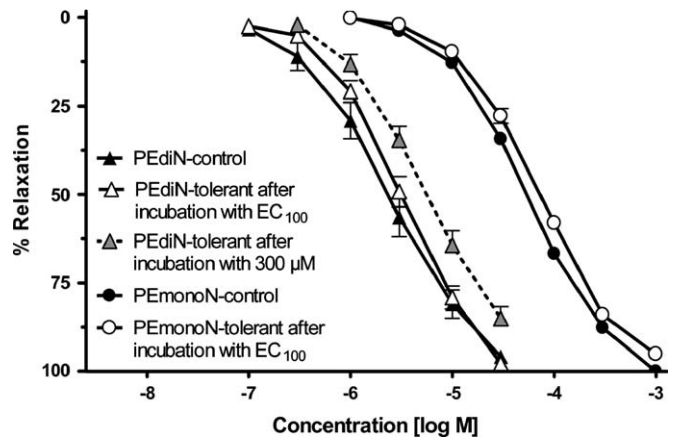
**TABLE 2.** Comparison of the Mean of  $\text{EC}_{50}$  for the Relaxant Responses of Different Vasodilators on Nontolerant (Control) and Tolerant (Preincubation With  $\text{EC}_{100}$ ) Segments of Porcine Pulmonary Arteries

Vasodilator	$\text{EC}_{50}$ (M)		$\frac{\text{EC}_{50}(\text{tolerant})}{\text{EC}_{50}(\text{control})}$
	Control (Nontolerant)	Tolerant	
PETN	$6.67 \times 10^{-9}$	$1.02 \times 10^{-7}$	15.3
PErtriN	$3.55 \times 10^{-8}$	$4.00 \times 10^{-7}$	11.3
PEdiN	$2.34 \times 10^{-6}$	$3.07 \times 10^{-6}$	1.3
PEmonoN	$5.32 \times 10^{-5}$	$7.23 \times 10^{-5}$	1.4
GTN	$2.21 \times 10^{-8}$	$2.58 \times 10^{-7}$	11.7
ISDN	$4.96 \times 10^{-7}$	$6.20 \times 10^{-7}$	1.3
ISMN	$3.96 \times 10^{-5}$	$6.67 \times 10^{-5}$	1.7
SNAP	$1.37 \times 10^{-8}$	$1.14 \times 10^{-8}$	0.8
PHEPIPERAZI/NO	$2.54 \times 10^{-9}$	$3.34 \times 10^{-9}$	1.3

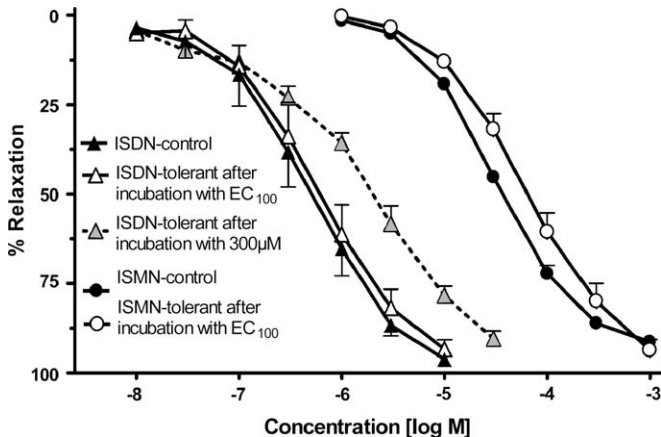
The ratio of  $\text{EC}_{50}$  tolerant and  $\text{EC}_{50}$  control represents the  $x$ -fold reduction of the vasodilator potency.

developed little or no tolerance in vitro, with PEdiN showing less attenuation than ISDN (Figs. 4 and 5) after preincubation with a  $300 \mu\text{M}$  bolus. Similar findings were reported for ISMN compared to GTN.<sup>13</sup>

We conclude that the development of in vitro tolerance obviously increases with the number of nitrate groups in the molecule and hence with the potency of the nitrate, but generally not with the vasodilator properties of NO donors. Both the nitrosothiol SNAP and the spontaneously NO-releasing diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO exhibited higher vasodilator potency than GTN but, in contrast to GTN and PETN, they did not develop in vitro tolerance (Table 2; Figs. 2, 3, and 6). Obviously, the phenomenon of nitrate tolerance in vitro might be associated with the bioactivation processes of the vasodilators. SNAP is bioactivated differently from the organic nitrates, and the spontaneously NO-releasing



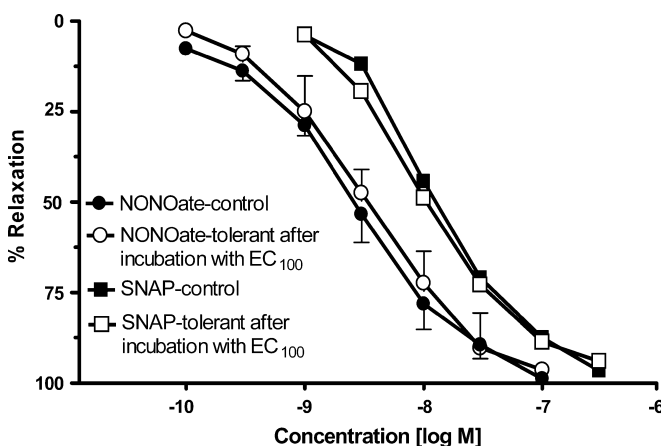
**FIGURE 4.** The relaxation to PEdiN and PEmonoN in control and tolerant  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ( $3 \mu\text{M}$ )-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The curves are not significantly different from control ( $P < 0.05$ ). Data are means  $\pm$  SEM from 5 to 8 independent experiments.



**FIGURE 5.** The relaxation to ISDN and ISMN in control and tolerant PGF<sub>2α</sub>(3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. Data are means ± SEM from 5 to 8 independent experiments.

diazeniumdiolate PHEPIPERAZI/NO needs no bioactivation. Within the organic nitrates, only the high-potency compounds GTN, PETN, and PErtriN undergo ALDH2-catalyzed bioactivation, and they are sensitive to development of in vitro tolerance unlike the low-potency dinitrates and mononitrates.<sup>5</sup> However, the in vitro tolerance allows only few insights in the mechanism of clinical tolerance caused by chronic treatment; additional factors may play an important role in vivo. There are various reports in the literature that the therapy with PETN does not induce oxidative stress and this is supposed to be a key factor in preventing clinical tolerance.<sup>2</sup> Especially, the increased heme oxygenase (HO)-1 expression and ensuing formation of cytoprotective bilirubin may contribute as well.<sup>20</sup>

All of our in vitro findings are in contrast to the therapeutic use of PETN, which requires high oral dosage and



**FIGURE 6.** Vasorelaxation induced by PHEPIPERAZI/NO (NONOate) and SNAP in control and tolerant PGF<sub>2α</sub>(3 μM)-precontracted porcine pulmonary arteries with intact endothelium. The “tolerant” curves are not significantly different from control (*P* < 0.05). Data are means ± SEM from two independent experiments.

**TABLE 3.** Whole Blood and Feces Levels of PETN and Its Metabolites Upon Administration of 7 mg/kg PETN 2 Times Per Day by Gavage for 3 Days to Rats (n = 12)

Sample Source	PETN	PErtriN	PEdiN
Blood (ng/mL)	ND	ND	17–33
Feces (ng/g)			
Day 1	38.6–53.9	13.5–16	6.6–8.6
Day 2	38.5–129.5	19.1–24	5.4–8.6
Day 3	120.8–136.7	18.1–21.9	6.4–11.6

ND, not determined because the concentrations in the blood samples were mostly (n = 10) at the LOQ of 11 ng/mL. Only two samples have shown higher amounts. Feces samples were collected from three animals.

does not develop significant tolerance.<sup>2</sup> The missing bioavailability for PETN—and also PErtriN—due to poor absorption or a fast hydrolytic degradation to less vasoactive metabolites may explain the discrepancy between in vitro and in vivo.<sup>21,22</sup> Recently, we could excluded hydrolytic degradation of PETN in different mediums.<sup>12</sup> Only rapid degradation in vitro occurred after adding thiol. Thus, PETN is supposed to undergo enzymatic denitration by intestinal microorganisms yielding the lower nitrate metabolites PErtriN, PEdiN, and PEmonoN.<sup>23</sup> After peroral application of PETN to humans, it was found in the feces and remained present throughout a 3-day period after the drug was administered.<sup>21</sup> To our knowledge, PETN has never been quantified in the blood and PErtriN has only been detected occasionally at very low concentrations. Only PEdiN and PEmonoN have been found at higher concentrations in the blood.<sup>24</sup> In healthy volunteers, the plasma half-life time of PEdiN and PEmonoN amounted to 4 to 5 hours and 10 to 11 hours, respectively.<sup>25</sup> After feeding rats PETN, we found considerable amounts of PETN in the feces, but little PErtriN and very little PEdiN. In agreement with human investigations, neither PETN nor PErtriN were detected in the blood of rats; only PEdiN could be quantified by the HPLC protocol. Therefore, according to the in vivo findings, in the future in vitro studies on the pharmacological effects of PETN should also include the effects of PEdiN and PEmonoN.

We conclude that, in vivo, PETN is highly stable and very poorly soluble and absorbable. Biotransformation and absorption produce successively limited blood levels of PEdiN and PEmonoN. As shown by our investigations, these two metabolites contribute to the moderate, long-acting, and tolerance-devoid activity of the PETN.

**ACKNOWLEDGMENTS**

A Ph.D. scholarship for A.K. by Graduiertenförderung (Thuringia, Germany) is gratefully acknowledged. The authors also thank Dr. Kleinhans (Veterinäramt Weimarer Land, Nohra) for providing with lungs from pigs for this study and Actavis Deutschland for financial support.

**REFERENCES**

1. Fink B, Bassenge E. Unexpected, tolerance-devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythryl tetranitrate. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1997;30: 831–836.



2. Jurt U, Gori T, Ravandi A, et al. Differential effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on the development of tolerance and evidence of lipid peroxidation: A human in vivo study. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:854–859.
3. Pfaffenrath V, de la Motte S, Harrison F, et al. Effect of pentaerythritol tetranitrate, isosorbide mononitrate and placebo on the headache and on the ability to work of healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*. 1998;48:646–650.
4. Schwemmer M, Bassenge E. New approaches to overcome tolerance to nitrates. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2003;17:159–173.
5. Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circ Res*. 2005;97:618–628.
6. Daiber A, Oelze M, Coldewey M, et al. Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates. *Mol Pharmacol*. 2004;66:1372–1382.
7. Chen ZQ, Foster MW, Zhang J, et al. An essential role for mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12159–12164.
8. Glusa E, Pertz HH. Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Br J Pharmacol*. 2000;130:692–698.
9. Decker M, Koenig A, Glusa E, et al. Synthesis and vasorelaxant properties of hybrid molecules out of NO-donors and the beta-receptor blocking drug propranolol. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14:4995–4997.
10. Konter J, Abou-Rahma El-Din AAH, El-Emam A, et al. The NOtizer - a device for the convenient preparation of diazen-1-ium-1,2-diolates. *Methods Enzymol*. 2005;396:17–26.
11. Glusa E, Adam C. Endothelium-dependent relaxation induced by cathepsin G in porcine pulmonary arteries. *Br J Pharmacol*. 2001;133:422–428.
12. Seeling A, Lehmann J. NO-donors, part X [1]: Investigations on the stability of pentaerythritol tetranitrate (PETN) by HPLC-chemoluminescence-N-detection (CLND) versus UV-detection in HPLC. *J Pharm Biomed Anal*. 2006;40:1131–1136.
13. Kukovetz WR, Holzmann S. Mechanisms of nitrate-induced vasodilatation and tolerance development. *Eur J Clin Pharmacol*. 1991;40:103–109.
14. Kojda G, Hacker A, Noack E. Effects of nonintermittent treatment of rabbits with pentaerythritol tetranitrate on vascular reactivity and superoxide production. *Eur J Pharmacol*. 1998;355:23–31.
15. Hüsgen B, Noack E, Kojda G. Comparison of the vasorelaxing effect of different nitrovasodilators in conductive arterial and venous blood vessels. In: Schrör K, Pace-Asciak CR, eds. *Mediators in the Cardiovascular System: Regional Ischemia*. Basel: Birkhäuser Verlag; 1995:183–187.
16. Wessler C, Homann A, Fricke U, et al. NO donors, part 8 [1]: synthesis and vasodilating activities of substituted benzylnitrates compared to cyclohexylmethylnitrate and GTN. *Eur J Med Chem*. 2003;38:581–586.
17. Alheid U, Dudel C, Forstermann U. Selective-inhibition by gossypol of endothelium-dependent relaxations augments relaxations to glyceryl trinitrate in rabbit celiac artery. *Br J Pharmacol*. 1987;92:237–240.
18. Kojda G, Beck JK, Meyer W, et al. Nitrovasodilator-induced relaxation and tolerance development in porcine vena cordis magna - dependence on intact endothelium. *Br J Pharmacol*. 1994;112:533–540.
19. Chen ZQ, Zhang J, Stamler JS. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8306–8311.
20. Oberle S, Abate A, Grosser N, et al. Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of pentaerythritol tetranitrate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;290:1539–1544.
21. Davidson IW, Miller HS, Dicarolo FJ. Absorption, excretion and metabolism of pentaerythritol tetranitrate by humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 1970;175:42–50.
22. Davidson IW, Rollins FO, Dicarolo FJ, et al. Pharmacodynamics and biotransformation of pentaerythritol tetranitrate in man. *Clin Pharmacol Ther*. 1971;12:972–981.
23. King SY, Fung HL. Rapid microbial degradation of organic nitrates in rat excreta. Re-examination of the urinary and fecal metabolite profiles of pentaerythritol tetranitrate in the rat. *Drug Metab Dispos*. 1984;12:353–357.
24. Neurath GB, Dunger M. Blood levels of metabolites of glyceryl trinitrate and pentaerythritol tetranitrate after administration of a two-step preparation. *Arzneimittelforschung*. 1977;27:416–419.
25. Weber W, Michaelis K, Luckow V, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of pentaerythritol tetranitrate and two of its metabolites. *Arzneimittelforschung*. 1995;45:781–784.

## **Veröffentlichung 5**

**Permeability changes in response to NONOate and  
NONOate prodrug derived nitric oxide in a blood-brain  
barrier model formed by primary porcine endothelial cells**

Winter, Sven; Konter, Joerg; Scheler, Stefan; Lehmann, Jochen; Fahr,  
Alfred. *Nitric Oxide*. Eingereicht (2007).

# Permeability changes in response to NONOate and NONOate prodrug derived nitric oxide in a blood-brain barrier model formed by primary porcine endothelial cells

Sven Winter<sup>a</sup>, Joerg Konter<sup>b</sup>, Stefan Scheler<sup>a</sup>, Jochen Lehmann<sup>b</sup>, and Alfred Fahr<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Friedrich-Schiller-University Jena, Department of Pharmaceutical Technology, Lessingstrasse 8, Jena, Germany

<sup>b</sup> Friedrich-Schiller-University Jena, Department of Pharmaceutical/Medicinal Chemistry, Philosophenweg 14, Jena, Germany

Corresponding author:

Sven Winter, Department of Pharmaceutical Technology, Lessingstrasse 8, 07743 Jena, Germany

Telephone: +49-176-23202378

Fax: +49-7344-143237

e-mail: sven.winter@ratiopharm.de

Private address: Erhard-Grözingen-Str. 11  
89134 Blaustein  
Germany

## Abstract

The influence of nitric oxide (NO) and NO-donors on the permeability of the blood-brain barrier (BBB) is still not well understood and the literature is quite controversial. Some studies revealed increasing, others decreasing or even no effects of NO-donors on the BBB permeability. In this work we report about the influence of three diazeniumdiolates, which release NO spontaneously and three different diazeniumdiolate prodrugs, which have to be cleaved chemically or enzymatically before releasing NO, on the BBB permeability of a primary porcine endothelial cell monolayer. By measuring the flux of a small polar molecule (carboxyfluorescein: CF) we could show, that the releasers PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO reduced the BBB permeability. In contrast, the prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO and Tosyl-PYRRO/NO increased the permeability, whereas the prodrug Et-BUPIPERAZI/NO reduced it. Blocking the effect of the BBB permeability reducing compounds could be done by methylene blue, whereas permeability increasing effects could not be blocked.

*Keywords:* Diazeniumdiolate; NO-donor; NONOate; blood-brain barrier; primary porcine endothelial cells; permeability

## Introduction

Nitric oxide (NO) has been found to exert positive [1; 2; 3; 4] and negative [5; 6] influence on the permeability of venules of different origin. Most of the investigations were done by using NO agonists or NO synthase inhibitors to discern its role on vascular permeability. Further studies used NO-donors or gaseous NO to investigate the permeability changing. The findings of these studies are controversial, since some authors have shown a decrease in peripheral vascular permeability or no effect [7; 8; 9; 10; 11], while others have found an increase by the use of NO-donors [12; 13; 14]. Studying the effect of different NO-donors on the cerebrovascular endothelium showed an increasing effect on the permeability [15; 16] especially by using higher concentrations of the NO-donor in the blood-brain barrier model [17]. What kind of influence a NO-donor exerts on cells is also dependent on the “kind of NO” which is released [18]. The three different redox forms  $\text{NO}^{\cdot}$ ,  $\text{NO}^+$  and  $\text{NO}^-$  can be released depending on the used type of NO-donor. In this *in vivo* investigation three diazen-1-ium-1,2-diolate derivatives, also called NONOates, and three different prodrugs of these direct releasers were synthesized and tested (Fig. 1). The nitrogen bound NONOates, used in this study, release the  $\text{NO}^{\cdot}$  radical exclusively and are ideal tools to study the effects of nitric oxide on the BBB, due to their predictable first order NO liberation and variable half lives depending on the NONOate used. But, because of the short half-life of some compounds in aqueous buffer, the actual intracellular NO concentration is questionable which limits their usefulness in *in vivo* experiments or even as drugs with a therapeutic aim. One possibility to circumvent this limitation is the design of prodrugs that can not release NO unless they are chemically or enzymatically converted to the drug.

The cell culture model used in this study was formed by freshly isolated porcine brain endothelial cells, growing on the upper side of a Transwell<sup>®</sup> filter insert. To obtain information on the tightness of the endothelial monolayer, the transendothelial electrical resistance (TEER) was measured by using a chopstick electrode. In order to gain information on the influence of different NONOates and NONOate prodrugs on the permeability of the blood-brain barrier model, the flux of a marker substance (CF) was determined.

The first goal of this study was to examine the general influence of NO on the permeability of monolayers of primary porcine endothelial cells. The second aim was to find out if there are differences in the effect of spontaneously releasing NONOates and the NONOate prodrugs.

## Materials and methods

### *Materials and Chemicals*

The cell culture media M199 and Dulbecco's minimal essential medium/Ham's F12 (DMEM/Ham's F12), 10-fold hanks balanced salt solution (HBSS), horse serum used for the cell culture media, penicillin/streptomycin 100-fold solution and the trypsin were purchased from PAA Laboratories GmbH (Austria). Puromycin for purity improvement of the cells was purchased from Calbiochem<sup>®</sup>, Merck Biosciences GmbH (Germany), the enzymes dispase and collagenase from Invitrogen GmbH (Germany). Rat tail collagen solution (4 mg/ml) was obtained from SERVA Electrophoresis GmbH

(Germany). Carboxyfluorescein, dimethylsulfoxide (DMSO), hydrocortison and chemicals for the synthesis of the NONOate derivatives were purchased from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany), cell culture flasks from Greiner Bio-One GmbH (Germany) and the Costar® Transwell® cell culture inserts from Corning B.V Life Sciences (The Netherlands).

#### *Synthesis of NONOate derivatives*

The sodium salt NONOates sodium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PYRRO/NO), sodium 1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO), sodium 1-(butylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (BUPIPERAZI/NO) and sodium 1-(N,N-dibutylamino)diazen-1-ium-1,2-diolate (DBA/NO) were synthesized by the general procedure described previously [19; 20]. The intramolecular salt 1-[N,N-di-(2-aminoethyl)amino] diazen-1-ium-1,2-diolate (DETA/NO) was synthesized as reported in literature [21].

The synthesis of the prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO, Et-BUPIPERAZI/NO and Tosyl-PYRRO/NO was accomplished as described below, the latter one by a modified procedure given in literature [22].

#### *O<sup>2</sup>-Ethyl-1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (Et-PHEPIPERAZI/NO):*

1 g (4 mmol) of pulverized sodium 1-(phenylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PHEPIPERAZI/NO) was added to a suspension of 800 mg sodium carbonate in 60 mL hexamethylphosphoramide (HMPA) at 5°C under stirring. A solution of 6 mmol iodoethane in 10 mL HMPA was added dropwise keeping the temperature below 10°C. The ice bath was removed and stirring was continued over night. The remaining solids were filtered off, equal amounts of water and ethyl acetate were added to the filtrate, the ethyl acetate was extracted and washed with water several times, and afterwards dried over sodium sulfate and evaporated. The resulting light brown oil was purified by silica column chromatography with ethanol:hexane (1:2) and yielded 820 mg (82%) of a brownish solid. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.37 (t, 3H, J= 7.0 Hz), 3.29 (t, 4H, J= 5.3 Hz), 3.50 (t, 4H, J= 5.3 Hz), 4.24 (q, 2H, J= 7.0 Hz), 6.88 (m, 3H), 7.21 (m, 2H). Anal. Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (250,x): C 57.58, H 7.25, N 22.38, O 12.78; Found: C 57.66, H 7.02, N 22.36.

#### *O<sup>2</sup>-Ethyl-1-(butylpiperazin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (Et-BUPIPERAZI/NO):*

This compound was prepared and purified as described for Et-PHEPIPERAZI/NO from the sodium salt of BUPIPERAZI/NO and purified through silica column chromatography with dichlormethane. Pale brown oil (93%) was obtained. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.9 (t, 3H, J= 7.1 Hz), 1.25-1.54 (m, 4H, J= 7.1 Hz), 1.38 (t, 3H, J= 7.1 Hz), 2.34 (t, 2H, J= 7.1 Hz), 2.59 (t, 4H, J= 5.0 Hz), 3.42 (t, 4H, J= 5.0 Hz), 4.25 (q, 2H, J= 7.1 Hz). Anal. Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (230): C 52.15, H 9.63, N 24.33, O 13.89; Found: C 52.12, H 9.76, N 23.96.

#### *O<sup>2</sup>-(p-Methylbenzen-sulfonyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (Tosyl-PYRRO/NO):*

0.58 g (3.8 mmol) of pulverized sodium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolate (PYRRO/NO) was added to a suspension of 800 mg of sodium carbonate in 50 mL of *tert*-butyl methyl ether at 5°C under stirring. 1.0 g (5.25 mmol) of *p*-tosyl chloride dissolved in 10 mL *tert*-butyl methyl ether was added dropwise under cooling to the suspension and then stirred for 48 h at room temperature. After suction

filtration, the clear colorless filtrate was kept refrigerated until white crystals precipitated (62% yield).  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.97 (t, 4H,  $J= 5.0$  Hz), 2.46 (s, 3H), 3.60 (t, 4H,  $J= 5.0$  Hz), 7.36 (d, 2H,  $J= 8.1$  Hz), 7.89 (d, 2H,  $J= 8.1$  Hz). Anal. Calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$  (285): C 46.30, H 5.30, N 14.73, O 22.43, S 11.24; Found: C 46.21, H 5.09, N 14.92, S 11.16.

The half-lives for the NO release from the NO donors was determined with a Jasco V-570 UV-spectrometer in phosphate buffer pH 7.4 at  $37^\circ\text{C}$  with a NONOate concentration of  $10^{-4}\text{M}$ . The decrease of absorption was measured at a wavelength of 251 nm over a period of 30 minutes. By plotting the absorption logarithmically and linear regression analysis the rate constants ( $k$ ) were determined and used to calculate the *half-lives* [s] of the respective NONOates using the formula  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .  $R^2$ -values were higher than 0,998 and every measurement was carried out at least three times to ensure reproducibility within  $\pm 5\%$  [22].

#### *Isolation of porcine brain endothelial cells*

The isolation procedure was described in detail by Franke et. al. [23]. In brief, three fresh porcine brains obtained from the slaughterhouse were purged from meninges and capillaries, followed by the digestion of brains with the enzyme dispase to release the capillaries. After separating the capillaries by centrifugation and filtration a second enzymatic digestion was carried out using a mixture of dispase and collagenase (1+1). The obtained endothelial cells were seeded in T175-cell culture flasks with rat-tail-collagen-coated surfaces. For one brain two T175-cell culture flasks were needed.

#### *Cell culture conditions*

For culturing the porcine endothelial cells, puromycin-containing medium M199 was used on the first two days after extraction, to assure the highest possible purity of the endothelial cells. The puromycin-containing medium contained 10 % horse serum, 200 units/ml penicillin, 0.2 mg/ml streptomycin and 2  $\mu\text{g/ml}$  puromycin. After the first two days, the medium was replaced with a horse-serum containing M199 medium without puromycin. This medium was changed on the 4<sup>th</sup> day after the extraction of the porcine endothelial cells to a serum free Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 medium (DMEM/Ham's F12 medium). DMEM/Ham's F12 contained 200 units/ml penicillin, 0.2 mg/ml streptomycin and 550  $\mu\text{M}$  hydrocortisone.

#### *Coating of flasks and filters*

All surfaces on which endothelial cells grew and formed cell monolayers had to be coated with rat-tail collagen [24]. For coating of the T175-flasks with a surface of 175  $\text{cm}^2$ , 3 ml of the 0.1 mg/ml rat-tail collagen solution were added to the flask and then the flask was dried for 3 days at  $37^\circ\text{C}$ . No further washing steps were performed, before the cell suspension was added to the flask. For the coating of the Costar<sup>®</sup> Transwell<sup>®</sup> filter inserts, a solution of 0.04 mg/ml rat tail collagen was prepared. 100  $\mu\text{l}$  of the rat tail collagen solution was added to the filter insert and incubated over night in an incubator at  $37^\circ\text{C}$ . Finally the inserts were totally dried in the air flow of the laminar air flow workstation.

### *Permeability experiments*

To control the tightness of the endothelial monolayer the transendothelial electrical resistance (TEER) was measured by using a chopstick electrode and the Millicell<sup>®</sup>-ERS-device. Since the monolayer is tight when the resistance is above 300 Ohm\*cm<sup>2</sup> [23], all permeability experiments were done with monolayers showing a resistance higher than 300 Ohm\*cm<sup>2</sup>. Monolayers with lower resistance were not included in the investigation. In order to estimate the permeability of the endothelial monolayer, the CF flux was determined. The medium in the acceptor compartment of the inserts was replaced with the hank's balanced salt solution (HBSS). For the control experiment, CF was added to the inner compartment of the inserts at a concentration of 1 µM and the amount of CF in the acceptor compartment was measured spectroscopically. To estimate the influence of NO-donor substances the NO-donor was dissolved in 0.1 N NaOH (1µl) and then added to the inner compartment of the Transwell<sup>®</sup> insert parallel to the addition of CF. NO-donor prodrugs were dissolved in DMSO (1µl) and then added to the inner compartment. During the experiment the Corning<sup>®</sup> Transwell<sup>®</sup> filter containing 12-well plate was shaken at 500 rpm. Every 10 minutes a sample of 100 µl was withdrawn from the acceptor compartment and poured into a well of a 96-well-plate. The acceptor compartment was refilled with 100 µl of the fresh buffer solution. The fluorescence of the sample was measured in a plate reader (BMG FLUOstar Optima, Germany) and the CF concentration was calculated by the calibration curve analysis. The CF concentration used for the calibration curve ranged from 0.0001 µM to 1 µM.

### *Methylene blue experiments*

The effect of methylene blue on the influence of NO-donors and NO-donor prodrugs was investigated in a separate experiment.

A concentration of 50 µM of methylene blue was chosen to inhibit the intracellular available guanylate cyclase. 5 µl Methylene blue solution (5 mM) was added 10 minutes before the addition of the NO-donor compounds to ensure that methylene blue penetrates into the endothelial cells and inhibit the guanylate cyclase. 1.25 µl per insert of a 100 mM solution of sodium salt NONOates or NO-donor prodrugs were used.

### *Estimation of the apparent permeability coefficient ( $P_{app}$ )*

To estimate the  $P_{app}$ , we used the method described in literature [25; 26]. The  $P_{app}$ -value was calculated by using the following equation:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt \cdot V_A}{A \cdot 100\% \cdot 1/x}$$

$dQ/dt$  represents the slope of the diagram concentration versus time (%/sec),  $V_A$  represents the volume of the acceptor compartment (1.5 ml),  $A$  represents the surface of the filter insert (1.13 cm<sup>2</sup>) and  $x$  represents the ratio between the volume of the acceptor compartment and the volume of the donor compartment ( $x$  was 3 in all experiments).

### *Statistical analysis*

Data are presented as means ± standard errors of the mean (SEM). Comparisons between groups were made using Student's  $t$  test. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$  level.

## Results

### *Effect of direct NONOates on the BBB.*

For this study we used the three NO-donors: PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO and DETA/NO (see Fig. 1), that liberate NO directly after dissolution in aqueous media. The half-life of the NO-donors at pH 7.4 range from minutes for PHEPIPERAZI/NO and DBA/NO to several hours for DETA/NO. The investigated NONOate salts decreased the permeability of the endothelial cell monolayer for CF in a dose-dependant manner (Figs. 2-4). In Fig. 2 the CF concentration in the acceptor compartment versus time is shown, after treatment with three different concentrations of PHEPIPERAZI/NO (which has a half-life of approximately four minutes). PHEPIPERAZI/NO induced a significant decrease of the  $P_{app}$  even at the lowest used concentration of 100  $\mu\text{M}$ . By increasing the NO-donor concentration, the BBB permeability further decreased. The  $P_{app}$  for the treatment at 100  $\mu\text{M}$  was  $9.00 \times 10^{-6} \pm 3.32 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ,  $3.00 \times 10^{-6} \pm 1.07 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  for 250  $\mu\text{M}$  and only slightly lower when treated with 500  $\mu\text{M}$  of PHEPIPERAZI/NO ( $2.18 \times 10^{-6} \pm 0.80 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ ). The untreated monolayer showed a significant higher permeability with a permeation coefficient of  $27.74 \times 10^{-6} \pm 8.61 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Furthermore, the increase of CF concentration – on a lower level compared to control – was quite linear with time. In conclusion, the treatment with PHEPIPERAZI/NO in different concentrations lowered the permeability in a dose dependent manner. By using 100  $\mu\text{M}$  the permeability coefficient was reduced to  $38.0 \pm 8.7$  % of the control, further reductions were achieved with higher concentrations (250  $\mu\text{M}$ :  $-12.7 \pm 2.8$  % and 500  $\mu\text{M}$ :  $-9.2 \pm 2.1$  %).

DBA/NO reduced the permeability for CF in all investigated concentrations (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$ ) compared to the untreated monolayers (Fig. 3). The half-life for DBA/NO is approximately 1.5 min at pH 7.4. The increase of the CF concentration in the acceptor compartment was very low compared to the experiment with PHEPIPERAZI/NO. Note that this was due to the higher tightness of the monolayer in the batch used for this experiment. The apparent permeability coefficients of the CF flux after the treatment with the three investigated concentrations of DBA/NO were lower than the apparent permeability coefficient of the flux of the untreated cells. In contrast to the action of PHEPIPERAZI/NO, there was no significant difference between the three investigated concentrations (100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ ) of DBA/NO and the permeation coefficients were found to be similar: for 100  $\mu\text{M}$  the  $P_{app}$  was  $0.64 \times 10^{-6} \pm 0.005 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ , for 250  $\mu\text{M}$  it was  $0.66 \times 10^{-6} \pm 0.21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  and using the highest concentration of 500  $\mu\text{M}$  the  $P_{app}$  was  $0.46 \times 10^{-6} \pm 0.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . The untreated monolayer reached a  $P_{app}$  of  $1.83 \times 10^{-6} \pm 0.17 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . The reduction of the apparent permeability coefficient for the 100  $\mu\text{M}$  and the 250  $\mu\text{M}$  concentration of DBA/NO was nearly the same ( $35.0 \pm 1.5$  % and  $36.3 \pm 7.4$  % of the control). After applying DBA/NO in a concentration of 500  $\mu\text{M}$  the  $P_{app}$ -value was reduced to  $25.2 \pm 4.9$  % of the control.

Similarly, the treatment with DETA/NO (compound with the longest half-life of the investigated non-prodrug NO-donors, i.e. ~20 hours in a solution of pH 7.4 at 37°C [27]), resulted in the reduction of the permeability of the marker substance (Fig. 4) and lowered permeability coefficients, especially at higher concentrations. The influence of the low concentration of DETA/NO, i.e. 100  $\mu\text{M}$ , was weak and there is no significant difference in the permeation coefficients of 100  $\mu\text{M}$  NO-donor treatment and



untreated control cells. For untreated endothelial cells (control) a  $P_{app}$  of  $27.74 \times 10^{-6} \pm 8.61 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  was found which slightly decreased with the use of the 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO to a value of  $24.04 \times 10^{-6} \pm 4.34 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . The 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO solution yielded a higher significant reduction of the permeability, especially in the first 60 minutes ( $P_{app}$ :  $11.10 \times 10^{-6} \pm 2.00 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ) after addition. Surprisingly, at a concentration of 500  $\mu\text{M}$  no further permeability decrease was observed ( $11.63 \times 10^{-6} \pm 2.07 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). The use of the 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO did not change the permeability coefficient compared to the control ( $101.6 \pm 15.5$  % of the control). However,  $P_{app}$  decreased using higher concentrations of DETA/NO (250  $\mu\text{M}$ :  $-46.9 \pm 7.2$  % and 500  $\mu\text{M}$ :  $-49.2 \pm 7.5$  %).

### *Nitric oxide donor prodrugs*

NO donor prodrugs like Et-PHEPIPERAZI/NO, Et-BUPIPERAZI/NO and Tosyl-PYRRO/NO (Fig. 1) have to be cleaved by cell enzymes in order to produce the corresponding NO releasing NONOates PHEPIPERAZI/NO ( $t_{1/2}$ = 4 min); BUPIPERAZI/NO ( $t_{1/2}$ = 3 min) and PYRRO/NO ( $t_{1/2}$ = 3 sec.).

A concentration vs. time plot (Fig. 5) shows the influence of increasing concentrations of the NO-donor-prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO on the permeability of CF in the BBB model. In contrast to the treatment with the corresponding “drug” PHEPIPERAZI/NO, the permeability of the marker CF increases dramatically in a dose dependent manner. In this experiment, the untreated cells (control) showed a permeation coefficient of  $1.88 \times 10^{-6} \pm 0.17 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . The lowest increase was obtained with 100  $\mu\text{M}$  of Et-PHEPIPERAZI/NO, and the corresponding apparent permeation coefficient was  $7.77 \times 10^{-6} \pm 0.008 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , which is  $416.8 \pm 22.1$  % of the untreated monolayer. The 250  $\mu\text{M}$  solution of Et-PHEPIPERAZI/NO increased the permeability further ( $P_{app}$  of  $38.91 \times 10^{-6} \pm 6.54 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} = 2086.4 \pm 238.8$  % of control) and the highest concentration of Et-PHEPIPERAZI/NO resulted in the highest flux of CF ( $P_{app} = 57.23 \times 10^{-6} \pm 3.55 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1} = 3068.9 \pm 174.9$  % of the control).

TOSYL-PYRRO/NO, the substance which is cleaved to the fast releaser PYRRO/NO, also increased the flux through the endothelial monolayer (Fig. 6):  $P_{app} = 31.69 \times 10^{-6} \pm 1.18 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  for the 100  $\mu\text{M}$  concentration,  $92.03 \times 10^{-6} \pm 4.94 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  for 250  $\mu\text{M}$  and  $83.93 \times 10^{-6} \pm 2.07 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  for the highest concentration of TOSYL-PYRRO/NO (Control:  $4.57 \times 10^{-6} \pm 0.16 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ). This increase of the CF flux was obviously not further enhanced by the use of the highest concentration of TOSYL-PYRRO/NO (500  $\mu\text{M}$ ). The lowest concentration increased the permeation to  $708.9 \pm 15.1$  % of the control, the median concentration of 250  $\mu\text{M}$  led to the highest permeation ( $2019.2 \pm 66.2$  % of the control), while the highest investigated concentration (500  $\mu\text{M}$ ) led only to  $1841.4 \pm 45.8$  % of the control.

The third NONOate prodrug Et-BUPIPERAZI/NO influenced the primary porcine endothelial cell monolayer differently compared to other NO-donor prodrugs. Similar to the directly NO donating NONOates it did not increase, but it reduced the flux of CF in a concentration dependant manner (Fig. 7). With increasing the concentrations from 100  $\mu\text{M}$  to 500  $\mu\text{M}$ , the increase of the concentration of the marker substance in the acceptor compartment was lower in respect to the control. The corresponding apparent permeation coefficients illustrate this effect. For the 100  $\mu\text{M}$  solution of Et-BUPIPERAZI/NO the  $P_{app}$  was  $3.70 \times 10^{-6} \pm 0.21 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , for the 250  $\mu\text{M}$  solution the  $P_{app}$  was  $2.13 \times 10^{-6} \pm 0.24 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , and by applying the 500  $\mu\text{M}$  Et-BUPIPERAZI/NO a  $P_{app}$ -value of  $1.81 \times 10^{-6} \pm 0.44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

<sup>1</sup> was obtained. These low values represent reductions of  $81.1 \pm 2.7 \%$  (100  $\mu\text{M}$ ),  $46.7 \pm 2.7 \%$  (250  $\mu\text{M}$ ) and  $39.6 \pm 4.9 \%$  (500  $\mu\text{M}$ ) of the control. For the untreated cells we found a permeation coefficient of  $4.57 \times 10^{-6} \pm 0.16 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . A significant difference to the control was only observed by using higher concentrations, i.e. 250  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$  solution of this prodrug, whereas the curve for the 100  $\mu\text{M}$  Et-BUPIPERAZI/NO treatment was nearly identical to control.

#### *Methylene blue experiments*

Many biological effects of nitric oxide are performed by stimulating the soluble guanylate cyclase (sGC), thus increasing the intracellular amount of cyclic guanylate monophosphate (cGMP). Methylene blue is known to inhibit this enzyme [28; 29] and additionally acting as a NO scavenger [30; 31]. Therefore, it may block physiological effects in the cell culture system caused by subsequent addition of NO-donors.

The results of the investigation of the methylene blue addition prior to the addition of the NO-donors or NO-donor prodrugs to the monolayer of the endothelial cells are summarized in Table 1.

The use of the 250  $\mu\text{M}$  DETA/NO resulted in a permeability  $P_{\text{app}}$  of  $51.7 \pm 2.7 \%$  relative to control, thus showing a significant reduction compared to the control. Upon applying DETA/NO together with the radical scavenger methylene blue, the permeation coefficient raised to  $141.4 \pm 12.4 \%$  of the control. The same was observed using the NO-donor DBA/NO, i.e. the  $P_{\text{app}}$  increased from  $67.0 \pm 6.4 \%$  of the control value without methylene blue to  $146.7 \pm 12.9 \%$  with methylene blue. The highest effect of methylene blue on the change of the  $P_{\text{app}}$ -value was observed using PHPIP/NO. The permeation coefficient raised to  $314.0 \pm 20.5 \%$  when PHPIP/NO was added. The combination of both PHEPIPERZI/NO and methylene blue reduced the  $P_{\text{app}}$ -value to  $67.1 \pm 1.3 \%$  of the control. Addition of methylene blue led to a significant change of the  $P_{\text{app}}$ -values for all investigated NO-donors which spontaneously release nitric oxide in aqueous medium at pH 7.4 (Fig. 8).

It was not possible to block the permeability increasing effect of TOSYL-PYRRO/NO, Et-PHEPIPERAZI/NO and Et-BUPIPERAZI/NO using methylene blue (Fig. 8). This fact is also illustrated by the percentage enhancement of the apparent permeability coefficient. In the case of the NO-donor prodrug TOSYL-PYRRO/NO the percentage of the permeation coefficient enhancement was  $1539.5 \pm 48.0 \%$  of the control for the experiment without methylene blue, whilst in the experiment with methylene blue the value was  $1356.0 \pm 45.6 \%$  of the control. The value of the percentage enhancement of the  $P_{\text{app}}$  for the experiment with Et-PHEPIPERAZI/NO was  $1210.0 \pm 184.9 \%$  of the control without methylene blue and  $1361.3 \pm 85.3 \%$  for the treatment with NO-donor prodrug and methylene blue. Methylene blue was able to further increase the effect of the prodrug Et-BUPIPERAZI/NO. The permeation coefficient raised from  $283.0 \pm 19.3 \%$  of the control in the experiment with Et-BUPIPERAZI/NO to a value of  $938.3 \pm 49.9 \%$  of the control in the test with methylene blue and Et-BUPIPERAZI/NO.

## Discussion

The main function of the blood-brain barrier (BBB) is the maintenance of the cerebral liquor composition and the environment of the nerve cells. Many factors influence the regulation of the permeability of the BBB. Nitric oxide has been reported to be one of them [10; 18; 32; 33].

Primary endothelial cells are considered to be the blood-brain barrier model closest to the *in vivo* situation. They retain most of the cell properties of the brain capillary endothelial cells. Despite of this, the biggest disadvantage in using primary endothelial cells as model is the loss of some features during cultivation. In fact, one should not work with cells which are often passaged to gain information which are related closer to the *in vivo* situation. Therefore, we worked with primary endothelial cells which were passaged only once to ensure that all data generated on the influence of the NO-donating compounds on the permeability of the BBB are as close as possible to the *in vivo* conditions.

All of the investigated NO-donors, which spontaneously release NO in the aqueous solution (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO), decreased the permeability of the endothelial monolayer in our BBB model in a dose dependant manner. The strongest "tightening" effect was found for DBA/NO and the resulting permeability coefficients were the lowest measured. PHEPIPERAZI/NO and DETA/NO were found to be less effective and less dose dependent, i.e. the effect on the endothelial cells could not be increased by increasing the concentration of the NO-donor above 250  $\mu\text{M}$ .

In the investigation of Wong et al. [34] DETA/NO showed an increasing effect on the transendothelial electrical resistance (TEER) and similarly a decreasing effect on the permeability for horse radish peroxidase in an *in vitro*-model formed by confluent human brain microvessel endothelial cells. By using 100  $\mu\text{M}$  DETA/NO there was seen a 20% increase in TEER and a 50 % reduction for the horse radish permeability. These data are in good correlation with our findings for the DETA/NO treatment of endothelial monolayers. The use of 250  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$  of DETA/NO reduced in our experiment the permeability coefficient for CF to 50 % of the control. Boje and Lakhman [18] treated rats with DETA/NO and found that this NO-donor has no effect on the permeability in the *in vivo* experiment compared to untreated animals. The other NONOates used in the study of Boje and Lakhman showed slight to moderate permeability increasing effects on the permeability of the blood-brain barrier. Our results and the results of Wong et al. [34] are not in accordance with this effect, i.e. we could show a permeability decreasing effect of direct NO-donor substances on the endothelial cells, at least for the tested marker substance CF. This result could be an indication, that the *in vitro* results are not vigorous enough to be seen *in vivo*. Mayhan [33] investigated SIN-1 and SNAP by performing several *in vivo* experiments. In contrast to our findings upon using NONOates, they observed a permeability increase after infusion of SIN-1 or SNAP obtained by an increased clearance of FITC-dextran-10k.

NO-donor prodrugs have not been investigated before in this context. Therefore we synthesized three novel diazeniumdiolate prodrugs (Et-PHEPIPAZI/NO, TOSYL-PYRRO/NO, Et-BUPIPERAZI/NO). Due to their stability in aqueous solution and their higher lipophilicity, the resulting intracellular amount of NO in our model is supposed to be higher than by using NONOate sodium salts which instantaneously start to liberate NO extracellularly after being dissolved in the buffer. According to this, we conclude that the effects of these prodrugs are based on an intracellular release of NO exclusively. A possible explanation of the action of NO-donor prodrugs on endothelial cells is the increase of cGMP by

activation of intracellular guanylate cyclase by the released NO [6]. Chi et al. [35] showed a dose dependent increase in the permeability of brain microvessels by cGMP. The possibility that the permeability increase is simply caused by cytotoxic effects from higher intracellular NO concentration is unlikely, as the third prodrug Et-BUPIPERAZI/NO did not show this effect. Cytotoxic studies done by our group showed no cytotoxic effect of NO-donors and NO-donor prodrugs on primary endothelial cells (Data not shown).

Hurst and Fritz [32] have shown this intracellular effect of NO by using the intracellular accumulating substance Roussin's black salt which is not able to release nitric oxide outside the cells. This compound reduced the resistance of a co-culture model of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC-304) in a dose-dependent manner. In that investigation it was possible to inhibit the described effect by the use of haemoglobin and methylene blue.

Our results are in accordance with these findings, i.e. we could also inhibit the permeability reducing effect of the investigated NO-donors PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO and DETA/NO by the use of methylene blue. The permeability increasing effect of TOSYL-PYRRO/NO and Et-PHEPIPERAZI/NO could not be reduced by using the substance methylene blue. Methylene blue acts in two ways. It can block the guanylate cyclase activity [28; 29] and it may act additionally as a NO-scavenger via generation of the superoxide anion [30; 31]. The amount of methylene blue could be too low to prevent the activation of the guanylate cyclase by the high amount of NO released by the NO-donor substances TOSYL-PYRRO/NO and Et-PHEPIPERAZI/NO.

The generation of the superoxide anion by methylene blue reduces the amount of NO in the donor compartment released by the spontaneously releasing NO-donor substances. Hence the permeability reducing effect of NO-donors was blocked when methylene blue was administered to the endothelial cells.

We conclude that the mechanism of increasing the permeability of the endothelial cells induced by NO-donor prodrugs was different compared to the mechanism of decreasing the permeability upon treatment with spontaneously NO-releasing compounds.

The influence on the permeability of endothelial cells depends mainly on the released NO species; this was shown by the investigation of Boje and Lakhman [18]. We only used compounds in our investigations which release the radical form NO<sup>•</sup> and therefore observed influences only depend on this. Hence, the influence on endothelial cells should be comparable between NO-donors and NO-donor prodrugs. Our different findings for NO-donors, which reduce the permeability of endothelial cells, and NO-donor prodrugs, which increase dramatically the permeability could certainly not be a result of different NO-species.

The amount of NO which is present to react with the intracellular guanylate cyclase is lower by the use of direct NO-releasers, while the intracellular NO concentration is higher using permeable NO-donor prodrugs. The level of cGMP produced by the cells, increases by the influence of the NO-donor prodrugs. We conclude that increasing intracellular levels of cGMP can decrease the permeability, while low levels of cGMP accordingly increase the permeability of the blood brain barrier.

The present study demonstrates that the newly developed NO-donor prodrugs showed a different behaviour compared to the spontaneous NO releasers.

## Acknowledgement

We thank Ms. Isabella Klein for technical assistance during the extraction and cultivation of the endothelial cells.

## References

- [1] M.P. Gupta, M.D. Ober, C. Patterson, M. Al-Hassani, V. Natarajan, and C.M. Hart, Nitric oxide attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial barrier dysfunction: mechanism of protection. *J. Physiol.* 280 (2001) L116-L126.
- [2] W.G. Mayhan, Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheek pouch in response to adenosine 5'-diphosphate and bradykinin. *Inflammation* 16 (1992) 295-305.
- [3] W.G. Mayhan, Nitric oxide accounts for histamine-induced increases in macromolecular extravasation. *Am. J. Physiol.* 266 (1994) H2369-H2373.
- [4] Y. Yuan, H.J. Granger, D.C. Zawieja, and W.M. Chilian, Flow modulates coronary venular permeability by a nitric oxide-related mechanism. *Am. J. Physiol.* 263 (1992) H641-H646.
- [5] W.G. Mayhan, Role of nitric oxide in disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension. *Brain Res.* 686 (1995) 99-103.
- [6] W.G. Mayhan, VEGF increases permeability of the blood-brain barrier via a nitric oxide synthase/cGMP-dependent pathway. *Am. J. Physiol.* 276 (1999) C1148-C1153.
- [7] S. Arnhold, D. Antoine, H. Blaser, W. Bloch, C. Andressen, and K. Addicks, Nitric oxide decreases microvascular permeability in bradykinin stimulated and nonstimulated conditions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 33 (1999) 938-947.
- [8] M. Feletou, E. Bonnardel, and E. Canet, Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: role of nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* (1996).
- [9] R.D. Hurst, and J.B. Clark, Nitric oxide-induced blood-brain barrier dysfunction is not mediated by inhibition of mitochondrial respiratory chain activity and/or energy depletion. *Nitric oxide* 1 (1997) 121-129.
- [10] P. Kubes, Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: A regulatory role for cGMP. *Am. J. Physiol.* 265 (1993) H1909-H1915.
- [11] S.R. Mariani-Pedroso, L. Bizeto, E. Antunes, R. Zatz, and G. de Nucci, Dissimilarity between prostaglandin E1 and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo, Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 52 (1995) 399-402
- [12] E. Fujii, K. Wada, H. Ishida, T. Yoshioka, and T. Muraki, Role of endogenous nitric oxide in the nitric oxide donor-induced plasma extravasation of mouse skin. *Eur. J. Pharmacol.* 377 (1999) 219-222.
- [13] G. Gimeno, P.H. Carpentier, S. Desquand-Billiald, R. Hanf, and M. Finet, L-Arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester cause macromolecular extravasation in the microcirculation of awake hamsters. *Eur. J. Pharmacol.* 346 (1998) 275-282.

- [14] M.J. Menconi, N. Unno, M. Smith, D.E. Aguirre, and M.P. Fink, Nitric oxide donor-induced hyperpermeability of cultured intestinal epithelial monolayers: role of superoxide radical, hydroxyl radical, and peroxynitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 1425 (1998) 189-203.
- [15] W.G. Mayhan, and S.P. Didion, Glutamate-induced disruption of the blood-brain barrier in rats. Role of nitric oxide. *Stroke* 27 (1996) 965-970.
- [16] A. Shukla, M. Dikshit, and R.C. Simal, Nitric oxide-dependent blood-brain barrier permeability alteration in the rat brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 52 (1996) 136-140.
- [17] D.I. Utepbergenov, K. Mertsch, A. Sporbert, K. Tenz, M. Paul, R.F. Haseloff, and I.E. Blasig, Nitric oxide protects blood-brain barrier in vitro from hypoxia/reoxygenation-mediated injury. *FEBS Lett.* 424 (1998) 197-201.
- [18] K.M.K. Boje, and S.S. Lakhman, Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293 (2000) 545-550.
- [19] J. Konter, G. El-Din Ali Ahmed Hassan Abuo-Rahma, A. El-Emam, and J. Lehmann, The NOTizer—a device for the convenient preparation of diazen-1-ium-1,2-diolates. *Methods Enzymol.* 396 (2005) 17-26.
- [20] J. Konter, G. El-Din Ali Ahmed Hassan Abuo-Rahma, A. El-Emam, and J. Lehmann, part 11: Synthesis of diazen-1-ium-1,2-diolates monitored by the “NOTizer”: The relations between formation rates, molecular structure and release of nitric oxide. *Eur. J. Org. Chem.* (in press).
- [21] J.A. Hrabie, J.R. Klose, D.A. Wink, and L.K. Keefer, New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.* 58 (1993) 1472-1476.
- [22] R.A. Raechelle, Y. Wang, P.H. Ruane, B.M. Showalter, J.E. Saavedra, K.M. Davies, M.L. Citro, M.N. Booth, L.K. Keefer, and J.P. Toscano, Preparation and reactivity of O<sub>2</sub>-sulfonated diazeniumdiolates. *J. Org. Chem.* 68 (2003) 656-657.
- [23] H. Franke, H.-J. Galla, and C.T. Beuckmann, Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res. Prot.* 5 (2000) 248-256.
- [24] T. Tilling, D. Korte, D. Hoheisel, and H.-J. Galla, Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial functions in vitro. *J. Neurochem.* 71 (1998) 1151-1157.
- [25] B. Bauer, *In vitro Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke zur Untersuchung der Permeation und P-Glykoprotein-Interaktion von Arzneistoffen*, Institute of Biopharmaceutics and Pharmaceutics, University of Heidelberg, Heidelberg, 2002.
- [26] M. Török, J. Huwyler, H. Gutmann, G. Fricker, and J. Drewe, Modulation of transendothelial permeability and expression of ATP-binding cassette transporters in cultured brain capillary endothelial cells by astrocytic factors and cell-culture conditions. *Exp. Brain Res.* 153 (2003) 356-365.
- [27] D.L. Mooradian, T.C. Hutsell, and L.K. Keefer, Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 (1995) 674-8.
- [28] W. Martin, G.M. Villani, D. Jothianandan, and R.F. Furchgott, Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate- induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 132 (1985) 708-716.

- [29] B. Mayer, F. Brunner, and K. Schmidt, Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem. Pharmacol.* 45 (1993) 367-374.
- [30] N. Marczin, U.S. Ryan, and J.D. Catravas, Methylene Blue Inhibits Nitrovasodilator- and Endothelium-Derived Relaxing Factor-Induced Cyclic GMP Accumulation in Cultured Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Generation of Superoxide Anion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 (1992) 170-179.
- [31] A. Miclescu, S. Basu, and L. Wiklund, Methylene blue added to a hypertonic-hyperoncotic solution increases short-term survival in experimental cardiac arrest. *Crit. Care Med.* 34 (2006) 2806-2813.
- [32] R.D. Hurst, and I.B. Fritz, Nitric oxide-induced perturbations in a cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell. Physiol.* 167 (1996) 89-94.
- [33] W.G. Mayhan, Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 866 (2000) 101-108.
- [34] D. Wong, K. Dorovini-Zis, and S.R. Vincent, Cytokines, nitric oxide and cGMP modulate the permeability of an in vitro model of the human blood-brain barrier. *Exp. Neurol.* 190 (2004) 446-455.
- [35] O.Z. Chi, X. Liu, and H.R. Weiss, Effects of Cyclic GMP on Microvascular Permeability of the Cerebral Cortex. *Microvasc. Res.* 58 (1999) 35-40.

Table 1. Apparent permeation coefficient for the NO-donor treatment compared with NO-donor treatment after incubation of the cells with methylene blue and compared with untreated cells,  $P_{app}$  values are mean  $\pm$  SEM ( $\times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ), experiments were done as triplicate

	Control without NO-donor	250 $\mu\text{M}$ NO-donor	250 $\mu\text{M}$ NO donor + 50 $\mu\text{M}$ methylene blue
PHEPIPERAZI/NO	0.85 $\pm$ 0.00	2.67 $\pm$ 0.35	0.57 $\pm$ 0.02
DBA/NO	1.83 $\pm$ 0.17	1.18 $\pm$ 0.14	2.58 $\pm$ 0.26
DETA/NO	1.83 $\pm$ 0.17	0.91 $\pm$ 0.02	2.56 $\pm$ 0.32
Et-PHEPIPERAZI/NO	4.57 $\pm$ 0.16	55.15 $\pm$ 16.72	62.05 $\pm$ 7.46
TOSYL-PYRRO/NO	4.57 $\pm$ 0.16	70.17 $\pm$ 3.60	61.81 $\pm$ 3.53
Et-BUPIPERAZI/NO	1.83 $\pm$ 0.17	5.21 $\pm$ 0.36	17.34 $\pm$ 0.39

**Figures:**

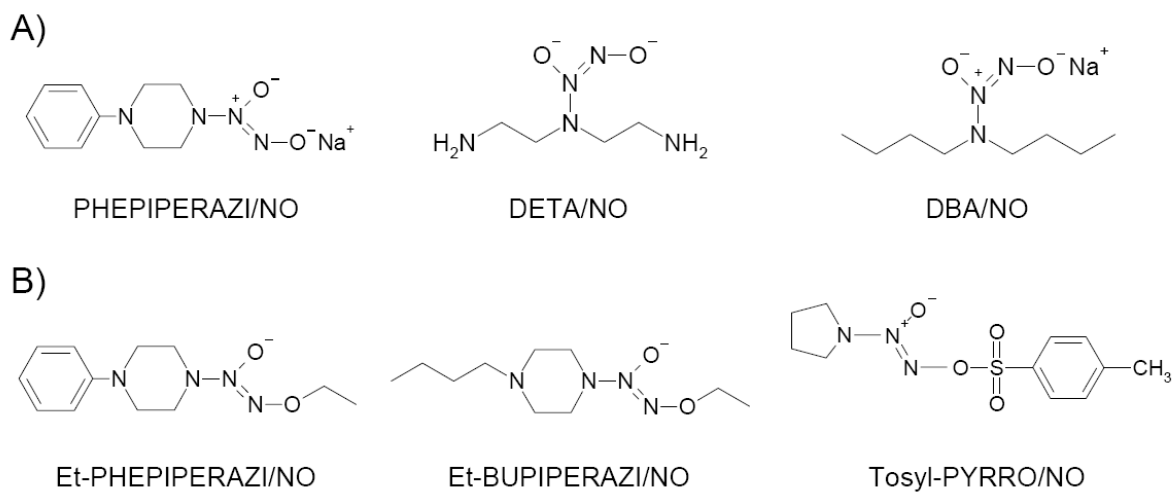


Fig. 1. Chemical structure of the used NONOates (A) and NONOate prodrugs (B)

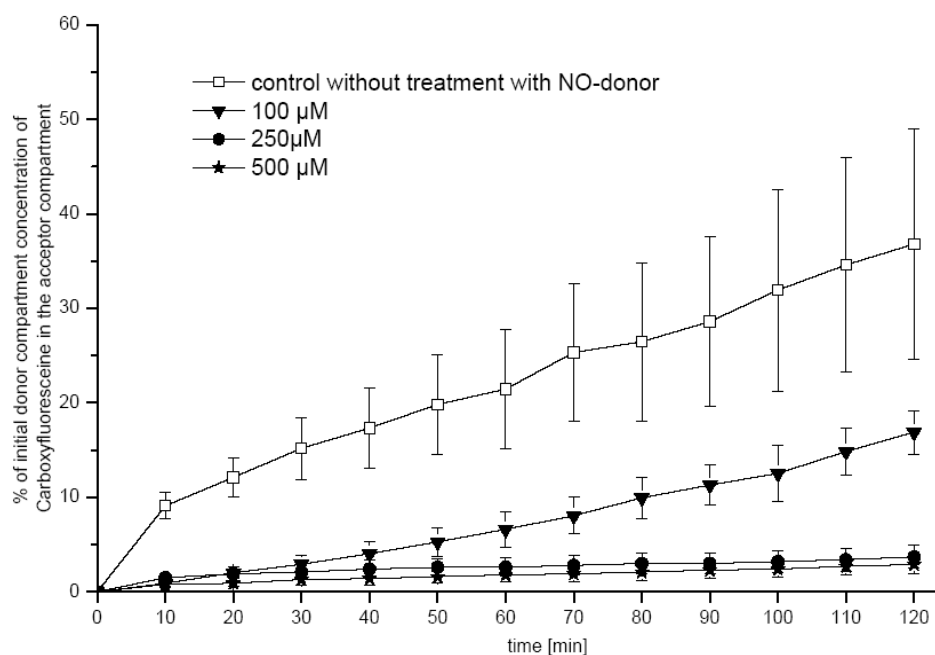


Fig. 2. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor PHEPIPERAZI/NO at concentrations of 100 μM, 250 μM and 500 μM, values are mean ± SEM



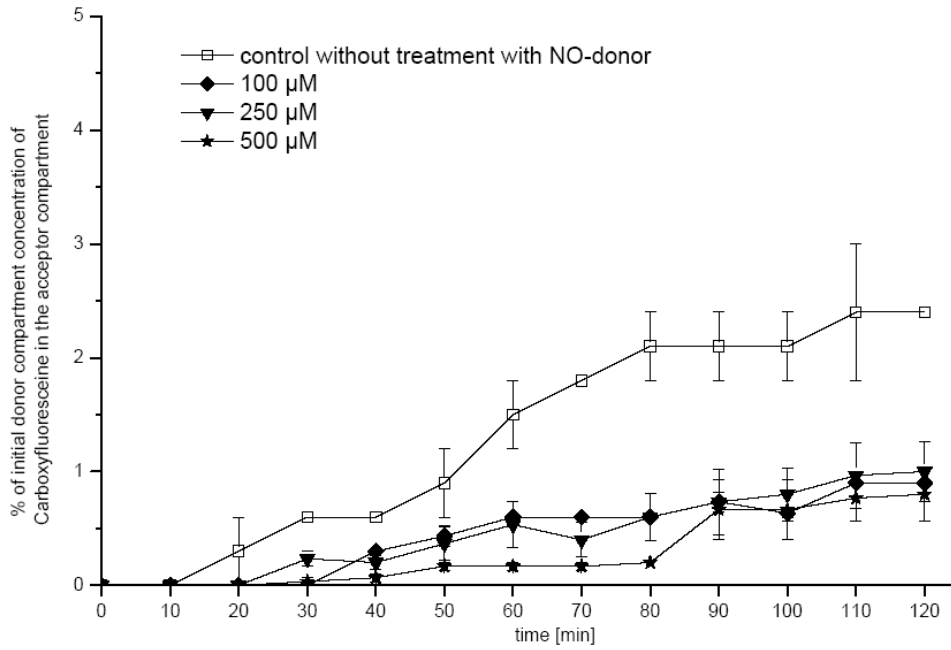


Fig. 3. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor DBA/NO at concentrations of 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M, values are mean  $\pm$  SEM

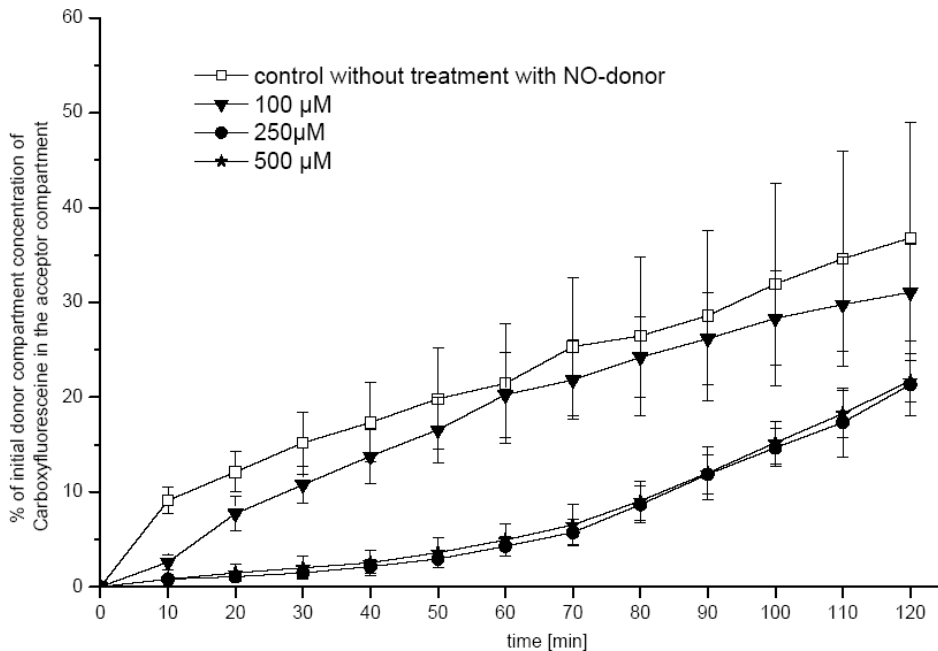


Fig. 4. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor DETA/NO at concentrations of 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M and 500  $\mu$ M, values are mean  $\pm$  SEM

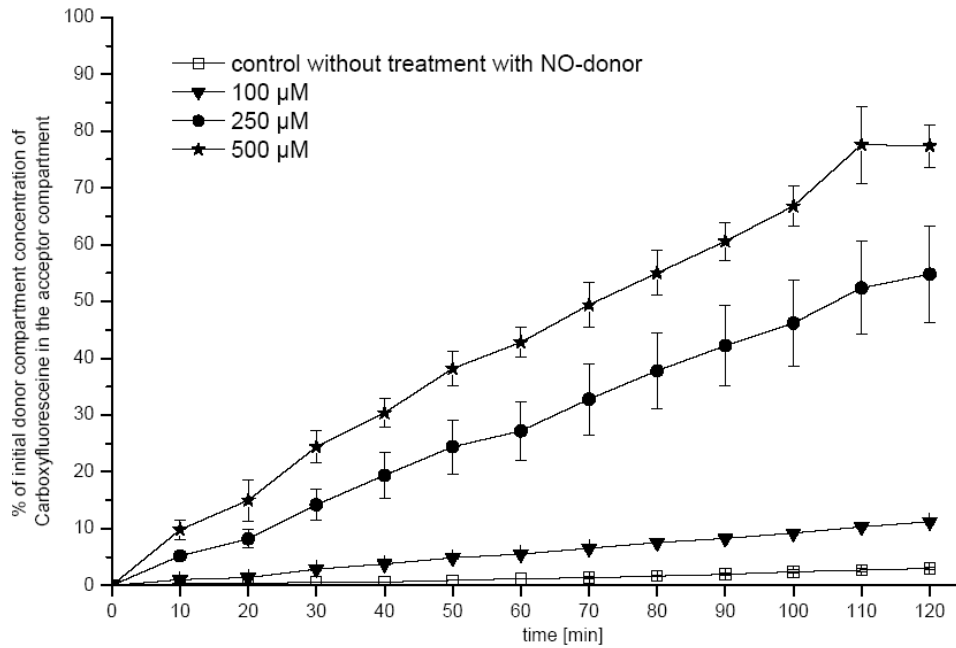


Fig 5. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor-prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO at concentrations of 100 μM, 250 μM and 500 μM, values are mean ± SEM

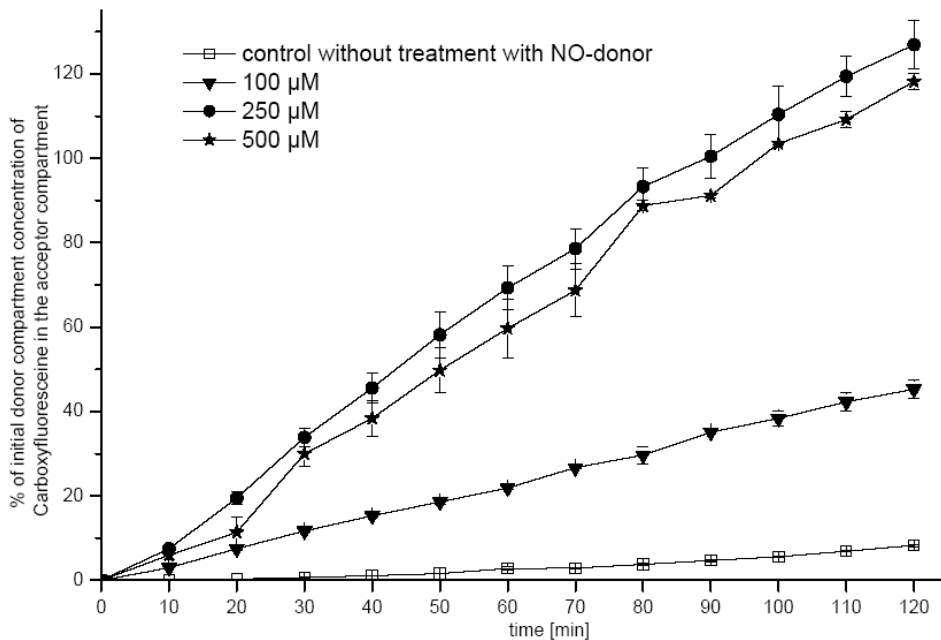


Fig 6. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor-prodrug TOSYL-PYRRO/NO at concentrations of 100 μM, 250 μM and 500 μM, values are mean ± SEM

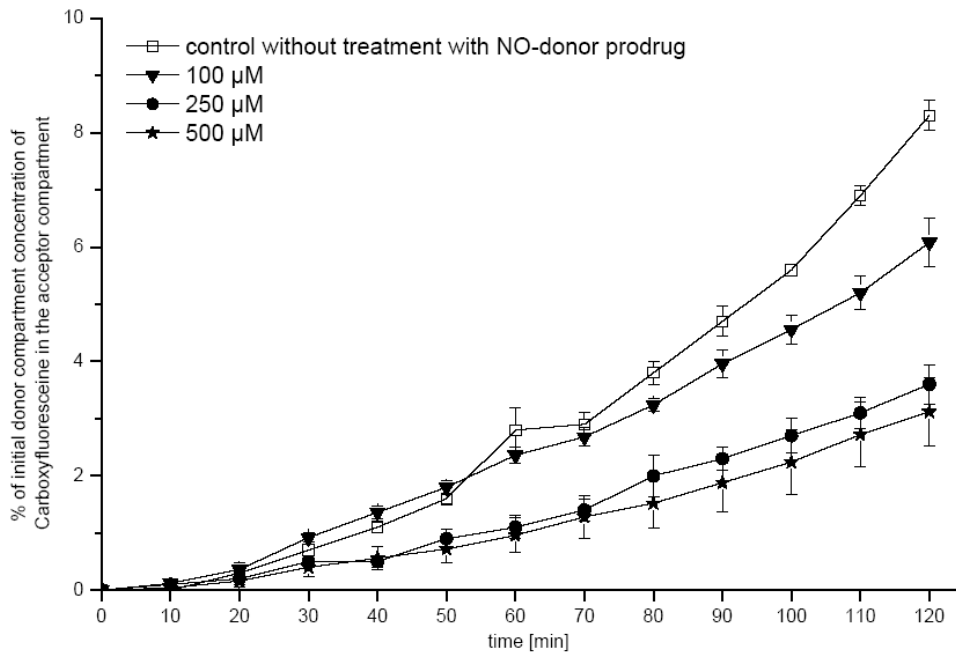


Fig. 7. Time course for the concentration of the marker substance carboxyfluorescein in the acceptor compartment for the untreated cells (control) and by adding the NO-donor-prodrug Et-BUPIPERAZI/NO at concentrations of 100  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  and 500  $\mu\text{M}$ , values are mean  $\pm$  SEM

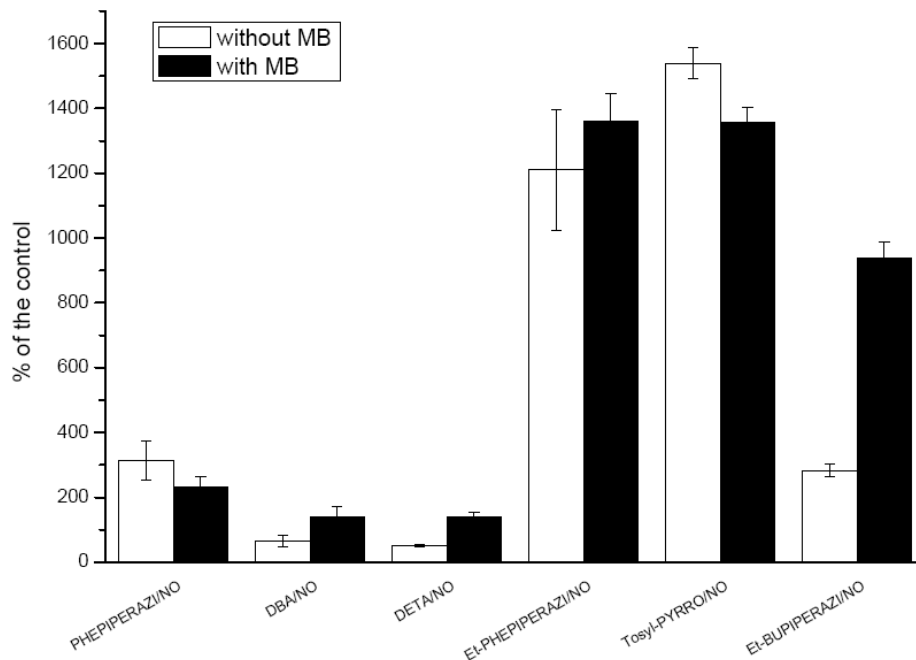


Fig. 8. Change of the  $P_{app}$ -value compared to the control for the methylene blue (MB) influence experiment, NO-donor treatment (empty bars) vs. NO-donor treatment after incubation of the endothelial cells with methylene blue (filled bars), %-values are mean  $\pm$  SEM, experiments were done as triplicate

## **Veröffentlichung 6 (Patentschrift)**

**Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und  
Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische  
Wirkstoffe**

Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. Eingereicht beim  
Deutschen Patent- und Markenamt (25.07.2007).

## Beschreibung der Erfindung

### 5 **Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkstoffe**

10 **[0001]** Die Erfindung betrifft neue Derivate von Ketoconazol (INN: Ketoconazolum; IUPAC: 1-(4-  
{{2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl} methoxy}phenyl)piperazine;  
siehe Formel III) und strukturelle Analoga, die in der Lage sind, auf molekularer Ebene  
Stickstoffmonoxid (NO) und andere reaktive Stickstoffspezies (RNS) freizusetzen bzw. zu  
erzeugen und als antimikrobiell wirksame Derivate in der antiinfektiven Therapie Einsatz finden  
können, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung. Antiinflammatorische Eigenschaften der neuen  
Verbindungen unterstützen zusätzlich die Therapie.

15 **[0002]** Als NO-freisetzende funktionelle Gruppe der Verbindungen, dienen strukturell  
unterschiedliche Derivate der Diazen-1-ium-1,2-diolate (kurz: Diazeniumdiolate oder NONOate).

20 **[0003]** Die Freisetzung von NO und anderen RNS aus diesen Verbindungen kann durch  
geeignete analytische Messverfahren, wie zum Beispiel der Amperometrie oder UV-VIS-  
Spektroskopie, verfolgt werden. Das Messen definierter Halbwertszeiten (HWZ;  $t_{1/2}$ ) der NO-  
Freisetzung aus den Verbindungen dient der Abschätzung der möglichen Expositionsdauer von  
Mikroorganismen mit NO und anderen RNS.

25 **[0004]** Ketoconazol gehört zu der Gruppe der Azol-Antimykotika und ist wirksam gegen  
Mikroorganismen, beispielsweise Pilze, Bakterien und Parasiten, wie z. B. Plasmodien.

30 **[0005]** Ketoconazol ist pharmakodynamisch ein Hemmstoff der Ergosterolbiosynthese, dem  
Cholesterin-Äquivalent des Plasmalemm der Pilze. Ein Zwischenschritt dieser Biosynthese ist die  
Demethylierung von Lanosterin zu 14-Desmethyl-Lanosterin, katalysiert durch ein Cytochrom P450  
abhängiges Enzym, der 14- $\alpha$ -Demethylase. Dessen Hemmung erfolgt durch die Bindung des  
Imidazol-Restes von Ketoconazol an das Häm-Eisen der Cytochrom P450. Durch die Hemmung  
entstehen, statt des Ergosterol, strukturell falsche Sterole, deren Einlagerung in das Plasmalemm  
der Pilze zu Instabilität der Zellwände und folglich dem Tod der Pilzzellen führt.

35 **[0006]** Die Einlagerung dieser strukturell falschen Sterole in die Zellwand wirkt auf das  
Pilzwachstum fungistatisch, verursacht durch Stabilitätsstörungen der Membran und durch die  
Beeinträchtigung der Funktion membranständiger Enzyme. In sehr hohen Dosierungen kommen  
durch die direkte Einlagerung der Azole in das Plasmalemm und dem damit verbundenen Austritt  
essentieller Zellbestandteile auch fungizide Effekte zustande.

**[0007]** Ketoconazol zeichnet sich durch eine hohe Wirksamkeit bei Systemmykosen, Candida-Infektionen des Mundraumes und des Gastrointestinaltraktes, rezidivierenden Vaginalmykosen und Dermatophytenbefall der Haut aus. Bei der oralen Gabe können lebertoxische Effekte sowie durch  
5 Hemmung der Testosteronsynthese bedingte Gynäkomastie auftreten. Äußerlich wird Ketoconazol bei Pilzbefall der Haut, wie z. B. Kopfschuppen, angewendet.

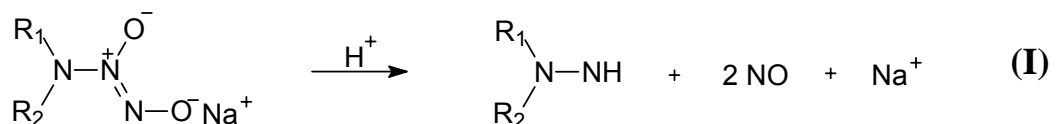
**[0008]** Eines der bedeutendsten Merkmale des NO, in Bezug auf seine physiologische Funktion, ist die sehr hohe Affinität zu Häm-Proteinen, die fester Bestandteil vieler Enzyme, wie z. B. der  
10 löslichen Guanylatcyclase (sGC), der Cyclooxygenase und der Cytochrome ist.

**[0009]** Für die Erfindung steht neben den vielfältigen Wirkungen des NO und anderer RNS die

- Relaxation der Gefäßmuskulatur und damit auch bessere Durchblutung
- die NO-vermittelte Immunabwehr, z. B. durch Aktivierung von antigenpräsentierenden  
15 Zellen, Zytokinen und T-Zellen
- der direkte Effekt gegen Angriff von Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten durch Modulation der reproduktionsvermittelnden Cysteinproteasen und anderer zellulärer Zielstrukturen
- antiinflammatorische Eigenschaften

20 im Vordergrund.

**[0010]** Diazoniumdiolate setzen als wasserlösliche Natrium-Salze nach der allgemeinen Formel I



25

direkt und spontan zwei Moleküle NO in Lösung frei.

Die Kinetik der Freisetzung hängt in gewissen Grenzen ab von:

- dem pH-Wert der Lösung
- der Temperatur
- der Art des verwendeten Lösungsmittels
- und insbesondere von der Struktur des sekundären Amin ( $R_1R_2N-$ ), welches die  $-[N(O)NO]^-$  Gruppe bindet.

30

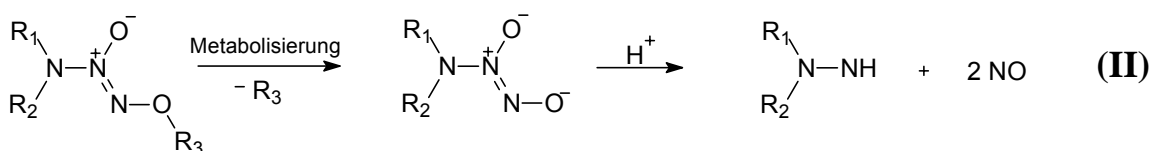
Niedrige pH-Werte und Erhöhung der Temperatur beschleunigt die Freisetzung. Die Reste des Amin ( $R_1, R_2$ ) können, je nach Struktur, die NO-Freisetzung beschleunigen oder verlangsamen. Als  
35 Feststoffe sind Diazoniumdiolate bei entsprechender Lagerung stabil, weshalb sie auch als "solid

NO“ bezeichnet werden. Gelöst in wässrigen Medien setzen Diazoniumdiolate sofort, direkt und spontan nach den oben genannten Gesetzmäßigkeiten NO frei. Diese Instabilität in Lösung schränkt die Verarbeitung der Diazoniumdiolate zu potentiellen Arzneiformen ein.

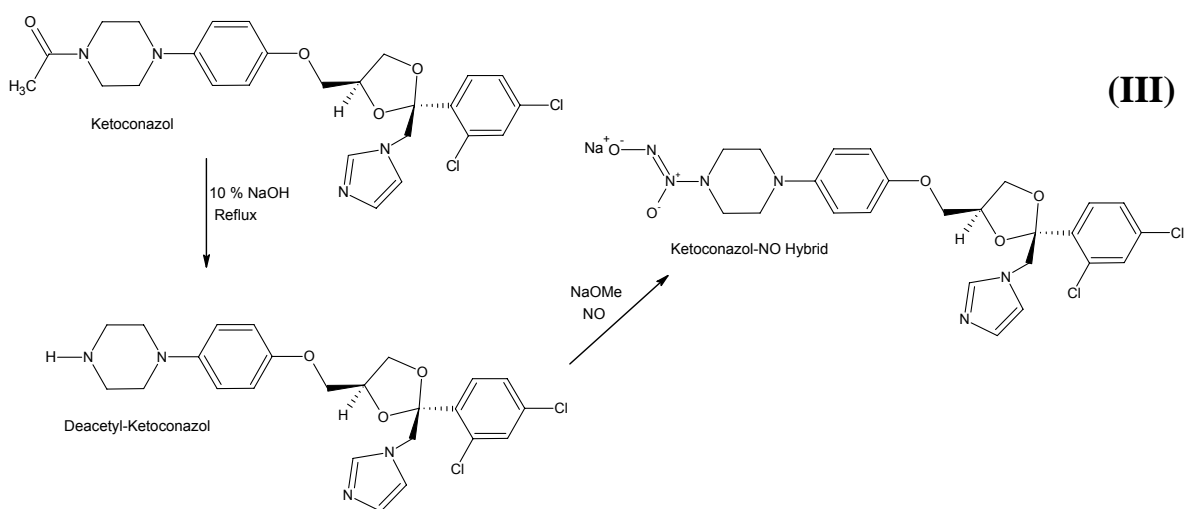
Über diese besagten Grenzen hinaus, welche in der Regel und gerade für medizinische Anwendungen durch anwendungsspezifische Bedingungen vorgegeben und damit festgelegt sind, ist die Freisetzungskinetik für die bisher bekannten Ketoconazol-Derivate nicht beeinflussbar.

Darüber hinaus sind Diazoniumdiolate an sich (in Konzentrationen, die *in vivo* erreichbar sind) ohne mikrobielle und antiinflammatorische Wirkung und können demzufolge nicht als diesbezügliche Wirkstoffe verwendet werden.

**[0011]** Diazoniumdiolate, die zusätzlich am O<sup>2</sup>-Atom kovalent an einen Rest (z. B. Alkyl) gebunden sind, bedürfen einer vorangehenden chemischen und/oder enzymatischen Metabolisierung um dann, nach den gleichen Gesetzmäßigkeiten, wie unter **[0010]** beschrieben, NO freizusetzen:



**[0012]** Ein modifiziertes Ketoconazol, das durch Deacetylierung des Phenylpiperazin-Gerüsts und anschließender Begasung mit NO und Natrium-methanolat als Basenzusatz zum Diazoniumdiolat umgesetzt wurde (siehe Formel III), ist bereits von Bonifant *et al.* (WO 2001092215) beschrieben worden.



Diese Ketoconazol-NO-Verbindung, wie auch Analoga die im molekularen Gerüst des Ketoconazol-Teils strukturell variierbar sind, haben alle eine identische NO-Freisetzungskinetik und

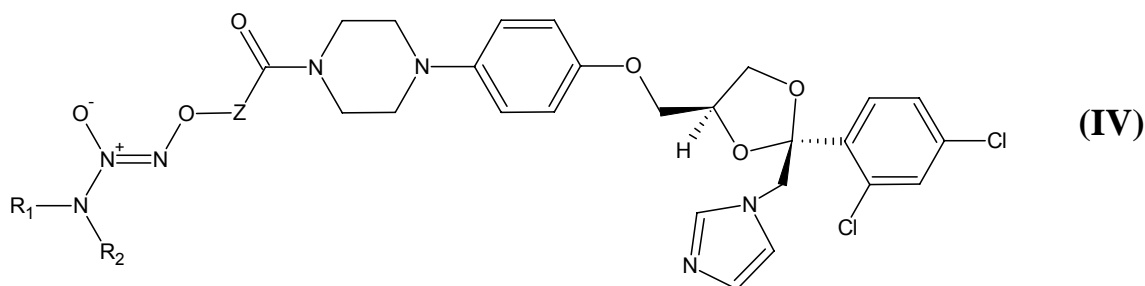
Halbwertszeit. Bei allen Analoga ist die [N(O)NO]-Gruppe an den Phenylpiperazin-Rest gebunden, welcher bei 37 °C und pH 7,4 die Kinetik und Geschwindigkeit der NO-Freisetzung bestimmt. Die gemessene Halbwertszeit dieser Verbindungen beträgt  $t_{1/2} = 4.5$  Minuten (bei 37 °C, pH 7,4). Es gelten die gleichen, bereits unter **[0010]** beschriebenen Nachteile für die NO-Freisetzungskinetik und die Verwendbarkeit.

Wünschenswert wäre es, diese NO-Freisetzungskinetik je nach bestimmungsgemäßem Verwendungszweck variieren zu können. Ferner wäre es wünschenswert, einen auch in wässrigen Medien stabilen Wirkstoff zu erhalten, der einer Weiterverarbeitung zur Arzneiform standhält und eine ausreichende Haltbarkeit aufweist.

**[0013]** Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, neue, beständige und als antimikrobielle sowie antiinflammatorische Wirkstoffe einsetzbare Verbindungen bereitzustellen, bei denen die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und anderen reaktiven Stickstoffspezies in weiten Grenzen verändert werden kann.

Insbesondere soll die Freisetzung von Stickstoffmonoxid für medizinische Anwendungen je nach deren Erfordernissen verlängert oder verkürzt werden können.

**[0014]** Zur Lösung der Aufgabe werden neue Ketoconazol-Derivate mit Diazen-1-ium-1,2-diolat gemäß der allgemeinen Formel IV



vorgeschlagen,

wobei:

- $R_1, R_2$ : unabhängig voneinander geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Arylalkyl, Aminoalkyl, Alkylaminoalkyl sein kann,
- $R_1$  und  $R_2$ : miteinander Kohlenwasserstoff Zyklen mit einer Ringgröße von 3-10 Atomen bilden können. Diese Zyklen können ein oder mehrere Heteroatome wie z. B. O-, S- oder N-Atome enthalten,
- $R_1, R_2$ : unabhängig voneinander Teil eines Polymeren darstellen und
- Z: Methylen, geradkettiges oder verzweigtes Alkylen darstellt.

**[0015]** Eine Verbindung nach dieser allgemeinen Formel IV verknüpft mit einer speziellen Bindung das an sich bekannte Ketoconazol mit einem strukturell variierbaren Diazen-1-ium-1,2-diolat-



Grundgerüst und soll als Ketoconazol-NO-Hybrid mit zwei Funktionszentren bezeichnet werden. Zum einen ist die an sich bekannte Wirkung des Ketoconazol mit seiner bekannten mikrobiellen und antiinflammatorischen Wirkung gegeben, zum anderen enthält das neue Ketoconazol-Derivat das speziell gebundene Diazen-1-ium-1,2-diolat-Grundgerüst mit der vorgenannten Variierbarkeit.

5

**[0016]** Überraschend hat sich gezeigt, dass sich durch die besagte spezielle Anbindung des Diazen-1-ium-1,2-diolat-Grundgerüsts an das Ketoconazol für die erfindungsgemäßen Derivate mit geeigneter Wahl der Substituenten des Diazen-1-ium-1,2-diolat-Grundgerüsts die Freisetzungskinetik für Stickstoffmonoxid und andere reaktive Stickstoffspezies in weiten Grenzen beeinflussen lässt, so dass die Freisetzung von NO und anderer RNS je nach bestimmungsgemäßem Einsatz des jeweils als Wirkstoff vorgesehenen Ketoconazol-NO-Hybrids verlängert oder verkürzt werden kann. Auf diese Weise kommen die bei Diazeniumdiolaten an sich bekannten Möglichkeiten der Beeinflussung der Freisetzungsmöglichkeiten für NO und andere RNS nunmehr auch für die neu gefundenen Ketoconazol-Derivate zum Tragen, wodurch erstmals Ketoconazol-haltige Wirkstoffe (mit antimikrobiellen und antiinflammatorischen Eigenschaften) hergestellt werden können, welche eine steuerbare Freisetzungskinetik von NO und anderen RNS in weiten Grenzen gestatten.

10

15

In der Tabelle unter **[0030]** sind Beispiele für unterschiedliche Substituenten des Diazen-1-ium-1,2-diolat-Grundgerüsts mit jeweils ermittelten Freisetzungzeiten angegeben.

20

**[0017]** Eine Verbindung der allgemeinen Verbindung IV kann somit nach chemischer und/oder enzymatischer Metabolisierung über ein intermediäres freies Ketoconazol-Diazeniumdiolat-Hybrid in das N-Hydroxyacetylderivat des Ketoconazols und NO gespalten werden.

25

**[0018]** Die Struktur von  $R_1$  und  $R_2$  des freien Diazeniumdiolat bestimmen und variieren das NO-Freisetzungsprofil in Bezug auf die Kinetik und Halbwertszeit der NO-Freisetzung aus dem Ketoconazol-NO-Hybrid.

30

**[0019]** Die Erfindung soll nachstehend anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

35

**[0020]** Die Synthese der Diazeniumdiolate, die für die Umsetzung zum Ketoconazol-NO-Hybrid verwendet werden, erfolgt durch Begasung der Amine mit 4-5 bar NO-Gas in sauerstofffreier Atmosphäre in einer dafür geeigneten Apparatur mit dem Namen NOTizer<sup>®</sup>. Die Amine werden in trockenem Methanol oder Acetonitril gelöst. Für Diazeniumdiolate, die als Natrium-Salze hergestellt werden, wird in dem Lösungsmittel Methanol zusätzlich eine äquimolare Menge elementaren Natriums gelöst. Nach Abklingen der Reaktion fällt das Diazeniumdiolat aus oder wird ausgefällt, indem das Lösungsmittel aufkonzentriert und gegebenenfalls mit Diethylether versetzt wird.

Ausführungsbeispiel 1a beschreibt die Synthesevorschrift am repräsentativen Beispiel von Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat.

5 **[0021]** Die Synthese der Ketoconazol-NO Hybride erfolgt durch Deacetylierung des Phenylpiperazin-Restes von Ketoconazol mit NaOH, anschließender Haloacetylierung des Phenylpiperazin-Rest und darauffolgender Umsetzung mit dem entsprechenden Diazeniumdiolat. Die detaillierte Arbeitsvorschrift anhand der beispielhaften Synthese des  $O^2$ -(1-(4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phe-nyl)piperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat ist in Ausführungsbeispiel 1b aufgeführt.

10

**[0022]** Die Freisetzung aus den Diazeniumdiolaten, die für die Umsetzung zum Ketoconazol-Hybrid verwendet werden, erfolgt mittels amperometrischer NO-Detektion und UV-Spektroskopie.

**[0023]** Amperometrische NO-Detektion:

15 Die Kinetik der NO-Freisetzung wird mit einer Stickstoffmonoxid selektiven ISO-NOP Elektrode eingebaut in eine temperierbare, abgeschlossene Messkammer und angeschlossen an das Apollo 4000 free radical analyzer system der Firma WPI Inc., USA, gemessen. Die Messkammer wird bei 37 °C temperiert.

20 Es werden 20 µl einer 50 µM Diazeniumdiolat / 0.01 M NaOH Lösung in 2.0 ml Phosphatpuffer 6.4 injiziert und der entstehende Redoxstrom gemessen.

**[0024]** UV-Spektroskopische Diazeniumdiolat-Zerfallsmessung:

25 Der Zerfall der [N(O)NO] - Gruppe wird bei 251 nm über einen Zeitraum von 30 min mit einem temperierbaren Jasco V-570 Spektrometer aufgezeichnet. Bei 37 °C werden 4 µl einer 50 mM Diazeniumdiolat / 0.01 M NaOH Lösung in 2.0 ml Phosphatpuffer 7.4 injiziert und die Lichtabsorption gemessen. Die Datenwerte werden logarithmisch geplottet und eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Steigung ergibt die Zerfallskonstante  $k$ , aus der nach der Formel  $t_{1/2} = \ln 2 / k$  die Zerfallshalbwertszeit des Diazeniumdiolates bestimmt wird.

30 Beispielhaft sind die amperometrisch und UV-Spektroskopisch gemessenen NO-Freisetzungskinetiken aus Diazeniumdiolaten, die für die Umsetzung zum Ketoconazol-NO-Hybrid verwendet werden, in Ausführungsbeispiel 2 dargestellt.

**[0025]** Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften:

35 Es wurden Stämme von *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* SG 511, *S. aureus* SG 134/94 (MRSA), *Escherichia coli* SG 458, *Pseudomonas aeruginosa* SG 137, *Enterococcus faecalis* 1528 (VRE) und *Mycobacterium vaccae* IMET 1528 als Testorganismen verwendet. Für den Agardiffusionstest wurden 100 µl des jeweiligen Testorganismus mit einer Konzentration von 0.5 McFarland Standard zu einer sterilen, geschmolzenen 1 % Trypticase Soja Bouillon Agarose (32 ml) beimpft, auf 50 °C abgekühlt und in Petri-Schalen gegossen. Löcher von 9 mm

Durchmesser wurden in die Agarose-Schicht geschnitten und mit 50 µL einer 200 µM Ketoconazol-NO Hybrid Lösung befüllt. Die Inhibitionszonen für das Keimwachstum wurden nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C gemessen.

5 **[0026]** Untersuchungen der antimykotischen Eigenschaften:

Es wurden Stämme von *Aspergillus fumigatus* ATCC46646, *Aspergillus terreus* DSM 826, *Aspergillus niger* DSM 737, *Fusarium oxysporum* i1205, *Candida albicans* BMSY 212, *C. glabrata* DSM 6525, *Sporobolomyces salmonicolor* SG 549 und *Penicillium notatum* JP 36 als Testorganismen verwendet. Nach der Methode unter **[0025]** beschrieben wurden zusätzlich die  
10 Minimale Inhibitorische Konzentration (MIC) der Ketoconazol-NO Hybride bestimmt. Hierzu wurden in die einzelnen Löcher 50 µL einer Ketoconazol-NO Hybrid Verdünnung befüllt und die Inhibitionszonen für das Pilzwachstum wurden nach 24 Stunden Bebrütung bei 37 °C gemessen. Die niedrigste Ketoconazol-NO-Hybrid-Verdünnung die ein Pilzwachstum inhibierte, wurde als MIC-Wert bestimmt.

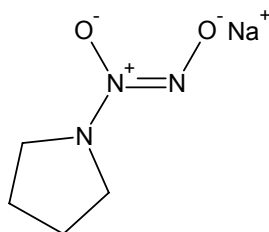
15

**[0027]** Untersuchungen der antiinflammatorischen Eigenschaften:

Es wurde die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induzierte Oxidation von Luminol per Chemilumineszenz gemessen. Die "oxidativen bursts" (ROS Produktion und Freisetzung) aus polymorphen, mononuklearen Leukozyten (PMNL vom Schwein) wurden in einer Konzentration  
20 von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml Suspension bei 37 °C gemessen. Die antiinflammatorischen Effekte sind ausgedrückt in Prozent-Inhibition der Luminol Oxidation gegenüber der Positiv-Kontrolle ausgelöst durch Liponsäure und 4-Aminobenzoessäurehydrazid.

Ausführungsbeispiel 1a:

25 **[0028]** Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat



In 100 ml trockenem Methanol werden 0.05 mol (1.15 g) elementares Natrium gelöst und zu 0.05 mol Pyrrolidin filtriert. Die Mischung wird in das druckbeständige Reaktionsgefäß des  
30 NOtizers<sup>®</sup> gegossen und dicht verschlossen. Anschließend evakuiert man das Gefäß, begast bis 3 bar mit Stickstoff, evakuiert erneut und wiederholt den Vorgang noch zweimal. Das evakuierte Gefäß wird mit 4.5 bar Stickstoffmonoxid begast und 48 Stunden gerührt. Schließlich wird nochmals mit Stickstoff gespült, das Reaktionsgemisch entnommen und bei 60 °C unter

vermindertem Druck aufkonzentriert. Der gebildete weiße Niederschlag wird abfiltriert, mit Diethylether gewaschen und getrocknet.

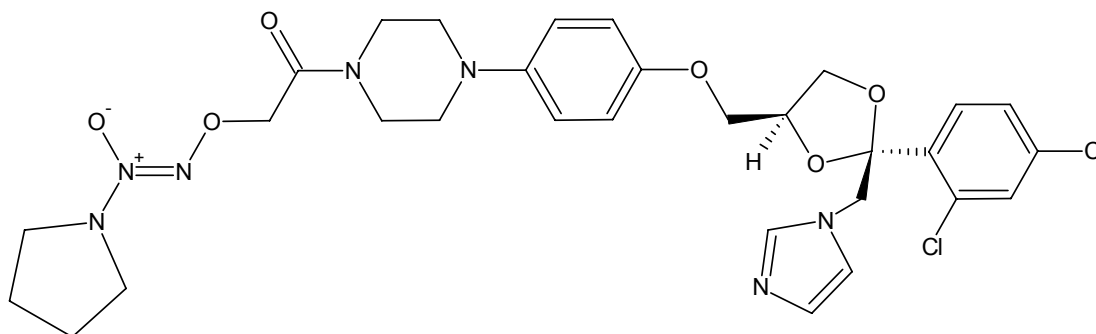
$^1\text{H-NMR}$  250 MHz (NaOD):  $\delta$  1.63 (t, 4H,  $J$  = 6.5 Hz), 2.95 (t, 4H,  $J$  = 6.7 Hz)

Elementaranalyse:

- 5 berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_3\text{NaO}_2$ : C= 31.38, H= 5.27, N= 27.44  
gefunden: C= 31.36, H= 5.47, N= 27.40  
NO-Freisetzungsprofil:  $t_{1/2}$  = 3.6 s; Maximum =  $29.3 \pm 1.5$  s

#### Ausführungsbeispiel 1b:

- 10 **[0029]**  $\text{O}^2$ -(1-(4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy]phenyl)piperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat



- 15 Ketoconazol (8 g, 15 mmol) wird in 175 ml Methanol gelöst und unter Rückfluss erhitzt. Langsam werden 40 ml einer 20 %ig wässrigen NaOH Lösung zugetropft und weiterhin erhitzt bis die Reaktion vollständig abgeklungen ist (DC kontrolliert). Dem Reaktionsgemisch wird zerhacktes Eis zugesetzt und das weiße Präzipitat abfiltriert und getrocknet. Erhalten wurde das deacetylierte Ketoconazol in fast quantitativer Ausbeute.
- 20 Das trockene deacetylierte Ketoconazol (1 g, 2 mmol) löst man in 40 ml Dichlormethan und tropft es langsam zu einer Mischung aus wasserfreiem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und Chloracetylchlorid (0.34 g, 3 mmol) in 20 ml Dichlormethan bei 4 °C und rührt 2 Stunden. Das Gemisch wird filtriert und das Filtrat mit gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  Lösung (3 x 50 ml) gewaschen.
- Im Anschluss wird die organische Phase einer frisch hergestellten Suspension aus  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und
- 25 Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat in 50 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid bei Raumtemperatur *in situ* zugetropft. Durch das Reaktionsgemisch wird trockenes Stickstoffgas durchgeleitet, bis das Dichlormethan verflüchtigt ist; anschließend wird 72 Stunden gerührt. Die Suspension wird filtriert, mit 60 ml gesättigter  $\text{NaHCO}_3$  Lösung versehen, mit Ethylacetat (2 x 50 ml) extrahiert und die organische Phase mit Wasser gewaschen (5 x 75 ml). Nach
- 30 Entfernen des Lösungsmittels wird der Rückstand durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit

Ethylacetat:Acetonitril (1:1) und anschließender methanolischer Auswaschung gereinigt zu einem orangefarbenen Pulver.

Ausbeute: 38 %

Schmelzpunkt: 237 °C

5 <sup>1</sup>H-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.93 (m, 4H), 3.02-3.13 (m, 8H), 3.32-3.36 (m, 1H), 3.55 (mc, 4H), 3.72-3.77 (m, 2H), 3.86-3.90 (dd, *J* = 6.7, 6.6 Hz, 1H), 4.31-4.37 (quin, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.39-4.53 (dd, *J* = 40.7, 14.8 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H), 6.90 (m, 2H), 6.97 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.49 (d, *J* = 14.7 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H)

10 <sup>13</sup>C-NMR: 400 MHz (CDCl<sub>3</sub>): δ 22.9, 36.8, 51.3, 51.7, 53.5, 67.6, 67.7, 71.4, 74.8, 108.0, 115.3, 118.8, 121.2, 127.2, 128.4, 129.5, 131.3, 133.0, 134.6, 135.9, 138.8, 145.6, 152.9, 166.7

FAB-MS *m/z* (%): 202 (48), 217 (55), 235 (50), 255 (100), 432 (38), 446 (51), 459 (70), 471 (63), 489 (64), 517 (39), 547 (82), 600 (69), 660 (42, M<sup>+</sup>+H), 682 (19, [M+Na]<sup>+</sup>), 698 (17, M<sup>+</sup>+K)

Elementaranalyse:

berechnet für C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>: C= 54.55, H= 5.34, N= 14.84

15 gefunden: C= 54.17, H= 5.43, N= 14.78

Antibakterielle Eigenschaften von Ausführungsbeispiel 1b gemäß [0025]:

Hemmhofdurchmesser (Inhibitionszonen für Keimwachstum) nach 24 h.

	<b>Bacillus subtilis</b>	<b>Staph. aureus</b>	<b>Staph. aureus (MRSA)</b>	<b>E. coli</b>	<b>Pseud. aeruginosa</b>	<b>Enterococcus faecalis</b>	<b>Mycobact. vaccae</b>
<b>Hemmhof-durchmesser [mm]</b>	15	15	0	0	0	0	19

20

Antimykotische Eigenschaften von Ausführungsbeispiel 1b gemäß [0026]:

MIC-Werte [μM] des O<sup>2</sup>-(1-(4-([2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat an

25 Pilzstämmen.

	<b>Asp. fumigatus</b>	<b>Asp. terreus</b>	<b>Asp. niger</b>	<b>Fusarium oxysp.</b>	<b>Candida albicans</b>	<b>Candida glabrata</b>	<b>Sporobolom. salmonicolor</b>	<b>Penicillium notatum</b>
<b>MIC [μM]</b>	125	62.5	62.5	1000	25	12.5	1.56	8

Antiinflammatorische Eigenschaften von Ausführungsbeispiel 1b gemäß **[0027]**:

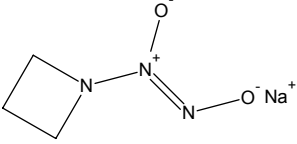
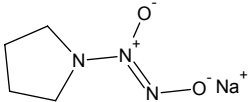
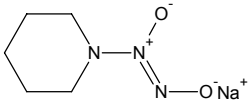
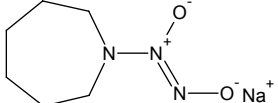
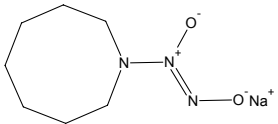
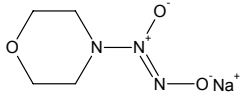
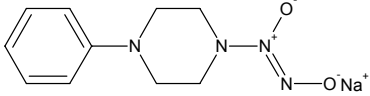
Hemmung ausgedrückt durch Verringerung der AUC (area under the curve) im Vergleich zur Positiv-Kontrolle (100 %). Eine 80 µM Lösung von  $O^2$ -(1-(4-[[2-(2,4-dichlorophenyl)-2-(1*H*-imidazol-1-ylmethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methoxy}phenyl)piperazine-4-carboxymethyl)-1-(pyrrolidin-1-

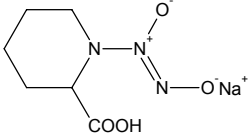
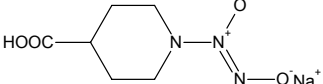
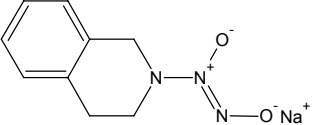
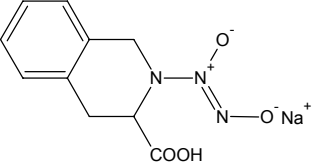
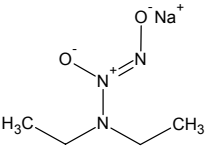
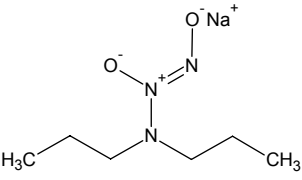
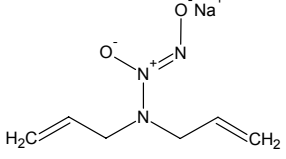
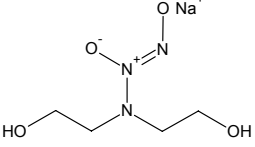
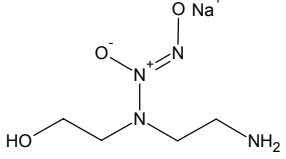
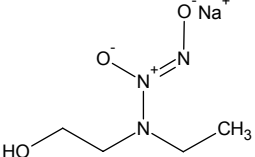
5 yl)diazen-1-ium-1,2-diolat verringert die Fläche auf 4 %, eine 8 µM Lösung auf 13 % und eine 0.8 µM Lösung auf 36 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle (100 %).

Ausführungsbeispiel 2:

**[0030]** Tabellarische Aufstellung ausgewählter Diazeniumdiolate, die für die Umsetzung zum

10 Ketoconazol-Hybrid verwendet werden, mit dazugehörigem NO-Freisetzungsprofil:

Diazeniumdiolat	NO-Freisetzungsprofil	
	Maximum [s] (amperometrisch)	Halbwertszeit [s] (UV-spektroskopisch)
	75.3 ± 2.8	85.2
	29.3 ± 1.5	3.6
	36.3 ± 3.2	18.9
	29.3 ± 2.3	3.6
	29.0 ± 2.6	4.7
	100.0 ± 11.9	152.3
	82.0 ± 3.4	263.5

	$32.0 \pm 1.0$	6.1
	$39.6 \pm 3.0$	22.6
	$38.3 \pm 2.8$	29.3
	$27.3 \pm 3.2$	6.8
	$85.5 \pm 4.4$	112.3
	$70.2 \pm 9.8$	93.2
	$131.2 \pm 14.9$	246.6
	$266.0 \pm 2.0$	456.0
	$1765.0 \pm 209.0$	7498.9
	$116.4 \pm 18.7$	206.9

	$50.6 \pm 0.5$	$56.7$
	$146.6 \pm 16.6$	$302.0$
	$911.0 \pm 147.2$	$7036.1$
	$233.0 \pm 11.0$	$537.3$
	$260.3 \pm 5.0$	$679.5$

Es hat sich gezeigt, dass die tabellarisch aufgeführten Diazeniumdiolate für die erfindungsgemäße Herstellung neuer Ketoconazol-Derivate geeignet sind. Dabei zeigten die Ketoconazol-Derivate das von der Struktur des jeweiligen Diazeniumdiolates abhängige, charakteristische NO-

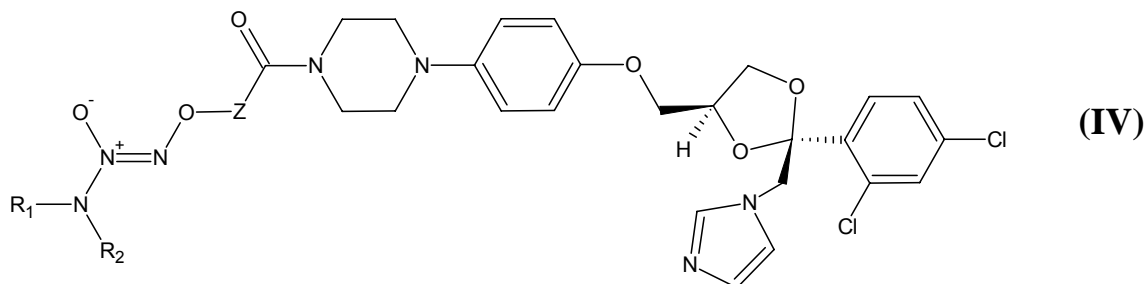
5 Freisetzungsprofil.



### Patentansprüche

1. Neue Ketoconazol-Derivate mit Diazen-1-ium-1,2-diolat, gekennzeichnet durch eine Verbindung der allgemeinen Formel IV:

5



wobei:

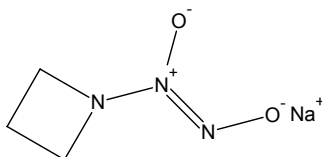
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: unabhängig voneinander geradkettiges oder verzweigtes Alkyl, Arylalkyl, Aminoalkyl, Alkylaminoalkyl sein kann,
- R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub>: miteinander Kohlenwasserstoff Zyklen mit einer Ringgröße von 3-10 Atomen bilden können. Diese Zyklen können ein oder mehrere Heteroatome wie z. B. O-, S- oder N-Atome enthalten,
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>: unabhängig voneinander Teil eines Polymeren darstellen und
- Z: Methylen, geradkettiges oder verzweigtes Alkylen darstellt.

20

2. Verfahren zur Herstellung der neuen Ketoconazol-Derivate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Diazen-1-ium-1,2-diolat mit N-Haloacyl-Ketoconazol-Derivat durch nukleophile Substitution umgesetzt wird.

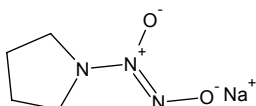
25

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

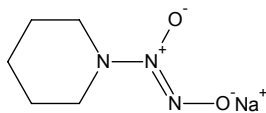
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

5

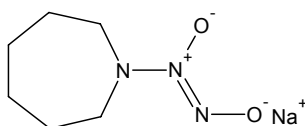


(VII)

eingesetzt wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

10

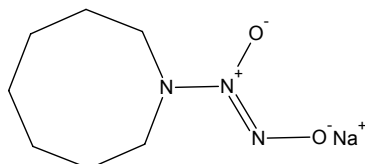


(VIII)

eingesetzt wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

15

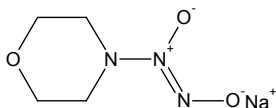


(IX)

eingesetzt wird.

8. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

20

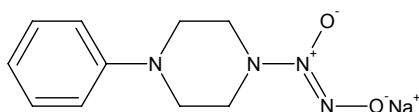


(X)

eingesetzt wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

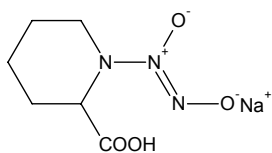
25



(XI)

eingesetzt wird.

10. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

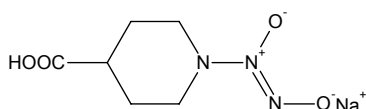


(XII)

eingesetzt wird.

5

11. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

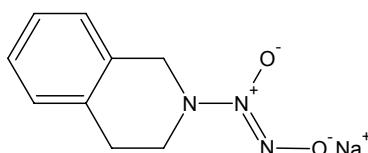


(XIII)

eingesetzt wird.

10

12. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

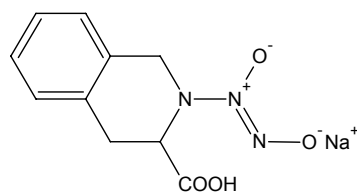


(XIV)

eingesetzt wird.

15

13. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

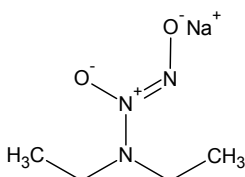


(XV)

eingesetzt wird.

20

14. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

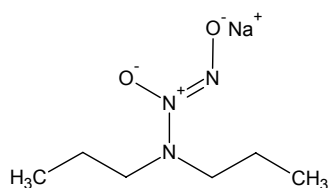


(XVI)

eingesetzt wird.

25

15. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

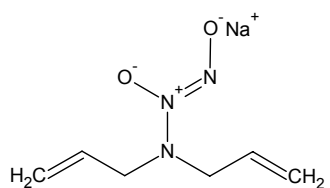


**(XVII)**

eingesetzt wird.

5

16. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

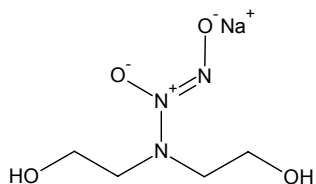


**(XVIII)**

eingesetzt wird.

10

17. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

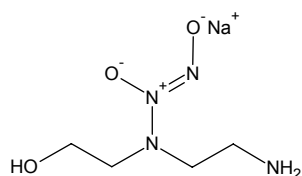


**(XIX)**

eingesetzt wird.

15

18. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



**(XX)**

eingesetzt wird.

20

25

19. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

5

20. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

10

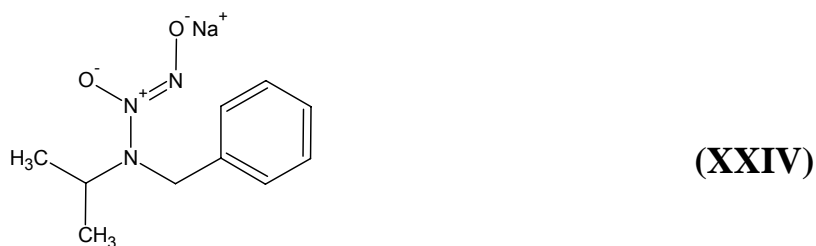
21. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

15

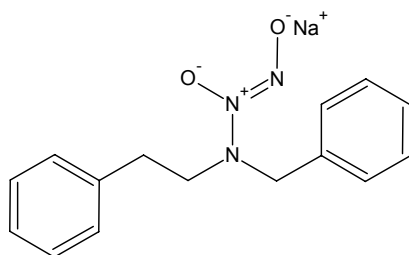
22. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



eingesetzt wird.

20

23. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung

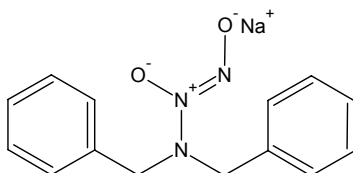


**(XXV)**

eingesetzt wird.

5

24. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Diazen-1-ium-1,2-diolat die Verbindung



**(XXVI)**

eingesetzt wird.

10

25. Verwendung der neuen Ketoconazol-Derivate gemäß Anspruch 1 als Wirkstoff gegen mikrobielle Krankheitserreger, wie z. B. Pilze, Bakterien und Parasiten.

26. Verwendung der neuen Ketoconazol-Derivate gemäß Anspruch 1 als antiinflammatorische Wirkstoffe.

15

27. Verwendung gemäß Anspruch 25 und/oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Ketoconazol-Derivat in einer pharmazeutischen Formulierung als lokal, oral, rectal, transdermal, parenteral oder intraperitoneal zu verabreichender Wirkstoff, beispielsweise in Form von Shampoo, halbfesten oder flüssigen Emulsionen oder Suspensionen, Tabletten, Dragees, Kapseln, Zäpfchen, transdermalen Plasten, Injektionen oder Infusionen vorliegt.

20

## Zusammenfassung

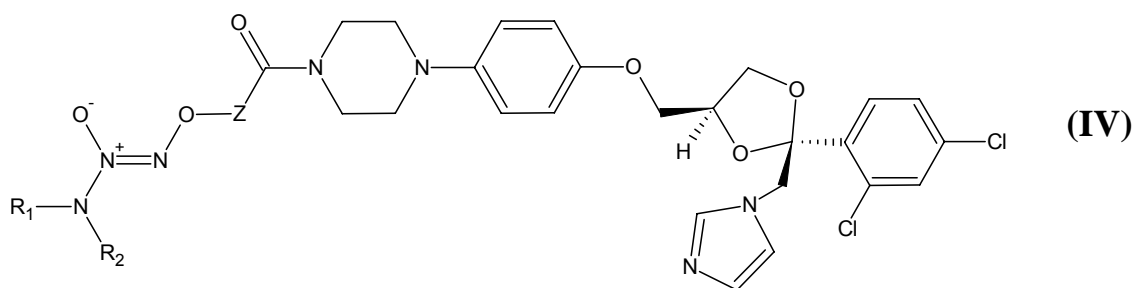
1. Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkstoffe

5

2.1. Aufgabe war es, beständige und als antimikrobielle sowie antiinflammatorische Wirkstoffe einsetzbare Verbindungen bereitzustellen, bei denen die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und anderen reaktiven Stickstoffspezies in weiten Grenzen verändert werden kann.

10

2.2. Es wurden neue Ketoconazol-Derivate mit Diazen-1-ium-1,2-diolat gefunden, gekennzeichnet durch eine Verbindung der allgemeinen Formel IV:



2.3. Die neuen Derivate finden beispielsweise in der Medizin Einsatz bei der antiinfektiven Therapie.

15





## 4 Bisher unveröffentlichte Ergebnisse

In diesem Kapitel werden Ergebnisse präsentiert, die bisher nicht veröffentlicht wurden. Gemäß der Gliederung der Zielstellungen dieser Arbeit wird zunächst auf chemische Aspekte, dann auf biologische Aktivitäten der neu synthetisierten Derivate eingegangen. Die Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden sind, wenn unverändert, den einzelnen Veröffentlichungen zu entnehmen und werden an entsprechender Stelle zitiert. Auf Abweichungen zu den zitierten Protokollen wird explizit hingewiesen.

### 4.1 Chemische Aspekte

#### 4.1.1 Beobachtung der NONOat-Synthese mit dem NOTizer

##### *Reaktionsenthalpie*

Wie in Veröffentlichung 1 schon erwähnt, verfügt der NOTizer über einen Druck- und einen Temperatursensor, deren Messsignal durch einen Computer online aufgezeichnet werden kann. In der Literatur wird lediglich über einen leichten Temperaturanstieg während der NONOat-Synthese berichtet, wobei es sich aber bei dem apparativen Aufbau um ein offenes System mit ständiger  $\text{NO}^-$ -Begasung handelt. Um das Ausmaß dieser Exothermie besser einschätzen zu können, wurde eine relativ große Menge (0.25 mol) des schnell reagierenden Pyrrolidin mit einer äquimolaren Menge Natrium in 300 ml Methanol gelöst und einem 4.5 bar hohen Druck an  $\text{NO}^-$ -Gas ausgesetzt. Wie in Abbildung 14 (A) zu erkennen ist, wurde, um die Reaktion zu unterhalten, bei einem Druckabfall unter 2 bar erneut  $\text{NO}^-$  eingeleitet und der Temperaturverlauf aufgezeichnet. Um sicherzustellen, dass der Temperaturanstieg ausschließlich aus der Reaktion des  $\text{NO}^-$  mit dem Amin resultiert, wurde eine Vergleichsmessung ohne Pyrrolidin unter denselben Bedingungen durchgeführt (siehe Abb. 14 (B)).

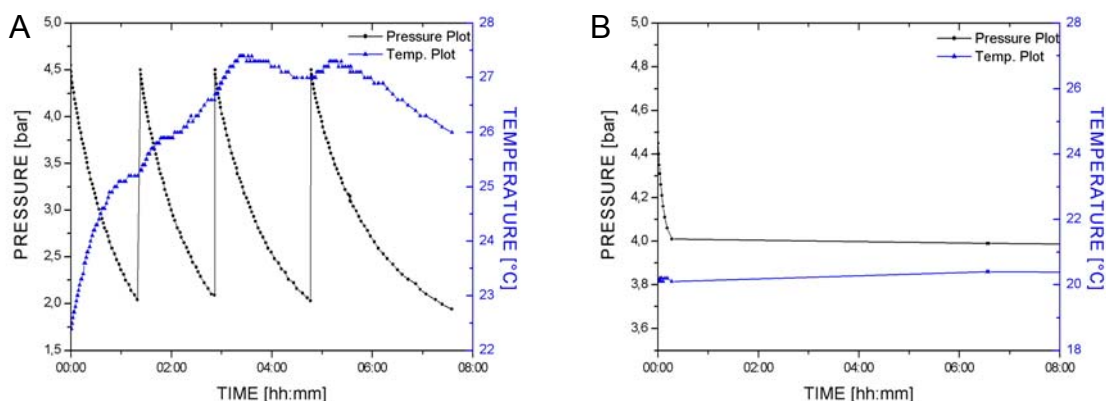


Abb. 14 (A) Druck- und Temperaturverlauf bei der Reaktion von Pyrrolidin mit  $\text{NO}^-$ -Gas

(B) Druck- und Temperaturverlauf bei der Reaktion von Natrium-methanolat mit  $\text{NO}^-$ -Gas

Der deutliche Temperaturanstieg bei der NONOat-Bildung von über 5 °C ist angesichts des großen Lösungsmittelvolumens erstaunlich hoch. Abbildung 14 (B) verdeutlicht, dass keine Temperaturänderung ohne Pyrrolidin als Reaktionspartner auftritt. Der Druckabfall von 0.5 bar (entspricht 13 mmol NO<sup>•</sup>) innerhalb der ersten 20 Minuten ist bedingt durch die Löslichkeit des NO<sup>•</sup> unter Druck in den 300 ml Methanol. Dieses Experiment zeigt zum einen, dass die Bildungsenthalpie exotherm ist ( $\Delta H_f < 0$ ) und zum anderen, dass unter den Standardreaktionsbedingungen (100 ml Methanol; 0.05 mol Amin) für die reaktionskinetischen Vergleiche (Veröffentlichung 2) keine falschen Druckverläufe durch temperaturbedingte Gasexpansion aufgezeichnet werden.

#### Temperatureinfluss auf die NONOatbildung

Als Modellamin wurde für diese Experimente ebenfalls Pyrrolidin verwendet. Die Durchführung entspricht der *General Procedure* aus Veröffentlichung 1 und 2 mit jeweils 0.05 mol Amin und Natrium, gelöst in trockenem Methanol und 4 bar Stickstoffmonoxid. Vor der NO<sup>•</sup>-Begasung wurde die Temperatur mit einem Kryostat oder einer Heizplatte eingestellt. Abbildung 15 stellt die aufgezeichneten Druckverläufe und Tabelle 3 die Werte der definierten Reaktionsparameter dar.

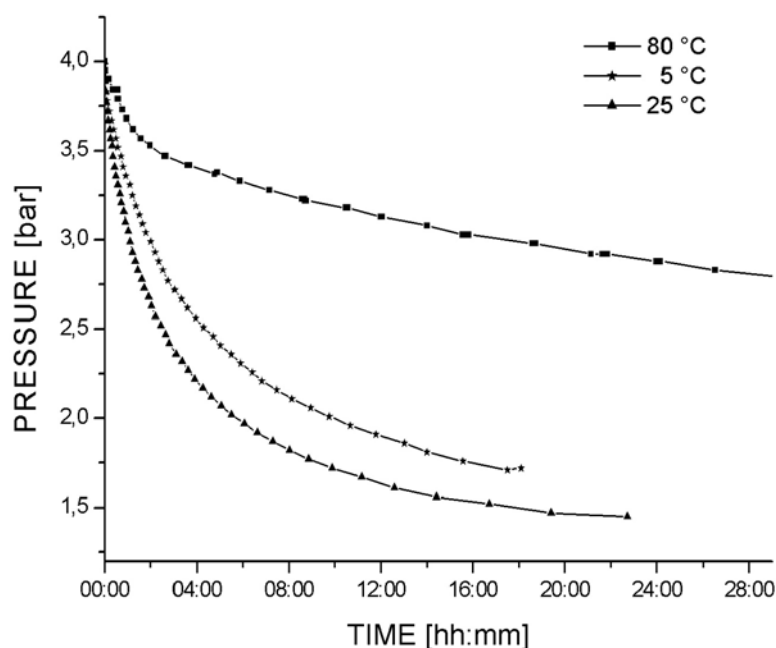


Abb. 15 Druckverlauf während der Reaktion von Pyrrolidin mit NO<sup>•</sup>-Gas in Abhängigkeit von der Temperatur

Durch Kühlen wird die Reaktionsgeschwindigkeit verlangsamt und die isolierbare Ausbeute ist etwas geringer als bei der Synthese mit Raumtemperatur. Die gemessene Druckabnahme bei 80 °C entspricht nicht dem tatsächlichen NO<sup>•</sup>-Verbrauch, da das Reaktionsgemisch unter diesen Bedingungen siedet und somit schon allein für einen erhöhten Druck verantwortlich ist. Trotzdem ist zu erkennen, dass die Umsetzung von Amin und NO<sup>•</sup> langsamer verläuft, wenn nicht sogar ganz

verhindert wird und ein anderes Produkt entsteht. Die Aufarbeitung nach Abklingen der Reaktion ergab kein isolierbares einheitliches Produkt, sondern ein Gemisch aus 1-Nitrosopyrrolidin (GC/MS  $m/z = 100$   $[M+H]^+$ ), Pyrrolidin und Natriummethanolat. Tiefe Temperaturen scheinen also die Bildung reiner Diazoniumdiolate zu begünstigen, während bei höheren Temperaturen das korrespondierende Nitrosamin als Nebenprodukt entsteht.

Tab. 3 Charakteristische Reaktionsparameter bei der Reaktion von Pyrrolidin und NO-Gas bei unterschiedlichen Temperaturen

	Temperatur		
	80 °C	5 °C	25 °C
Druckverlust nach 7 h [Bar]	0.72	1.8	2.11
Dauer der Reaktion [hh:mm]	--	17:30	19:24
Restdruck [Bar]	2.73	1.71	1.45
Molverhältnis NO/Amin	--	1.42	1.61

In Bezug auf die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Temperatur bildet Piperazin als Amin eine Ausnahme. Eine Besonderheit bei der Umsetzung von Piperazin mit NO<sup>•</sup> ist, wie in der Literatur beschrieben, dass sich unterschiedliche Piperazin-NONOate bilden, je nachdem welches Lösungsmittel, welche Temperatur und welcher Basenzusatz verwendet wird.<sup>[95,96]</sup> Abbildung 16 fasst die Strukturformeln der möglichen Piperazin-NONOate zusammen.

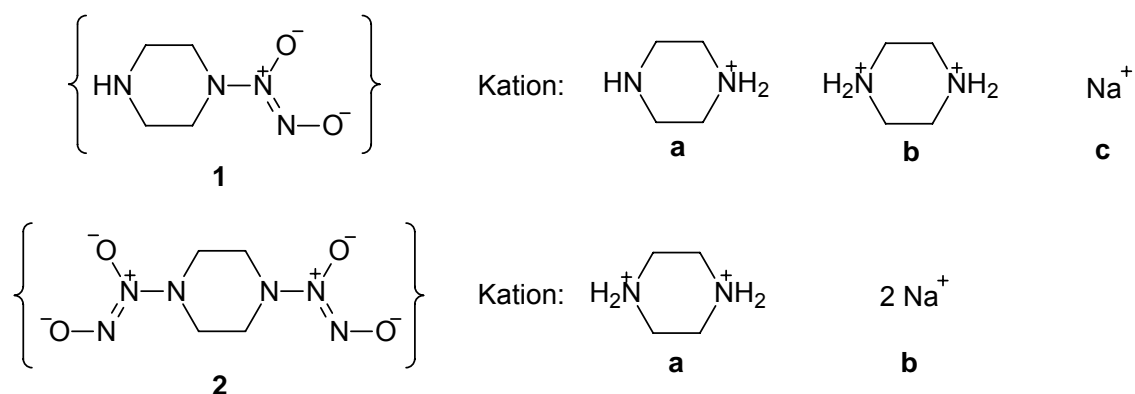


Abb. 16 Piperazin-NONOat Salze

Beschrieben ist, dass sich in heißem Methanol überwiegend die Verbindung **1a** bildet, **1b** in Acetonitril und **2a** in kaltem Methanol entsteht. Die entsprechenden Natriumsalze **1c** und **2b** werden durch Ionenaustausch mit Natriummethanolat hergestellt. Die Druckabnahmekurven aus den Reaktionen von 0.05 mol Piperazin mit NO<sup>•</sup> in 100 ml Methanol bei unterschiedlichen Temperaturen sind in Abbildung 17 dargestellt.

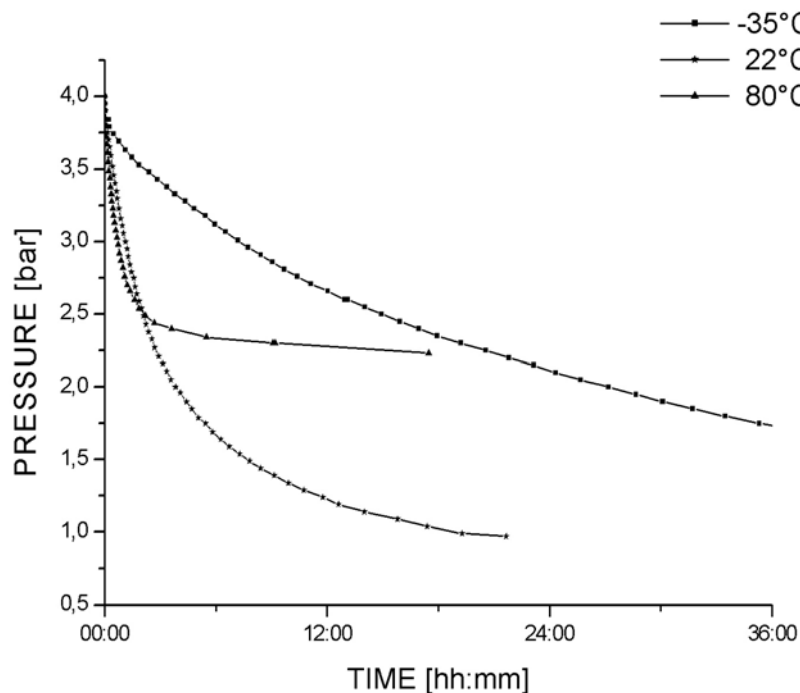


Abb. 17 Stickoxidverbrauch während der Reaktion mit Piperazin in Abhängigkeit von der Temperatur

Wie schon bei der Reaktion des Pyrrolidins mit  $\text{NO}$  zu beobachten war, wird die Reaktionsgeschwindigkeit durch Kälte verlangsamt. Anders ist jedoch, dass bei der Reaktion von Piperazin in heißem Methanol eine leichte Beschleunigung der  $\text{NO}$  Druckabnahme gegenüber der Reaktion bei Raumtemperatur zu beobachten ist. Das scheinbar frühe Abklingen der Reaktion hängt zum einen mit der oben diskutierten temperaturbedingten Gasvolumenexpansion zusammen, zum anderen mit der Möglichkeit, dass in der Hitze nicht das  $\text{NONOat}$ , sondern ein oder mehrere andere Produkte gebildet werden. Die Aufarbeitung dieses Ansatzes hinterließ einen dunkelbraunen, öligen Rückstand, dessen  $^1\text{H-NMR}$  die Bildung des 1-Nitrosopiperazin belegt und nicht etwa die der Verbindung **1a** (siehe Abb. 18). Die Signale der Protonen aus Position 5/5' (m, 2.65 ppm), 3/3' (m, 2.88 ppm), 2'/6' (m, 3.71 ppm) und 2/6 (m, 4.05) des 1-Nitrosopiperazin stimmen mit Literaturdaten überein.<sup>[97]</sup> Für Verbindung **1a** fände man im  $^1\text{H-NMR}$  Spektrum für das mono-protonierte Piperazin laut Literatur ein Singulett (bedingt durch den raschen Protonenaustausch der N-Atome) bei 3.7 ppm.<sup>[98]</sup>

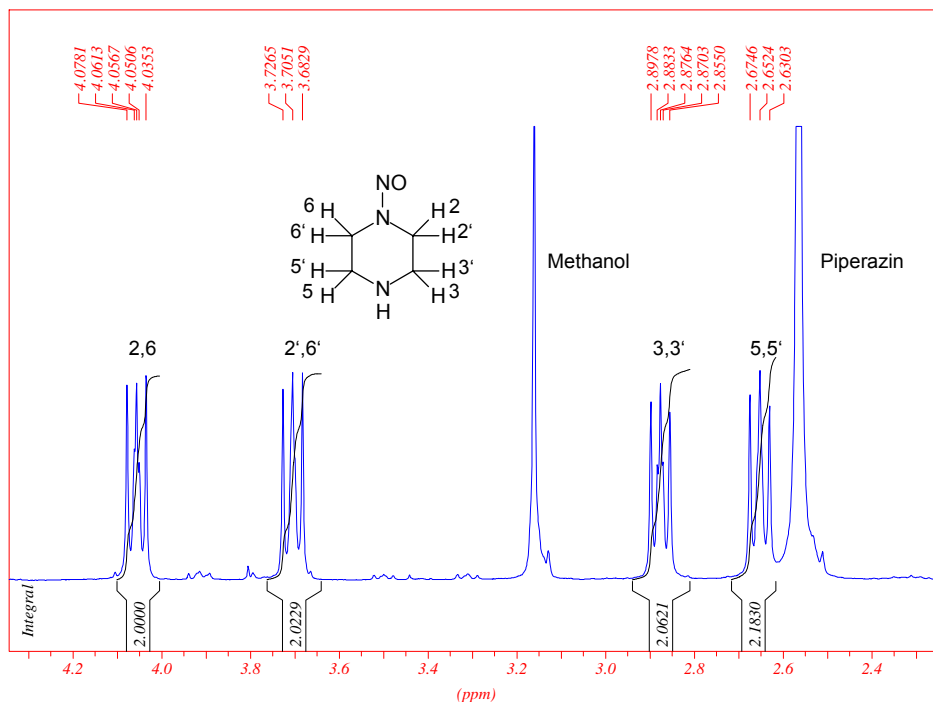


Abb. 18  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von 1-Nitrosopiperazin in  $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$

#### Druckabhängigkeit der Reaktion

Um die Druckabhängigkeit der Diazoniumdiolat-Synthese zu untersuchen, wurden jeweils 0.05 mol Pyrrolidin und Natrium in 100 ml Methanol gelöst und einem Druck von 2 bar  $\text{NO}^-$ -Gas ausgesetzt. In einem der Experimente wurde zusätzlich Stickstoff eingeleitet, um einen Gesamtdruck von 4 bar zu erhalten. Die unterschiedlichen Kurven sind in Abbildung 19 dargestellt.

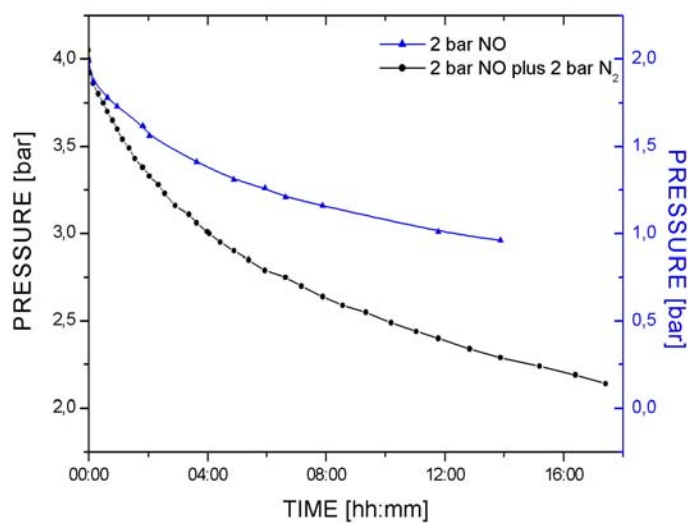
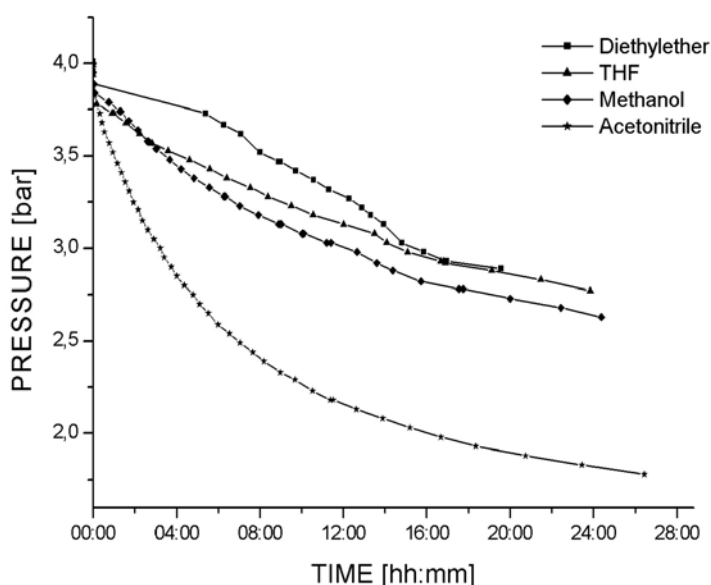


Abb. 19 Stickoxidverbrauch während der Reaktion mit Pyrrolidin in Abhängigkeit vom Anfangsdruck

Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einem Gesamtdruck von 4 bar die Reaktion schneller und quantitativer abläuft. Der Druckverlust innerhalb der ersten sieben Stunden nach Reaktionsbeginn beträgt 0.8 bar für die Synthese bei 2 bar  $\text{NO}^{\cdot}$  und 1.3 bar bei der Reaktion mit Stickstoffanteil. Obwohl in beiden Reaktionskammern dieselbe Stoffmenge Stickstoffmonoxid vorhanden ist, ist der Gesamtdruckverlust bei der Hochdruckreaktion doppelt so groß wie bei der Niedrigdruckreaktion, was einen quantitativeren Verlauf der NONOat-Bildung belegt. Bestätigt wird diese Aussage durch die fast 30 % höhere isolierbare Ausbeute an PYRRO/NO nach Beendigung der Reaktion.

#### *Einfluss des Lösungsmittels*

Für die Synthese von intramolekularen Diazeniumdiolat-Salzen aus Oligoaminen wird häufig Acetonitril als Lösungsmittel verwendet. Um den Einfluss anderer Lösungsmittel zu untersuchen wurde Diethylentriamin als Ausgangssubstanz verwendet, um die Bildung des bekannten Diazeniumdiolates DETA/NO zu überwachen. Da für die Produktion dieses intramolekularen Salzes kein Basenzusatz erforderlich ist, konnte auch auf unpolare, leicht flüchtige Lösungsmittel wie Diethylether und Tetrahydrofuran (THF) zurückgegriffen werden. Abbildung 20 zeigt die  $\text{NO}^{\cdot}$ -Druckabnahme bei der Reaktion mit Diethylentriamin jeweils in Diethylether, THF, Methanol und Acetonitril als Lösungsmittel.



*Abb. 20 Stickoxidverbrauch während der Reaktion mit Diethylentriamin in unterschiedlichen Lösungsmitteln*

Die Druckabnahme innerhalb der ersten 7 Stunden nach Reaktionsbeginn war mehr als doppelt so hoch bei der Synthese in Acetonitril im Vergleich zu Methanol und THF, sogar fünf mal höher als in Diethylether. Lediglich in Acetonitril bildete sich im Verlauf der Reaktion das weiße Präzipitat von DETA/NO. In Diethylether und THF fiel das Produkt nach einengen des Reaktionsgemisches in geringen Mengen aus, dagegen konnte das NONOat aus Methanol nicht isoliert werden.

## Einfluss der Basenstärke/Gegenion

Eine treibende Kraft, um das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der NONOat-Bildung zu fördern, ist der Zusatz einer Base. In verschiedenen Experimenten mit Pyrrolidin als Ausgangsamin wurde der Reaktionsverlauf aufgezeichnet, bei denen zum einen die starke Base Methanolat, zum anderen das Pyrrolidin selbst als Base verwendet wurde. In zwei Experimenten entstand das Methanolat durch Lösen äquimolarer Mengen (0.05 mol) von elementarem Natrium oder Lithium in Methanol, in einem dritten Ansatz wurde die doppelte Stoffmenge (0.1 mol) Pyrrolidin eingesetzt. Als Produkt entstand in allen drei Fällen das PYRRO/NO, jeweils als Na-, Li- oder Pyrrolidinium-Salz. Die aufgezeichneten Druckabnahmekurven sind in Abbildung 21 dargestellt.

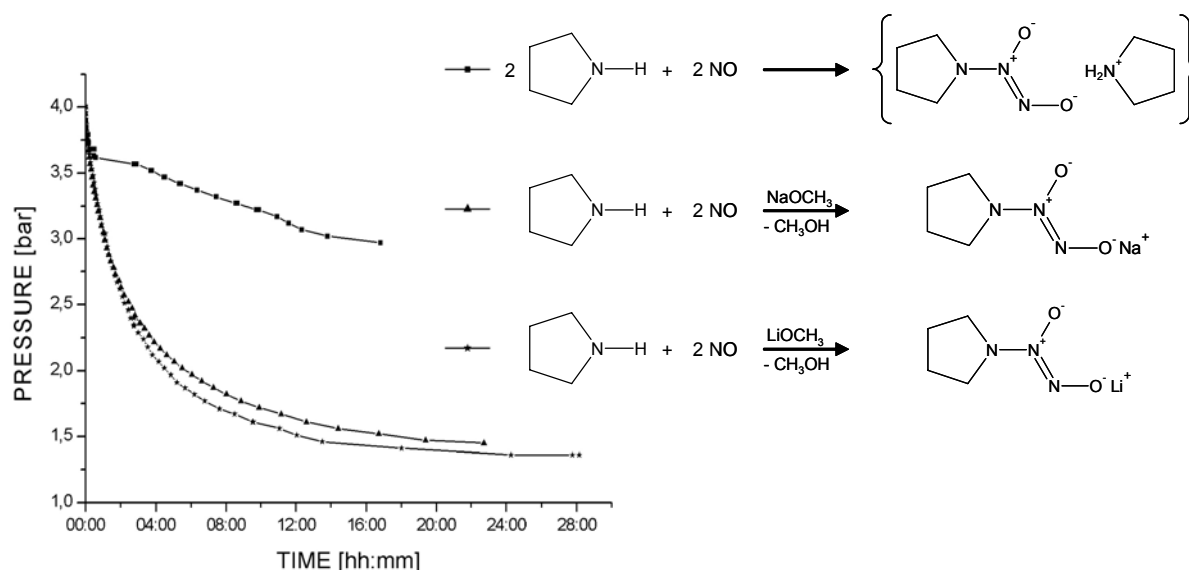


Abb. 21 Stickoxid Druckabnahme während der Reaktion mit Pyrrolidin und unterschiedlichen Basen

Die Experimente, bei denen Lithium- bzw. Natrium-Methanolat verwendet wurde, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Reaktionsgeschwindigkeit und boten auch eine vergleichbare Ausbeute von ca. 90 %. Dies verwundert nicht, da in beiden Fällen das Methanolat-Anion die Base darstellt. Sehr viel langsamer verlief die Umsetzung zum PYRRO/NO-Pyrrolidinium Salz, welches aus dem Lösungsmittel präzipitierte. Die Messung der NO-Freisetzung aus den drei Salzen ergab praktisch identische Zerfallshalbwertszeiten von  $t_{1/2} = 3-6$  s.

Um festzustellen, ob eine mehr als äquimolare Stoffmenge an Methanolat die Reaktion beschleunigt, wurde in einem Versuch die doppelte Menge Natrium (0.1 mol) zugesetzt. Die aufgezeichnete Druckabnahme zeigte sich jedoch deckungsgleich mit der Kurve aus der Synthese mit äquimolarem Basenzusatz.

#### 4.1.2 HPLC Untersuchungen der NONOate

Wie schon in der Einleitung (Kapitel 1.2.5) erwähnt, gibt es bis heute keine universell einsetzbare HPLC-Methode um die Reinheit einer Diazeniumdiolat-Probe zu beurteilen. In der Arbeit von Fitzhugh *et al.* wird für die Detektion der NONOate und deren potentiellen Verunreinigungen ein Dynamax PDA-2 Dioden Array Detektor verwendet mit einer fest eingestellten Wellenlänge von 250 nm.<sup>[72]</sup> Während der Messung wurde in regelmäßigen Abständen ein Spektrum von 190-400 nm aufgezeichnet um eventuelle Verunreinigungen wie Nitrosamine zu erfassen. Als Fließmittel kam ein Acetonitril/Wasser-Gemisch (97:3) mit 0.1 % Diethylamin auf einer Rocket-Platinum-NH<sub>2</sub>-Säule (7 x 53 mm, 100 Å Porengröße, 3 µm Partikelgröße) mit einer Flussrate von 2.5 ml/min zum Einsatz.<sup>[72]</sup> Problematisch an dieser Methode ist, dass nicht UV-aktive Verunreinigungen, wie die meisten Ausgangsamine, nicht erfasst werden. Gerade diese stellen jedoch beim Zerfall der NONOate, z.B. durch unsachgemäße Lagerung oder schlichtes Altern der Probe, die Hauptverunreinigung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige HPLC Vorversuche erarbeitet, um ebenfalls nicht UV-aktive Amine zu erfassen. Um dies zu ermöglichen, wurde der UV-Detektion bei 251 nm ein Chemilumineszenz-Stickstoffdetektor (CLND; siehe Kapitel 1.3.4) nachgeschaltet. Da die von Fitzhugh *et al.* verwendeten Fließmittelgemische aus Acetonitril und Diethylamin jedoch durch ihren Stickstoffanteil für diese Detektionsart nicht geeignet sind, wurden Methanol/Wasser, Propanol/Wasser und Methanol/DMSO/Wasser Gemische in jeweils unterschiedlichen Zusammensetzungen verwendet. Um die Stabilität der NONOate zu gewährleisten, enthielten die Fließmittel eine 0.01 N Konzentration an NaOH. Um diesen Bedingungen standhalten zu können, musste eine alkalistabile Gemini Säule von der Firma Phenomenex® (Gemini 5u C18, 4.6 x 250 mm, 110 Å Porengröße; inklusive 4 x 3 mm Gemini Vorsäule) verwendet werden. Die Flussrate von 0.5 ml/min blieb über den Messzeitraum von 40 min konstant. Injiziert wurden 10 µl einer 0.3 mM NONOat/0.01 N NaOH-Lösung von MORPH/NO oder PYRRO/NO (siehe Abb. 22).

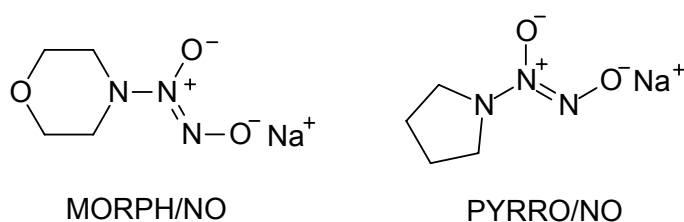


Abb. 22 Strukturformeln der für die HPLC Untersuchungen verwendeten Diazeniumdiolate

Die Retentionszeiten der NONOate waren bei den Fließmittelgemischen Methanol/Wasser und Propanol/Wasser nahezu identisch, ausschlaggebend ist lediglich der Wasseranteil, der, wie zu erwarten, in höheren Konzentrationen die Retention der polaren NONOate verringert. Exemplarisch ist in Abbildung 23 das CLND- und UV-Chromatogramm einer frisch hergestellten MORPH/NO Probe dargestellt. Das hier verwendete Fließmittelgemisch ist Methanol/Wasser (8:2) mit 0.01 N NaOH Anteil.



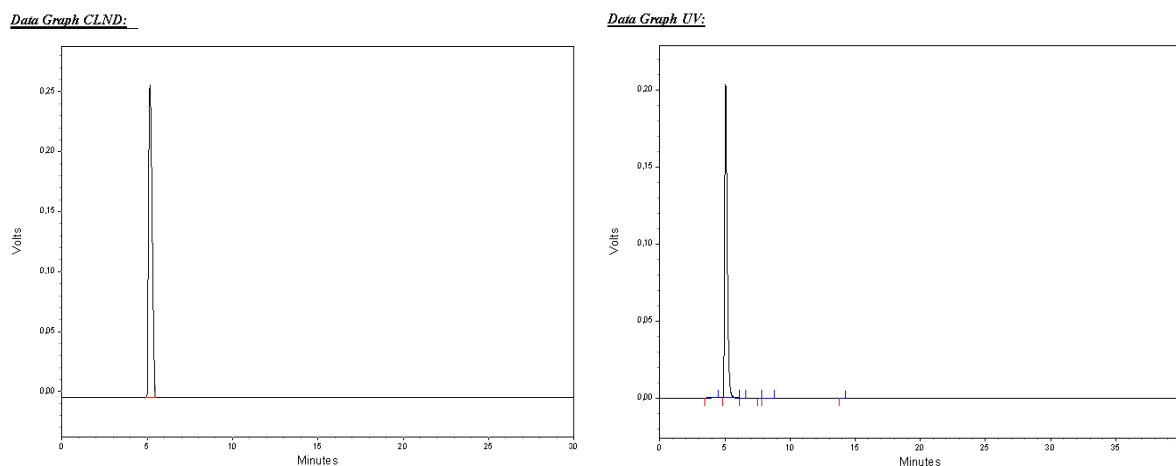


Abb. 23 HPLC-Chromatogramm von MORPH/NO links: CLN-Detektion, rechts: UV-Detektion

In dem gemessenen Zeitraum von 40 Minuten wurde unter diesen Bedingungen nach 5 min ein Signal detektiert, das sowohl bei der CLND als auch bei der UV-Detektion praktisch 100 % der Gesamtfläche im Chromatogramm ausmacht und somit die Reinheit des MORPH/NO verglichen mit Daten aus der Elementaranalyse bestätigt.

Um festzustellen, ob die Abbauprodukte der NONOate unter diesen Messbedingungen nachweisbar sind, wurde eine Charge weißes PYRRO/NO eine Woche offen auf einem Uhrglas im Abzug gelagert. Nach diesem Zeitraum war auf der Charge die charakteristische Gelbfärbung des pulvrigen Granulats deutlich zu erkennen, welche auf den Zerfall des NONOates zurückzuführen ist. Abbildung 24 stellt das Chromatogramm dieser Probe unter der oben genannten Messanordnung dar.

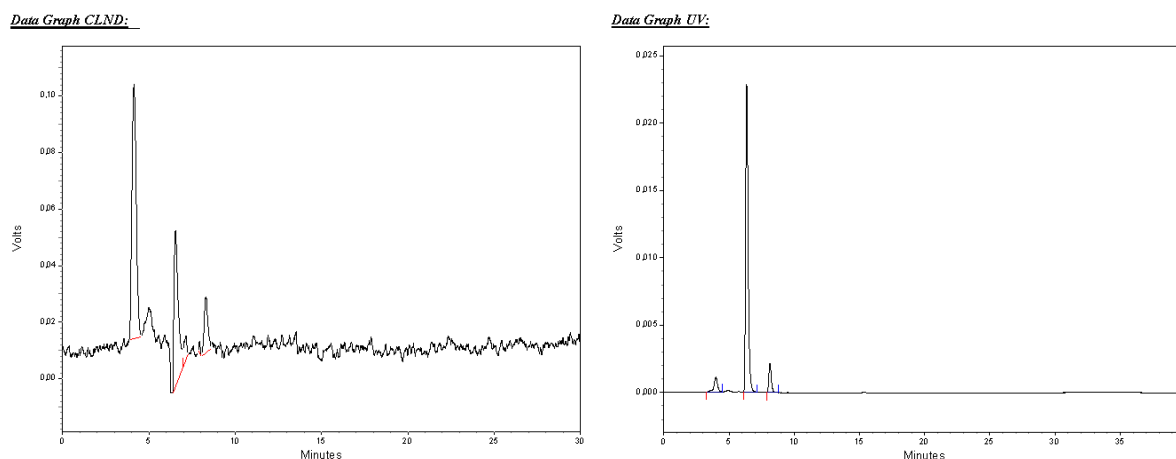


Abb. 24 HPLC-Chromatogramm von PYRRO/NO links: CLN-Detektion, rechts: UV-Detektion

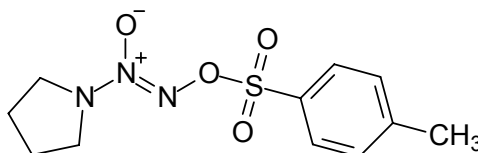
Das Chromatogramm verdeutlicht die Problematik der einfachen UV-Detektion. Nach etwa 6,5 min wird durch den UV-Detektor das PYRRO/NO-Signal mit einem Flächenanteil von 86 % aufgezeichnet. Dagegen ist der Flächenanteil dieses Signals, das durch Chemilumineszenz erfasst wurde, deutlich geringer. Das bei 251 nm nicht lichtabsorbierende Pyrrolidin macht nach 4,1 min Retentionszeit mit fast 60 % des Flächenanteils den tatsächlichen Hauptbestandteil der untersuchten Probe aus.

Da der Hauptfokus dieser Arbeit nicht die Entwicklung einer verbesserten HPLC-Methode sein sollte, wurden keine detaillierten Untersuchungen diesbezüglich angestellt. Die oben genannten Vorversuche sollten lediglich feststellen, ob die HPLC mit CLN-Detektion prinzipiell ein geeignetes Mittel für Untersuchungen an NONOaten darstellt.

#### 4.1.3 Synthese von Diazen-1-ium-1,2-diolat Prodrugs

In diesem Kapitel sollen die synthetisierten Diazeniumdiolat-Prodrugs, die in keiner der Veröffentlichungen der vorliegenden Arbeit erwähnt werden, monographiert werden.

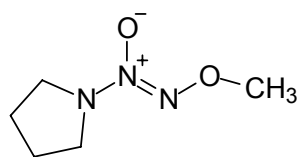
##### *Tosyl-PYRRO/NO*



O<sup>2</sup>-(p-Methylbenzen-sulfonyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat: 0.58 g (3.8 mmol) fein disperses Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (PYRRO/NO) werden zusammen mit 800 mg Natriumcarbonat bei 4 °C in 50 ml *tert*-Butylmethylether suspendiert. 1.0 g (5.25 mmol) Toluol-4-sulfonylchlorid gelöst in 10 ml *tert*-Butylmethylether werden tropfenweise der gekühlten Suspension zugesetzt und anschließend für 48 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Feststoffe werden abfiltriert und das farblose Filtrat im Kühlschrank gelagert bis sich weiße Kristalle abscheiden (62% Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.97 (t, 4H, *J*= 5.0 Hz), 2.46 (s, 3H), 3.60 (t, 4H, *J*= 5.0 Hz), 7.36 (d, 2H, *J*= 8.1 Hz), 7.89 (d, 2H, *J*= 8.1 Hz); <sup>13</sup>C-NMR 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ 21.7, 23.3, 50.3, 128.8, 129.7, 132.1, 145.7; E.A. ber. für: C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S (285): C 46.30, H 5.30, N 14.73, O 22.43, S 11.24; gef.: C 46.21, H 5.09, N 14.92, S 11.16.

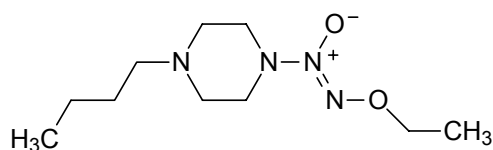
Um sicher zu stellen, dass nicht fälschlicherweise durch den vorzeitigen PYRRO/NO-Zerfall einfach das Pyrrolidin-Analogum gebildet wird, wurde die oben beschriebene Reaktion ebenfalls mit Pyrrolidin statt PYRRO/NO durchgeführt, um eine Referenzsubstanz zu erhalten. Im <sup>1</sup>H-NMR Spektrum ist deutliche zu erkennen, dass die Protonen der zum Pyrrolidin N-Atom benachbarten Kohlenwasserstoffe statt bei δ 3.60 ppm bei dieser Verbindung zu δ 3.21 ppm hochfeldverschoben sind.

## Me-PYRRO/NO

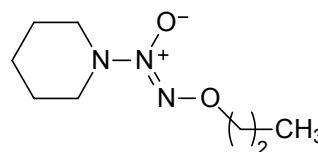


O<sup>2</sup>-(Methyl)-1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2diolat: 0.58 g (3.8 mmol) fein disperses Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl)diazen-1-ium-1,2-diolat (PYRRO/NO) wird zusammen mit 800 mg Natriumcarbonat bei 4 °C in 50 ml *tert*-Butylmethylether suspendiert. Eine äquimolare Menge (0.5 g) Dimethylsulfat gelöst in 10 ml *tert*-Butylmethylether wird vorsichtig zugetropft und 24 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließendes Filtrieren und Einrotieren des Filtrats ergibt ein gelbes Öl, das keiner weiteren Reinigung bedarf (83 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR 250 MHz (D<sub>2</sub>O) δ 1.70 (m, 4H), 3.26 (m, 4H), 3.76 (s, 3H); E.A. ber. für: C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (145): C 41.37, H 7.64, N 28.95, O 22.04; gef.: C 41.31, H 7.31, N 28.99.

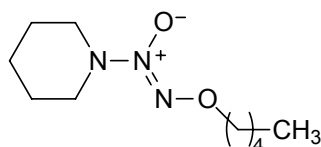
## Et-BUPIPERAZI/NO, Prop-PIPER/NO, Pent-PIPER/NO, MTME-PIPER/NO, 1,5-di-PYRRO/NO-pentan



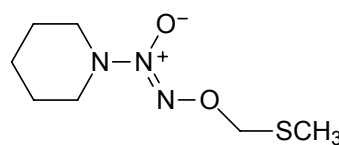
Et-BUPIPERAZI/NO



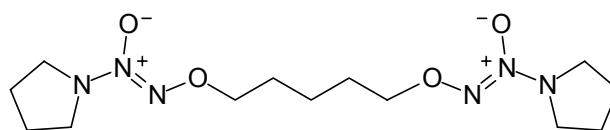
Prop-PIPER/NO



Pent-PIPER/NO



MTME-PIPER/NO



1,5-di-PYRRO/NO-pentan

Für die Derivatisierung des O<sup>2</sup>-Atoms an NONOaten mit Alkylhalogeniden wurde folgende allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) entwickelt:

**AAV 1:** Etwa 800 mg fein verriebenes Natriumcarbonat in 50 ml Hexamethylphosphorsäuretriamid (HMPA) suspendieren, auf 4 °C abkühlen und die angegebene Menge fein disperses NONOat geben. Langsam einen 1.5-fach molaren Überschuss des entsprechenden Alkylhalogenides zutropfen und 72 h bei Raumtemperatur rühren lassen. Anschließend in eine gesättigte, wässrige NaHCO<sub>3</sub> Lösung filtrieren und zweimal mit Ethylacetat extrahieren. Das Ethylacetat 5-6 mal mit NaHCO<sub>3</sub> Lösung

waschen und einrotieren. Der Rückstand wird säulenchromatographisch über Kieselgel mit geeignetem Eluent gereinigt.

In der Literatur findet man häufig Dimethylformamid (DMF) als verwendetes Lösungsmittel für ähnliche Reaktionen. Allerdings verläuft die Synthese bei der Verwendung von HMPA vollständiger ab und der Lösungsmittelrückstand lässt sich besser entfernen. Experimente das HMPA durch weniger giftigen Tetramethylharnstoff als Lösungsmittel zu ersetzen, waren aufgrund eines schlechteren Ausbeute/Nebenprodukt Verhältnisses nicht erfolgreich.

O<sup>2</sup>-Ethyl-1-(butylpiperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (Et-BUPIPERAZI/NO): 4 mmol (900 mg) Natrium 1-(butylpiperazin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (BUPIPERAZI/NO) wurde nach **AAV 1** mit Ethyliodid umgesetzt und mit Dichlormethan säulenchromatographisch zum hellbraunen Öl gereinigt (93 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.90 (t, 3H, J= 7.1 Hz), 1.25-1.54 (m, 4H, J= 7.1 Hz), 1.38 (t, 3H, J= 7.1 Hz), 2.34 (t, 2H, J= 7.1 Hz), 2.59 (t, 4H, J= 5.0 Hz), 3.42 (t, 4H, J= 5.0 Hz), 4.25 (q, 2H, J= 7.1 Hz); <sup>13</sup>C-NMR 250 MHz (CDCl<sub>3</sub>) δ 13.9, 14.6, 20.6, 28.9, 51.3, 52.0, 57.7, 69.6; E.A. ber. für: C<sub>10</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> (230): C 52.15, H 9.63, N 24.33, O 13.89; gef.: C 52.12, H 9.76, N 23.96.

O<sup>2</sup>-Propyl-1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (Prop-PIPER/NO): 6 mmol (1 g) Natrium 1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (PIPER/NO) wurde nach **AAV 1** mit Propyliodid zu einer rot-braunen Flüssigkeit umgesetzt, die keiner weiteren Reinigung bedarf (76 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.96 (t, 3H, J= 7.4 Hz), 1.45-1.54 (m, 2H), 1.71-1.82 (m, 6H), 3.31 (t, 4H, J= 5.5 Hz), 4.17 (t, 2H, J= 6.9 Hz); E.A. ber. für: C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (187): C 51.32, H 9.15, N 22.44, O 17.09; gef.: C 51.33, H 9.23, N 22.28.

O<sup>2</sup>-Pentyl-1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (Pent-PIPER/NO): 6 mmol (1 g) Natrium 1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (PIPER/NO) wurde nach **AAV 1** mit 1-Iodpentan zu einer braunen Flüssigkeit umgesetzt. Der Rückstand wurde mit Chloroform/Ethylacetat/N-Hexan (35:15:50) chromatographisch gereinigt. (23 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.90 (m, 3H), 1.31-1.52 (m, 8H), 1.63-1.80 (m, 4H), 3.31 (t, 4H, J= 5.6 Hz), 4.23 (t, 2H, J= 6.9 Hz); E.A. ber. für: C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> (215): C 55.79, H 9.83, N 19.52, O 14.86; gef.: C 56.23, H 9.53, N 19.28.

O<sup>2</sup>-Methylthiomethyl-1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (MTME-PIPER/NO): 6 mmol (1 g) Natrium 1-(piperidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (PIPER/NO) wurde nach **AAV 1** mit Chlormethylmethylsulfid zu einer rot-braunen Flüssigkeit umgesetzt, die keiner weiteren Reinigung bedarf (95 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.72-1.82 (m, 6H), 3.34 (t, 4H, J= 5.5 Hz), 3.52 (s, 3H), 5.28 (s, 2H); E.A. ber. für: C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S (205): C 40.96, H 7.37, N 20.47, O 15.59, S 15.62; gef.: C 40.63, H 7.23, N 20.28.

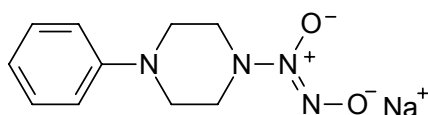
O<sup>2</sup>, O<sup>2'</sup>-Pentylen-bis-1-(pyrrolidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (1,5-di-PYRRO/NO-pentan): Abweichend von **AAV 1** wurde ein 3-facher molarer Überschuss Natrium 1-(pyrrolidin-1-yl) diazen-1-ium-1,2-diolat (PYRRO/NO) mit 2.2 mmol (0.5 g) 1,5-dibromopentan umgesetzt. Braunes Öl (61 % Ausbeute). <sup>1</sup>H-

NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.46-1.55 (m, 2H), 1.73-1.82 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 8H), 3.50 (mc, 8H), 4.16 (m, 4H);  
E.A. ber. für: C<sub>13</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> (330): C 47.26, H 7.93, N 25.44, O 19.37; gef.: C 46.74, H 8.14, N 25.86.

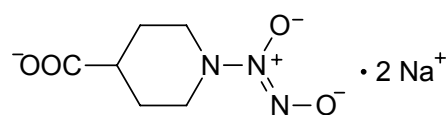
## 4.2 Biologische Aktivität einiger synthetisierter NO-Donoren

### 4.2.1 Vasodilatation *in vitro*

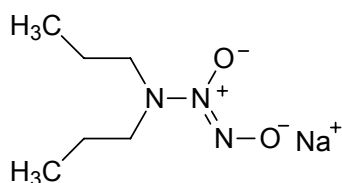
Drei der in Veröffentlichung 2 beschriebenen Diazeniumdiolate und ein Diazeniumdiolat-Prodrug aus Veröffentlichung 3 (siehe Abb. 25) wurden für weitere Untersuchungen an isolierten Gefäßringen der Arteria Pulmonalis vom Schwein verwendet. Die praktische Durchführung dieser pharmakologischen Untersuchungen entspricht denen, die auch in Veröffentlichung 4 beschrieben sind und erfolgten in Kooperation mit Herrn Apotheker Andreas König.



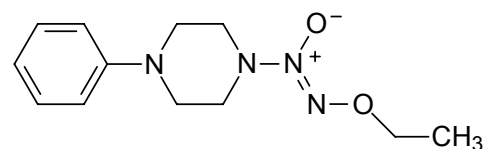
Trivialname: PHEPIPERAZI/NO  
Bezeichnung in Veröffentlichung 2: **2g**



Trivialname: ISONIPECO/NO  
Bezeichnung in Veröffentlichung 2: **2i**



Trivialname: DPA/NO  
Bezeichnung in Veröffentlichung 2: **2m**



Trivialname: Et-PHEPIPERAZI/NO  
Bezeichnung in Veröffentlichung 3: **4b**

Abb. 25 Für pharmakologische Untersuchungen verwendete Diazeniumdiolate

Um die vasodilatatorische Potenz der Substanzen besser einschätzen zu können, wurde das therapeutisch häufig eingesetzte Glyceroltrinitrat (GTN) als Referenzsubstanz verwendet. Abbildung 26 und Tabelle 4 skizzieren die durch die Substanzen ausgelöste Vasorelaxation.

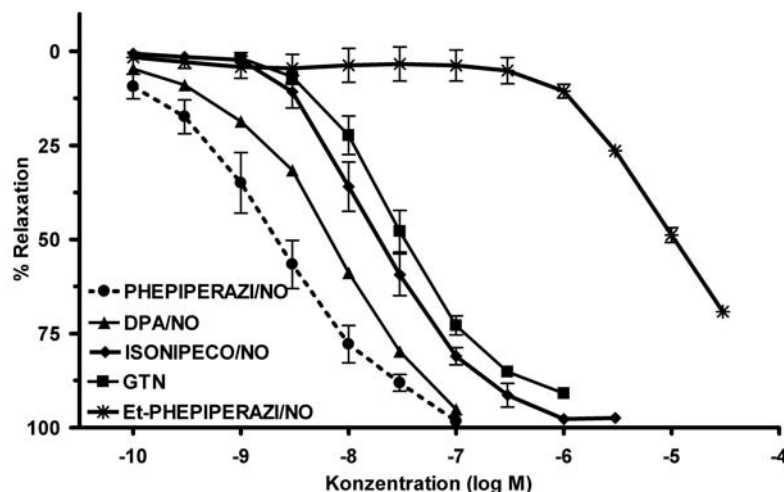


Abb. 26 Vasodilatierende Aktivität der Diazeniumdiolate und Glyceroltrinitrat (GTN) als Referenz an  $PGF_{2\alpha}$ -vokontrahierten Pulmonalarterien mit intaktem Endothel. Die gefäßrelaxierende Wirkung ist in Prozent zu der durch  $PGF_{2\alpha}$  ausgelösten Vokontraktion dargestellt. Mittelwerte  $\pm$  SEM

Das direkt  $NO\cdot$ -freisetzende NONOat PHEPIPERAZI/NO löst bereits bei einer Konzentration von  $2.12 \times 10^{-9}$  M den halbmaximalen Effekt an den isolierten Gefäßen aus. Etwa um den Faktor 3 schwächer ist das Dipropylamino-NONOat DPA/NO und ISONIPECO/NO stellt von den Diazeniumdiolat-Natrium Salzen mit einem  $EC_{50}$ -Wert von  $2.06 \times 10^{-8}$  M die schwächste Verbindung dar. Für diese drei spontan freisetzenden  $NO\cdot$ -Donoren sind in Tabelle 4 die UV-spektroskopisch ermittelten Freisetzungshalbwertszeiten ( $t_{1/2}$  bei pH 7.4, 37 °C) angegeben (vergl. Veröffentlichung 2).

Tab. 4 Ermittelte  $EC_{50}$ -,  $pD_2$ -Werte und Zerfallshalbwertszeiten der NONOate und Glyceroltrinitrat (GTN) als Referenz an  $PGF_{2\alpha}$ -vokontrahierten Pulmonalarterien vom Schwein mit intaktem Endothel

Substanz	$EC_{50}$ [mol/l]	$pD_2$ (n)	Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) der $NO\cdot$ -Freisetzung [min]
PHEPIPERAZI/NO	$2.12 \times 10^{-9}$	8.67 (5)	4.5
DPA/NO	$6.37 \times 10^{-9}$	8.20 (2)	1.5
ISONIPECO/NO	$2.06 \times 10^{-8}$	7.69 (3)	0.5
GTN	$1.91 \times 10^{-8}$	7.44 (6)	--
Et-PHEPIPERAZI/NO	$1.09 \times 10^{-5}$	4.96 (2)	--

Vergleicht man die  $NO\cdot$ -Freisetzung mit der vasodilatatorischen Aktivität, so stellt man fest, dass die langsamer freisetzenden NONOat-Natrium Salze die größere Gefäßerweiterung auslösen. Der Grund hierfür ist die höhere Verfügbarkeit des  $NO\cdot$  am Gefäßring. Je schneller ein NONOat freisetzt, desto mehr  $NO\cdot$  wird in dem mit Carbogengas (95% Sauerstoff!) durchspülten Nährmedium zum  $NO_2$  oxidiert, welches dann wiederum rasch mit Wasser überwiegend zum Nitrit weiterreagiert (vergl. Kapitel 1.1). Da die schnell freisetzenden NONOate in einem kurzen Zeitraum mehr Stickstoffmonoxid

freisetzen als am Gefäßring in dieser Zeit einen biologischen Effekt auslösen kann, geht ein relativ großer Teil des theoretisch verfügbaren NO<sup>•</sup> verloren. Das Organonitrat GTN und das NONOat-Prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO setzen im Organbad erst nach biologischer Aktivierung Stickstoffmonoxid frei. Die im Vergleich zu den NONOat-Na Salzen erst verzögert eintretende Wirkung lässt sich dadurch erklären, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, anders als bei den direkt und spontan freisetzenden NONOat-Na Salzen, die Enzymaktivität ist. Die deutlich geringere Aktivität des NONOat-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO muss somit ebenfalls mit der Aktivität und/oder der geringeren Konzentration des metabolisierenden Enzyms zusammenhängen. Messungen mit der zuvor schon beschriebenen NO-Sonde zeigten, dass eine chemische Hydrolyse dieses Prodrugs im Nährmedium nicht stattfindet.

Eine Präinkubation der isolierten Gefäßringe mit dem kompetitiven Antagonisten der löslichen Guanylatcyclase ODQ (10 µM) bewirkte eine starke Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve während der Messung mit ISONIPECO/NO. Der ermittelte EC<sub>50</sub>-Wert ergab eine Konzentration von  $1.02 \times 10^{-6}$  mol/l im Vergleich zu  $2.06 \times 10^{-8}$  mol/l ohne ODQ-Inkubation. Wie erwartet konnte somit die Wirkungsabhängigkeit von der sGC für das ISONIPECO/NO nachgewiesen werden.

#### 4.2.2 Neuroregenerative Eigenschaften von DETA/NO und Et-BUPIPERAZI/NO *in vivo*

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Dr. Redecker und seiner Mitarbeiter, insbesondere Frau Dr. Silke Keiner, wurden Diazeniumdiolate zur Verfügung gestellt, um die Zellproliferation und – differenzierung in der Umgebung experimentell induzierter Hirninfarkte bei der Ratte zu untersuchen. Bei diesem *in vivo* Modell wird durch unterschiedliche Verhaltenstests, sowie einer Reihe von zyto- und histologischen Untersuchungen *post mortem*, die neuroregenerativen Eigenschaften applizierter Substanzen beurteilt. Da die Untersuchungen noch nicht vollständig abgeschlossen und ausgewertet sind, soll an dieser Stelle nur kurz auf die bisher vorliegenden Ergebnisse aus den Vorversuchen eingegangen werden.

Als NO<sup>•</sup>-Donoren wurden das direkt NO<sup>•</sup>-freisetzende Diazeniumdiolat DETA/NO (siehe Veröffentlichung 1) und das NONOat-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO (siehe Kapitel 4.1.3 und Veröffentlichung 5) verwendet. Die genauen Durchführungen dieser Vorversuche sind der zitierten Literatur zu entnehmen, eine kurze Zusammenfassung ist wie folgt.<sup>[99-101]</sup> Zwei Tage vor der Induktion des fokalen kortikalen Infarktes im Vorderpfotenkortex, ausgelöst durch Kaltlicht Photothrombose am geöffneten Schädel der narkotisierten Ratten, wurde den Versuchstieren eine tägliche Dosis von 30, 60 oder 600 µg/kg Körpergewicht an Et-BUPIPERAZI/NO verabreicht. Anderen Tieren wurde zum Vergleich das DETA/NO in einer Dosierung von 400 µg/kg ebenfalls intraperitoneal appliziert. Zusammen mit jeder Wirkstoffapplikation wurde den Versuchstieren BrdU (Bromdesoxyuracil) in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht injiziert. BrdU ist ein Proliferationsmarker und lässt somit die Quantifizierung von neugebildetem Gewebe zu. Die tägliche NO<sup>•</sup>-Donor- und BrdU Gabe wurde bis zum 14. Tag nach Auslösen der Photothrombose fortgesetzt. Am 14. Tag nach Hirninfarktinduktion wurde das Tiermaterial getötet, die Gehirne freipräpariert und anschließend makro- und mikroskopisch

untersucht. Um das Ausmaß an neugebildetem Gewebe zu bestimmen, wurde zum einen die Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus im Hippocampus bestimmt, zum anderen das globale Hirnvolumen und das Volumen der photothrombotischen Läsion (Photothrombose-Volumen).

In Abbildung 27 ist die Anzahl BrdU-positiver Zellen und das Volumen der Photothrombose Läsion in Abhängigkeit vom applizierten NONOat und der jeweiligen Dosierung graphisch dargestellt.

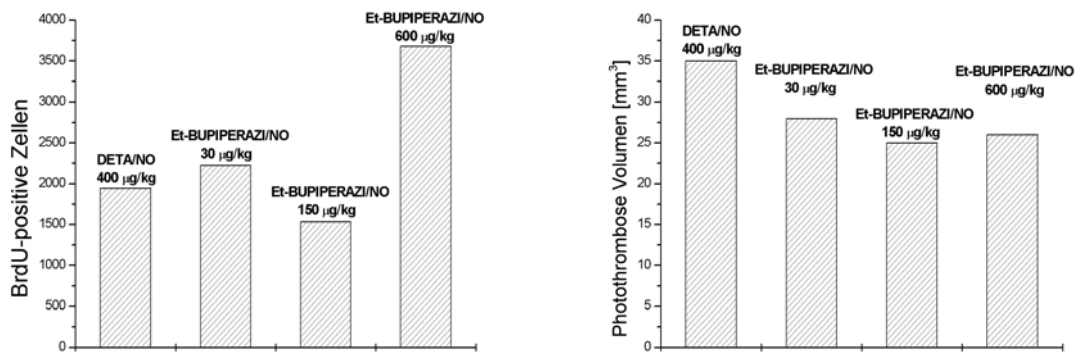


Abb. 27 links: BrdU-positive Zellen in der Subgranulärzone des Hippocampus der Rattenhirne und rechts: Photothrombose-Volumen nach NONOat-Applikation

Die höchste Dosis von 600 µg/kg (entspricht 2.45 µmol/kg) Et-BUPIPERAZI/NO ergab in den Versuchstieren die höchste Proliferation an neuronalem Gewebe. Das direkt NO-freisetzende DETA/NO veranlasst bei etwa gleicher molarer Dosis (400 µg/kg entspricht 2.5 µmol/kg) das Auffinden von nur halb soviel markierten Zellen. Eine direkte Dosis-Wirkungskorrelation für das Et-BUPIPERAZI/NO konnte in diesen Vorversuchen jedoch nicht festgestellt werden. Während der Betrag des globalen Hirnvolumens bei allen vier Versuchsreihen mit 1000 +/-75 mm<sup>3</sup> gleich war, ist dass Photothrombose-Volumen bei den Versuchsreihen mit Et-BUPIPERAZI/NO auffallend geringer. Die durch das Kaltlicht verursachte Verletzung ist bei den Versuchstieren, die mit Et-BUPIPERAZI/NO behandelt wurden, in ihrem Volumen somit geringer als bei denen, die DETA/NO erhielten.



## 5. Gesamtdiskussion

### 5.1 Bewertung der *NOTizer*<sup>®</sup>-Apparatur für die Synthese von Diazen-1-ium-1,2-diolaten

Die ersten NONOate wurden 1960 von Drago *et al.* synthetisiert, indem NO-Gas bei einer Temperatur von -78 °C durch Lösungen von Aminen in Ether geleitet wurde.<sup>[70,95]</sup> Nachdem die physiologische Bedeutung des NO erkannt war, wurde die Synthese der NONOate in den 1990er Jahren verbessert. Unter erhöhtem Druck und Basenzusatz in einem Autoklav konnten neue NONOate in verbesserter Ausbeute als einheitlichere Produkte dargestellt werden.<sup>[70,102]</sup> Nachteil dieser Methode blieb die fehlende Überwachung des Syntheseverlaufs, sowohl durch Temperatur- und Druckaufzeichnung, als auch durch schlichtes visuelles Beobachten des Reaktionsgemisches. Mögliche Präzipitatbildung, Veränderungen in Farbe des Reaktionsgemisches oder des Gasraumes, z.B. durch Oxidation des farblosen NO<sup>·</sup> zu braunem NO<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, blieben bis zum Abbruch der Reaktion und Öffnen des Autoklaven unerkannt.

#### 5.1.1 Vorteile der *NOTizer*<sup>®</sup>-Apparatur und der erarbeiteten Methode

Der Einsatz des *NOTizers*<sup>®</sup> und die Anwendung der in Veröffentlichung 1 beschriebenen Methode stellen gegenüber den literaturbekannten Verfahren in erster Linie eine erhebliche Steigerung in Ausbeute und Reinheit der gewonnenen NONOate dar. Durch die Aufzeichnung des NO-Druckverlaufs kann auch nach wiederholter Druckerhöhung genau erkannt werden, wann der NO-Verbrauch, und somit die Reaktion, zum Stillstand kommt. Ferner ist es möglich, durch Quantifizierung der verbrauchten Stoffmenge an NO die zu erwartende Stoffmenge des jeweiligen NONOates absehen zu können, was gerade bei erstmaliger Synthese eines neuen Diazeniumdiolates von Bedeutung ist. Hieraus resultieren wichtige Erkenntnisse bezüglich möglicher Verbesserungen der anschließenden Produktisolierung. Äußerst hilfreich und sehr wichtig für die Reinheit des NONOates ist ferner die Möglichkeit, das Reaktionsgemisch beobachten zu können. Als eine Art "Inprozesskontrolle" kann die O<sub>2</sub>-Freiheit der Reaktionskammer überprüft werden, wenn sich beim Einleiten des farblosen NO-Gases weder der Gasraum noch die Lösung gelb oder braun verfärbt durch eventuelle NO-Oxidationsprodukte, die zu Nebenproduktbildung führen (vergl. Gleichung 4 bis 6, Kapitel 1.2.5). Ebenso ist es vorteilhaft, wenn das NONOat aus der Reaktionslösung präzipitiert, da Einengen des Lösungsmittels nach Abschluss der Reaktion immer die Gefahr der Mitisolierung von Edukt birgt. Beispielsweise ist weißes Natriummethanolat visuell nicht von den meisten NONOaten zu unterscheiden. Das zur Ausfällung des Diazeniumdiolates führende ideale Lösungsmittel kann so relativ leicht für neue, bisher unbekannte NONOate experimentell bestimmt werden.

### 5.1.2 Nachteile der *NOtizer*<sup>®</sup>-Apparatur und der erarbeiteten Methode

Da es sich bei der Reaktionskammer um eine druckbeständige Glasflasche handelt, kann die druckabhängige Gleichgewichtsreaktion zum NONOat nur einem maximalen Druck von 5-6 bar ausgesetzt werden. Dies ist ein Nachteil, wenn Diazeniumdiolate mit sterisch anspruchsvollen Substituenten am Amin hergestellt werden sollen (vergl. Veröffentlichung 2), wie es z.B. bei stickstoffhaltigen Polymeren der Fall sein kann.<sup>[103]</sup> Für solche Zwecke wäre ein hochdruckbeständiges Gefäß nötig um verwertbare Produktausbeuten zu erhalten. Ein Nachteil, der nicht direkt mit der *NOtizer*<sup>®</sup>-Apparatur zusammenhängt, sondern ein genereller Nachteil bei der Synthese von Diazeniumdiolaten ist, dass während der Reaktion keine Proben des Reaktionsgemisches entnommen werden können, beispielsweise für reaktionskinetische Untersuchungen.

## 5.2 Untersuchungen zur Bildung und Zerfall von Diazen-1-ium-1,2-diolaten

### 5.2.1 Bildung von Diazen-1-ium-1,2-diolaten

Die unmittelbare Bildung der NONOate lässt sich aus den oben genannten Gründen weder mit den bisher beschriebenen Methoden, noch mit dem *NOtizer*<sup>®</sup> beobachten. Um Proben während der Umsetzung entnehmen zu können, müsste ein offenes System oder eine geeignete Apparatur verwendet werden. Idealerweise müsste die Reaktionskammer so gestaltet sein, dass z.B. UV-spektroskopisch die Bildung des NONOates verfolgt werden kann. Auf diese Art wäre auch die Synthese von Diazeniumdiolaten nachvollziehbar, die einen hohen Druck an NO-Gas benötigen, um überhaupt entstehen zu können. Mit der *NOtizer*<sup>®</sup>-Apparatur kann jedoch im Gegensatz zu den literaturbekannten Methoden der NO-Druckverlauf aufgezeichnet und analysiert werden. So kann indirekt auch die NONOat-Bildung verfolgt werden, wobei vor allem die Registrierung der Reaktionsgeschwindigkeit und des Reaktionsendpunktes sehr wertvoll ist. Abbildung 28 stellt den Druck-Zeit Verlauf bei der Synthese des PYRRO/NO dar.

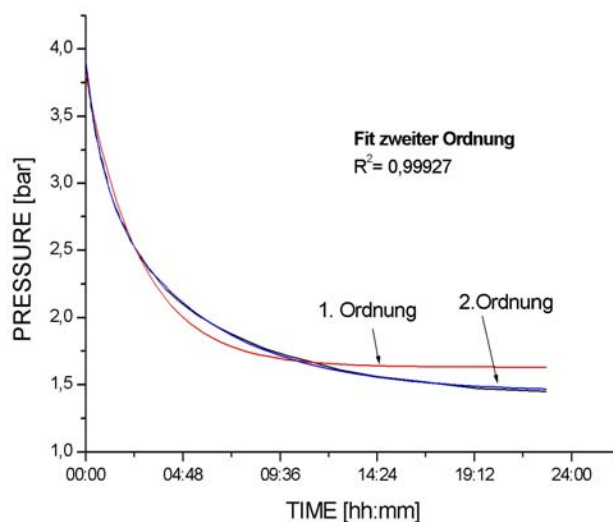


Abb. 28 schwarze Kurve: Druck-Zeit Verlauf bei der Reaktion von Pyrrolidin mit NO-Gas  
rote Kurve: exponentieller Fit 1.Ordnung  
blaue Kurve: exponentieller Fit 2. Ordnung

Mit entsprechender Software kann der Kurvenverlauf, und somit der NO-Gas Verbrauch, einem Zeitgesetz zweiter Ordnung zugeordnet werden. Eine Übertragung dieses Zeitgesetzes auf die Bildung des NONOates ist jedoch, ohne die Produktbildung zu verfolgen, nicht möglich. Ein Rückschluss auf die Reaktionsmolekularität oder den Mechanismus ist ebenfalls nur spekulativ (vergl. Kapitel 1.2.5). Eine wertvolle Information, die sich jedoch aus den Daten mit dem NOtizer<sup>®</sup> bestimmen lässt, ist neben der verbrauchten Stoffmenge NO pro Zeit ( $n_{\text{NO}}/dt$ ) die Umsatzrate (rate of conversion  $\xi$ ). Die IUPAC definiert die Umsatzrate wie folgt:<sup>[104]</sup>

$$\xi = \frac{d\xi}{dt} = \frac{1}{\nu_i} \frac{dn_i}{dt}$$

Wobei:  $n_i$  = Stoffmenge eines Edukts  $i$  zur Zeit  $t$

$\nu_i$  = stöchiometrischer Faktor von Edukt  $i$

Geht man davon aus, dass aus dem NO ausschließlich und sofort das NONOat entsteht, so kann man annehmen, dass die Umsatzrate des NO der Bildungsrate (rate of formation) des Diazeniumdiolats proportional ist. Um eine bessere Differenzierung zu ermöglichen, wurde der Begriff "formation rate" in Veröffentlichung 2 um einige Aspekte erweitert:

- der NO-Druckabfall innerhalb der ersten 7 h nach Synthesebeginn [bar]
- Ende der Reaktion [hh:mm]
- NO-Restdruck am Ende der Reaktion [bar]
- Stoffmengenverhältnis von NO-Verbrauch und Amin

### 5.2.2 Zerfall von Diazen-1-ium-1,2-diolaten

Der Zerfall der Diazeniumdiolate lässt sich sehr gut UV-spektroskopisch verfolgen, wobei das Absorptionsmaximum der  $[N(O)NO]^-$  Gruppe bei 251 nm liegt. In Abbildung 29 ist das Wellenlängen-Absorptionsspektrum des zerfallenden PIPER/NO in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

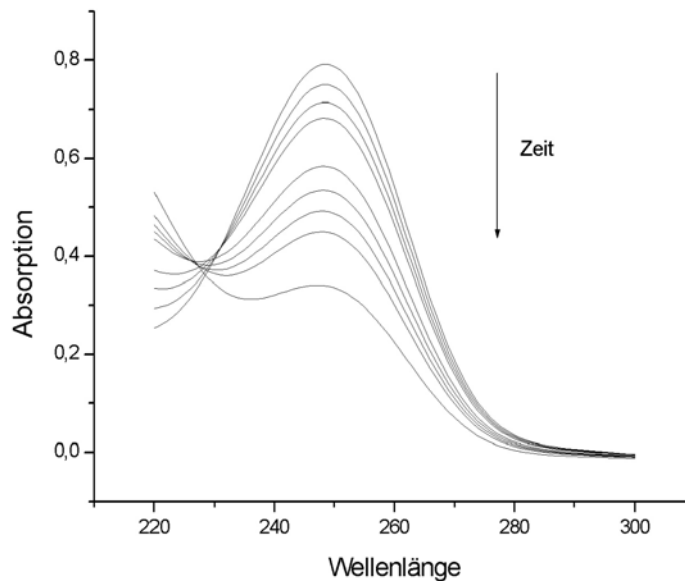


Abb. 29 Wellenlängen-Absorptions Spektrum des PIPER/NO in Phosphatpuffer 7.4, 37°C in Abhängigkeit von der Zeit

Wenn die Absorptionsabnahme logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen wird, erhält man eine Gerade, was zum einen eine Zerfallskinetik 1. Ordnung belegt, zum anderen das Berechnen der Zerfallshalbwertszeit  $t_{1/2}$  nach der Formel  $t_{1/2} = \ln 2/k$  ermöglicht (siehe Veröffentlichung 2, Fig. 4). Die Zerfallskonstante  $k$  ist dabei die Steigung der Geraden nach linearer Regressionsanalyse. Dieser indirekte NO-Nachweis eignet sich vor allem, um die Beständigkeit des NONOates in einem bestimmten Medium zu untersuchen und Struktur-Freisetzungs Beziehungen der jeweiligen Diazeniumdiolate miteinander vergleichen zu können.

Als direkte NO-Nachweismethode aus NONOaten wurde die amperometrische Detektion in einer speziellen NO-Freisetzungszelle verwendet (siehe Kapitel 1.3.5). Da das NO direkt nachgewiesen wird und nicht die  $[N(O)NO]^-$ -Gruppe, wird für quantitative Untersuchungen vorteilhaft keine Referenzsubstanz benötigt, sondern die Eichung kann bequem durch Nitrit Reduktion erfolgen, wobei der gemessene Redoxstromfluss der NO Menge proportional ist. Abbildung 30 zeigt eine typische Eichkalibrierung der NO-Sonde.

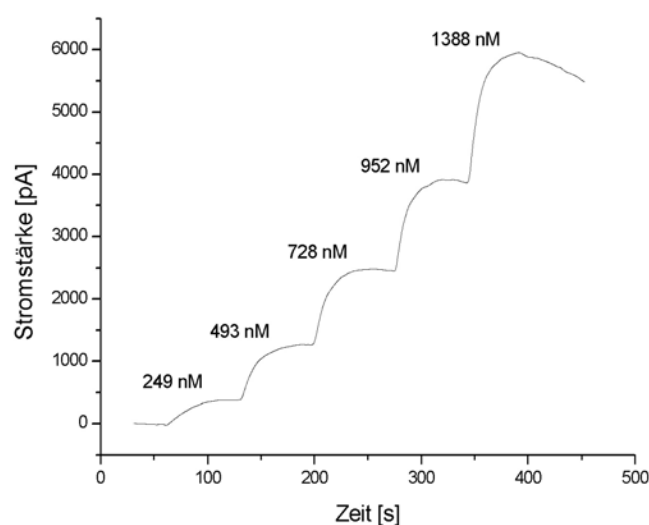


Abb. 30 Gemessene Redoxstromstärke einer zunehmend höher konzentrierten NO-Lösung (durch Reduktion von Nitrit)

Die in Veröffentlichung 2 dargestellten Redoxstromflüsse lassen sich somit quantifizieren, vorausgesetzt man verwendet die Eichgerade des jeweiligen Messtages. Als Geschwindigkeitsmerkmal ist die Zeit bis zum Redoxstromfluss-Maximum der zu verwendende Parameter. Ab dem Maximum fällt der Kurvenverlauf wieder ab, was natürlich mit der geringer werdenden NO-Freisetzung zu tun hat, jedoch durch die Repolarisation der Elektrode erheblich gestört wird. Die Repolarisation der Elektrode dauert in etwa zehn Minuten und äußert sich durch eine kontinuierliche Abnahme des "gemessenen Stromflusses", obwohl sich in der Lösung kein NO mehr befindet. Die Halbwertszeit der NO-Freisetzung lässt sich somit nicht über die AUC (area under the curve) bestimmen, da das Integral der Kurve nicht ausschließlich den gemessenen Redoxstrom darstellt, sondern auch die Repolarisation der Elektrode. Als nachteilig hat sich auch die geringe Robustheit dieser Methode herausgestellt. Die Reproduzierbarkeit ist zwar sehr hoch, jedoch ist sehr darauf zu achten, dass alle Parameter wie z.B. die channel range, das Hintergrundsignal der Elektrode, sowie äußere Umstände möglichst gleich sind, um eine gleichbleibende Empfindlichkeit zu gewährleisten.

### 5.2.3 Zusammenhang zwischen Aminstruktur, NONOat-Bildung und NO-Freisetzung

Die in Veröffentlichung 2 präsentierten Ergebnisse verdeutlichen, dass sterische Hinderung in direkter Nachbarschaft zum Stickstoff desamins, sowie elektronenziehende Substituenten die Reaktivität mit NO verringern. Während nur ein sterisch anspruchsvoller Rest die Reaktion ein wenig verlangsamt, bewirkt ein zweiter, wie es z.B. beim Diisopropylamin oder Dicyclohexylamin der Fall ist, praktisch das Scheitern der Synthese unter diesen Bedingungen. Die immense Bedeutung der Zugänglichkeit des N-Atoms für das NO lässt sich besonders am Vergleich der Umsatzraten der zyklischen mit den aliphatischen Aminen beobachten. Die NONOat-Bildung verläuft bei allen

untersuchten konformativ rigidisierten Aminen um ein vielfaches schneller und vollständiger im Vergleich zu den aliphatischen Aminen, wie z.B. Diethylamin oder Dipropylamin. Einen sehr viel geringeren Einfluss auf die Bildungsgeschwindigkeit haben elektronenziehende Heteroatome, die die Nucleophilie des Stickstoffs verringern, sofern mindestens eine Methylengruppe diese vom Aminstickstoff trennt. Ein Rest, der eine weitere Aminfunktion beinhaltet, wie z.B. das primäre Amin in N-[(2-Aminoethyl)amino]ethanol, kann die Umsatzrate auch erhöhen. Die bereits diskutierte Bildung des intramolekularen NONOat Salzes dieser Verbindung als Verunreinigung ist unabhängiger von der Anwesenheit einer Base und verursacht somit die erhöhte Umsatzrate des NO. Abbildung 31 zeigt die NO-Freisetzungsgeschwindigkeit von 22 Diazeniumdiolaten aus Veröffentlichung 2, aufgetragen gegen den NO-Druckabfall bei der Bildung der gleichen Diazeniumdiolate, was als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit gilt.

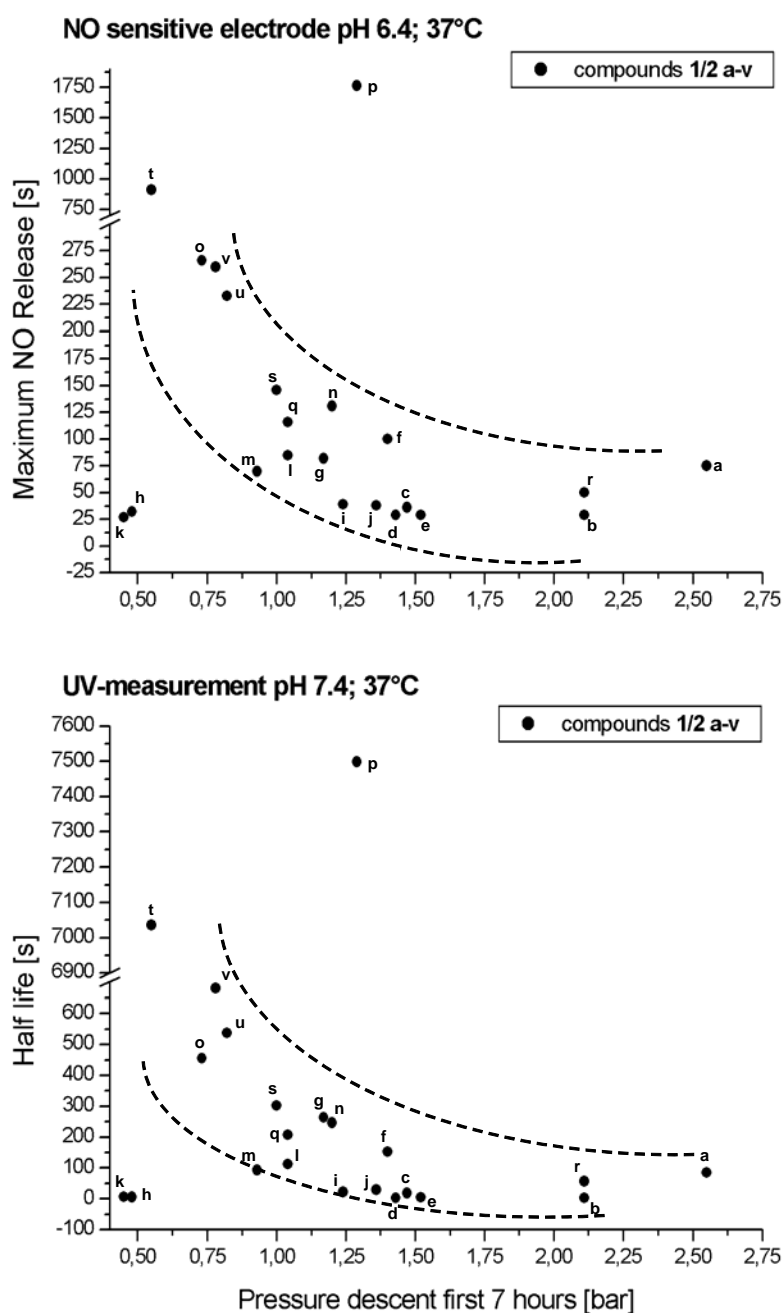


Abb. 31

Zusammenhang zwischen NONOat-Bildungsgeschwindigkeit und NO-Freisetzung. Oben: NO-Freisetzung gemessen mit einer NO-Sonde. Unten: NO-Freisetzung gemessen mit einem UV-Spektrometer. Legende für Buchstaben in Veröffentlichung 2

Der Einfluss der Aminstruktur auf die NO-Freisetzung ist in einigen Fällen weniger gut nachvollziehbar als bei der Bildungsgeschwindigkeit. Allgemein gilt: NONOate die sich langsam bilden, setzen auch vergleichsweise langsam NO frei. In Kapitel 1.2.5 wurde bereits erwähnt, dass der säurekatalysierte Zerfall der NONOate anhand von Computersimulationen wahrscheinlich durch Protonierung am  $[N(O)NO]^-$  bindenden Aminstickstoff stattfindet, und nicht wie bisher angenommen am  $O^2$ -Atom der NONOat-Gruppe.<sup>[73,105]</sup> Diese Annahme ist eine Erklärung für die in Veröffentlichung 2 beschriebene Strukturabhängigkeit des NONOat-Zerfalls. Somit ist vor allem die räumliche Abschirmung des Aminstickstoffs ausschlaggebend für die Geschwindigkeit der NO-Freisetzung. Diese Hypothese erklärt allerdings nicht, weshalb Oligoamin-NONOate wie das DETA/NO oder die in Veröffentlichung 2 erwähnte Verbindung **2p** (1-[N-(2-Ammonioethyl)-2-hydroxyethylamino]diazen-1-ium-1,2-diolat) eine so langsame NO-Freisetzung zeigen. Abbildung 32 verdeutlicht, wie die räumliche Anordnung der Seitenkette bei intramolekularen Oligoamin-NONOat Salzen den  $[N(O)NO]^-$  bindenden Aminstickstoff entschirmen könnten. Es ist zwar denkbar, dass die Stabilisierung der NONOat-Gruppe den Zerfall dieser Verbindungen verlangsamt, jedoch bleibt diese Diskussion offen.

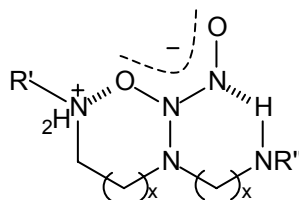


Abb. 32 Mögliche Entschirmung des Aminstickstoffs und gleichzeitige Stabilisierung der NONOat-Gruppe durch Verzweigungen der Seitenkette in intramolekularen NONOat Salzen

Die ebenfalls von der allgemeinen Regel abweichenden schnell freisetzenden aber langsam entstehenden Diazeniumdiolate **2h** und **2k** verfügen beide über eine Carboxylatgruppe in  $\alpha$ -Position zum Aminstickstoff, der das NONOat bindet. Eine mögliche Erklärung für die Beschleunigung der NO-Freisetzung durch diesen Substituenten ist, dass die sonst Z-ständige  $[N(O)NO]^-$  Gruppe in die sehr viel instabilere E-Konfiguration gezwängt wird. Dies könnte auch der Grund für die ausgeprägte Hygroskopie dieser NONOate sein.

Das identische NO-Freisetzungsprofil des PHEPIPERAZI/NO (Phenylpiperazin-NONOat) und dem Ketoconazol-NONOat verdeutlicht, dass nicht die Gesamtstruktur, sondern lediglich der  $[N(O)NO]^-$  bindende Molekülteil das Freisetzungsverhalten bestimmt (Veröffentlichung 3, dort Supporting Information).

### 5.3 Identitäts- und Reinheitsuntersuchungen der Diazen-1-ium-1,2-diolat-Prodrugs und Ketoconazol-Hybridverbindungen

An dieser Stelle sollen exemplarisch die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren eines Diazeniumdiolat-Prodrugs, dem Et-BUPIPERAZI/NO aus Veröffentlichung 5 und der aktivsten Verbindung aus Veröffentlichung 3, der Ketoconazol-Nitratopivalinsäure Hybridverbindung, dargestellt und diskutiert werden.

#### 5.3.1 Et-BUPIPERAZI/NO

Dieses Diazeniumdiolat-Prodrug wurde in erster Linie an einem *in vitro* Modell der Bluthirnschranke, sowie *in vivo* an Ratten getestet, bei denen künstlich durch Photothrombose ein Hirninfarkt induziert wurde (siehe Veröffentlichung 5, Kapitel 4.2.2). In Abbildung 33 und 34 sind die  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren des Et-BUPIPERAZI/NO mit der entsprechenden Signalzuordnung abgebildet.

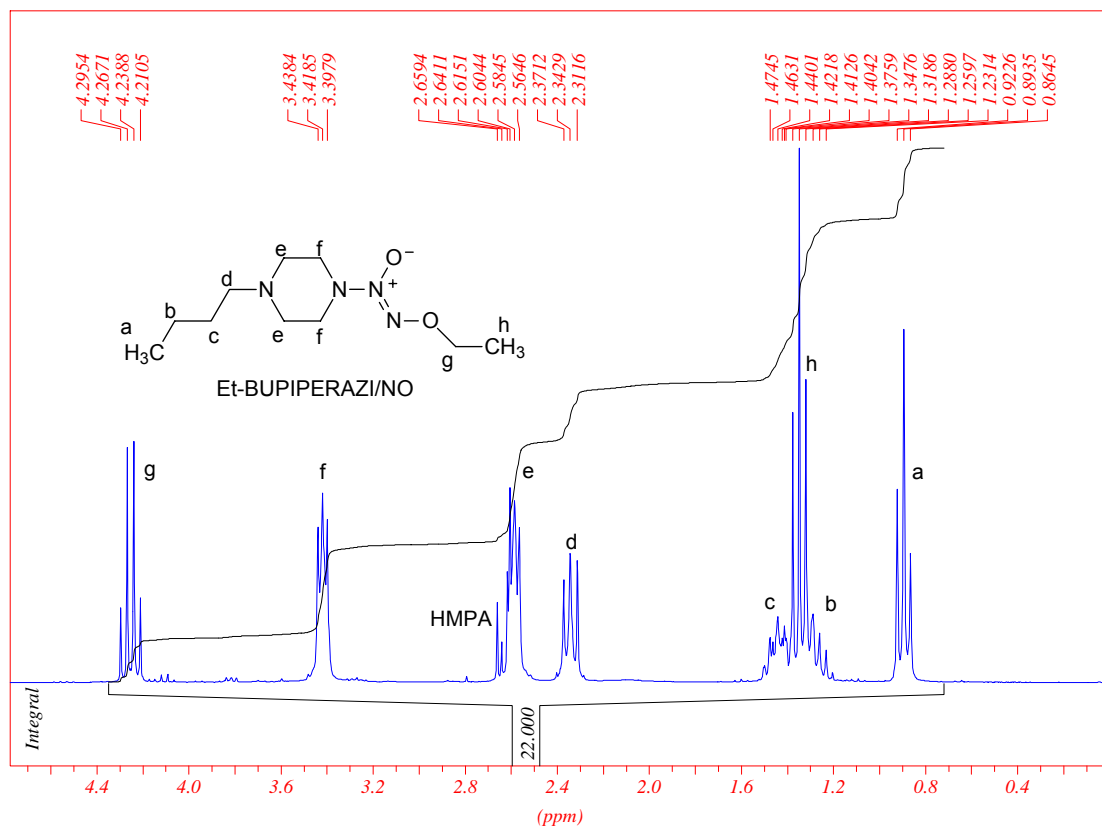


Abb. 33  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum von Et-BUPIPERAZI/NO aufgenommen in  $\text{CDCl}_3$



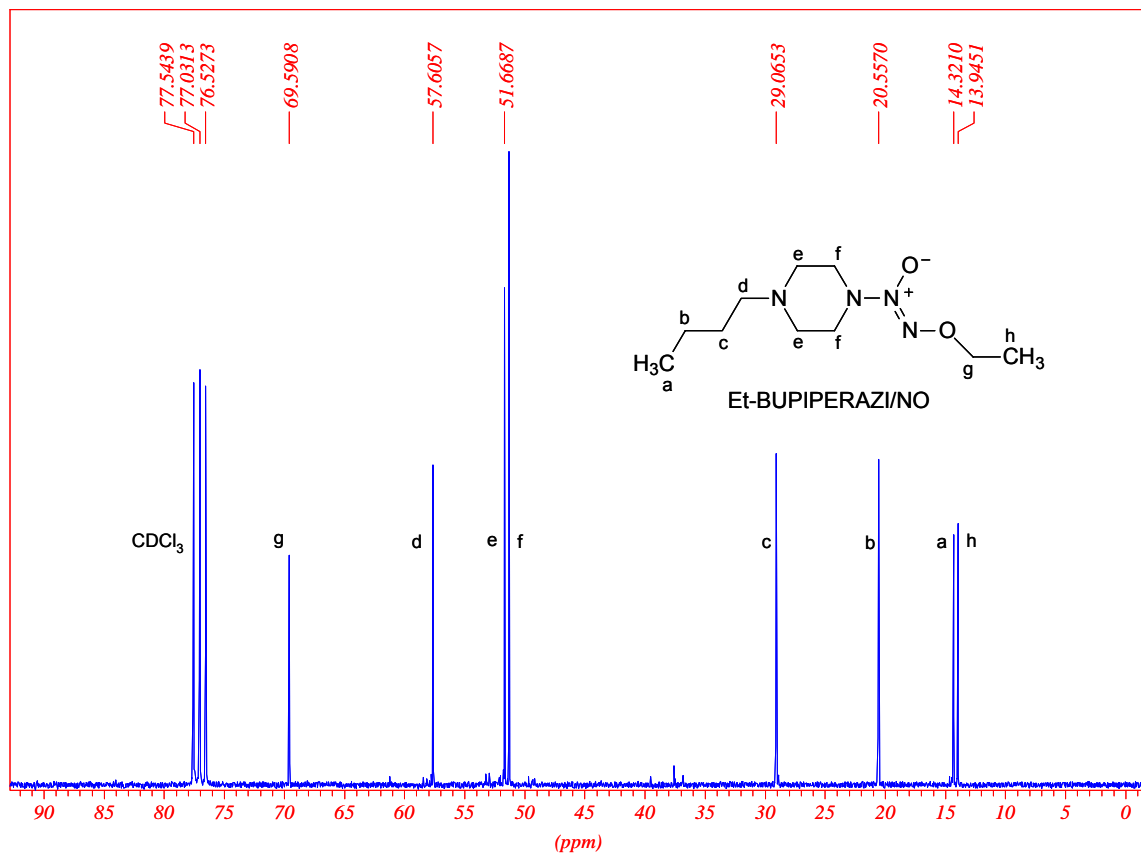


Abb. 34  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrum vom Et-BUPIPERAZI/NO aufgenommen in  $\text{CDCl}_3$

Das wichtigste Identitätskriterium des NONOates ist das Signal im  $^1\text{H}$ -NMR Spektrum bei 3.41 ppm (Signalzuordnung f). Würde es sich statt des NONOates um das alkylierte Piperazin Derivat handeln, so würde sich dieses Signal weiter Hochfeld, etwa bei 2.6 ppm befinden.

### 5.3.2 Ketoconazol-Nitratopivalinsäure Hybridverbindung

Diese Verbindung wurde als "Vergleichs NO-Donor" zu den Diazoniumdiolat-Ketoconazol Derivaten synthetisiert und hinsichtlich antimikrobieller Eigenschaften untersucht (Veröffentlichung 3). In Abbildung 35 sind die  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren des Ketoconazol-Nitratopivalinsäure Hybrids (rot) und zum Vergleich das der Phenylpiperazin-Nitratopivalinsäure Verbindung (blau) übereinandergelegt.

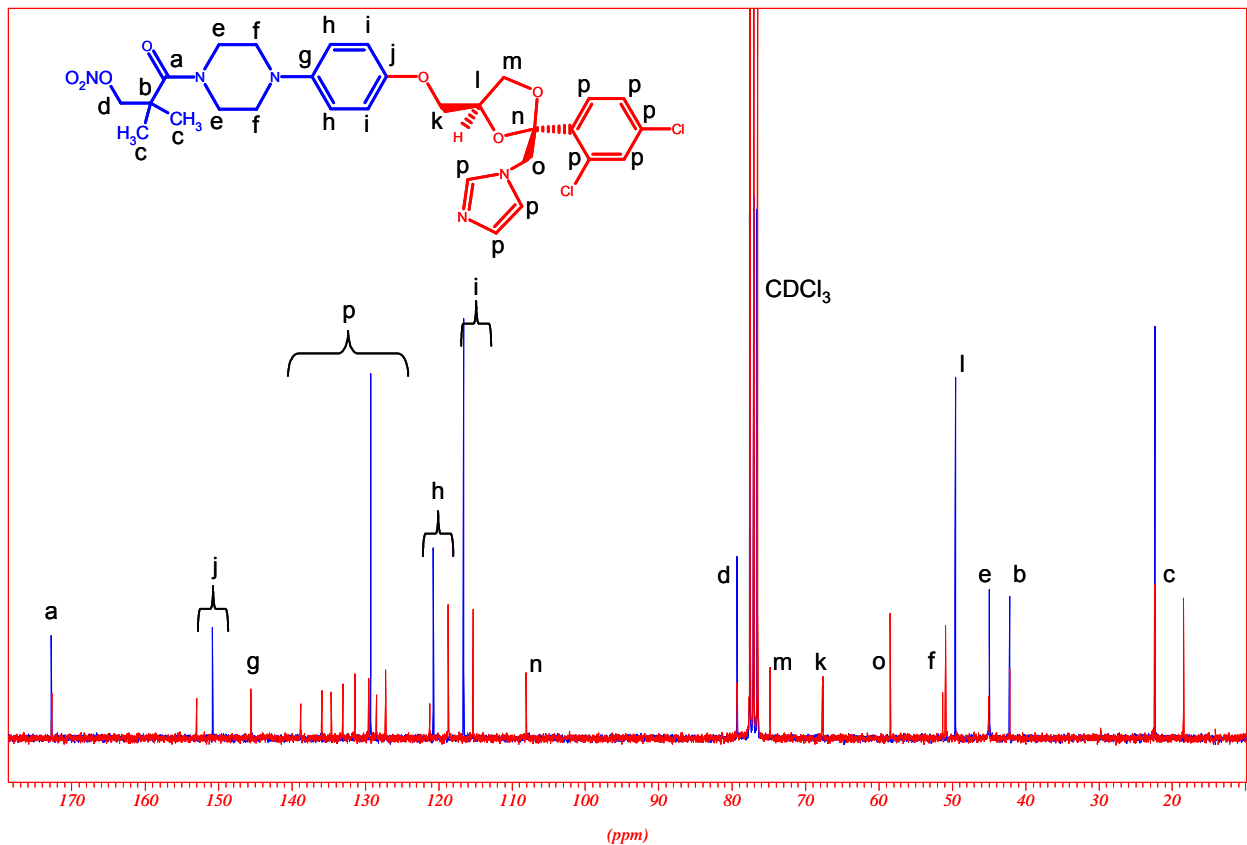


Abb. 35 Überlagerte  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren der Ketoconazol-Nitratopivalinsäure Hybridverbindung (rot) und des entsprechenden Phenylpiperazin Analogen (blau) aufgenommen in  $\text{CDCl}_3$

Während die Identität des Phenylpiperazin-Nitratopivalinsäure Derivats schon anhand des  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrums festgestellt werden kann, ist es aufgrund der Komplexität der analogen Ketoconazol-Derivate sinnvoll, zusätzlich FAB-MS Daten mit einzubeziehen. Die geeignete Methode um die Reinheit aller synthetisierten Derivate festzustellen, ist die Elementaranalyse. Verfahren wie z.B. GC-MS, konnten aufgrund der Temperaturinstabilität oder des hohen Molekulargewichts vieler Derivate nicht etabliert werden.

#### 5.4 Antimikrobielle Eigenschaften der Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen: Diskussion möglicher Targets, Unterschiede im Wirkspektrum und Ursachen des Synergismus

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 erwähnt, sind die biologischen Effekte des  $\text{NO}^\bullet$  als die Summe eines multifaktoriellen Geschehens zu sehen, das sich aus  $\text{NO}$  und seinen Folgeprodukten wie z.B. Peroxynitrit, S-Nitrosothiolen, Stickstoffdioxid oder Distickstofftrioxid ergibt. Die in Kapitel 1.1.2 dargestellte physiologische Funktion des  $\text{NO}^\bullet$  im Immunsystem, wie z.B. die Aktivierung von Zytokinen und Lymphozyten, spielen bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten antimikrobiellen

Untersuchungen *in vitro* keine Rolle. Die direkte Wirkung des NO und anderer RNS auf Mikroorganismen sowie potentielle zelluläre Targets soll deswegen folgend im Vordergrund stehen.

#### 5.4.1 Mikrobielle zelluläre Targets für NO und andere RNS

Ein wichtiges direktes Angriffsziel der RNS in Mikroorganismen sind die Nucleinsäuren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass durch NO-Donoren die DNA vieler Bakterienstämme *in vitro* desaminiert wird. So werden z.B. die Nucleotide des Cytosin zu Uracil und des Guanin zu Xanthin desaminiert. Als Mechanismus wird angenommen, dass das Amin durch  $N_2O_3$  erst N-nitrosyliert und anschließend hydrolysiert wird.<sup>[106]</sup> Ebenso sind Peroxynitrit und Stickstoffdioxid in der Lage Nucleinsäuren zu oxidieren. Die so entstehenden DNA Schäden, wie z.B. Strangbrüche, werden insbesondere durch die Oxidation von Guanidin, bzw. genauer des entsprechenden Guanosin-Nucleotids, zu 8-Oxo-7,8-dihydro-guanidin verursacht.<sup>[107]</sup>

Die Interaktionen der RNS mit Proteinen und Kofaktoren ist um einiges vielfältiger als auf DNA Ebene. So sind zum einen direkte Reaktionen mit Thiolen, Aminen, aromatischen Aminosäuren, Häm-Gruppen oder Eisen-Schwefel-Cluster möglich, zum anderen auch unspezifische Oxidationen an Eiweißen durch  $ONOO^-$  und  $NO_2$ . Unter physiologischen Bedingungen wird die Bildung von Nitrosothiolen der von Nitrosaminen bevorzugt. Ebenso ist die Modifikation in Form von Thiol-Gruppen Oxidation zu Disulfiden eine häufig stattfindende Reaktion. Die Nitrierung aromatischer Aminosäuren, z.B. von Tyrosin, kann direkt oder durch das Unterbinden von Phosphorylierungsreaktionen die Proteinfunktion modifizieren. Die Inaktivierung von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Enzymen (Fe-S-Cluster) kann zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Stoffwechsels im Mikroorganismus führen. Beispielhaft ist die Aconitase ein solch Fe-S-Cluster-haltiges Enzym, das Citrat im Citrat- und im Glyoxylatzyklus zu Isocitrat umsetzt.<sup>[108]</sup> Dieser gehemmte Abbau organischen Materials ist gerade bei Pilzen eine mögliche Erklärung für die antimykotische Aktivität des NO.

Die in Kapitel 1.1.2 ausführlich besprochenen Reaktionen der RNS mit Lipiden stellen natürlich auch einen möglichen Mechanismus der mikrobiellen Schädigung dar. Die Lipide sind, neben Chitin und Hemicellulosen, ein weiterer Hauptbestandteil der Zellwände bei Pilzen. Die Lipidperoxidation wird dabei überwiegend durch Peroxynitrit und Stickstoffdioxid verursacht.

#### 5.4.2 Mögliche Ursachen der Unterschiede im Wirkspektrum und des Synergismus

Das NO und die sich daraus ableitenden RNS sind nicht als "magic bullets" gegen jede Art von Mikroorganismen zu sehen. So wurde in der Literatur bereits beschrieben, dass NO selbst gegen *Escherichia coli* kaum antibakterielle Wirkung entfaltet, was sich aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Testungen bestätigen lässt (siehe Veröffentlichung 3).<sup>[109]</sup> In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression der durch das Stress Regulon OxyR regulierten Gene eine Reihe von enttoxifizierenden Enzymen hervorbringt. Als Beispiel sei die Glutathion-Reduktase genannt, die intrazellulär vorhandenes S-Nitrosoglutathion abbaut. Ein Abwehrmechanismus von

Mikroorganismen gegen RNS verursachte Modifikationen an Nukleinsäuren sind z.B. die Reparatursysteme der DNA. Sehr viel artspezifischer, und somit eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Wirksamkeit der von uns getesteten NO-Donoren gegen das breite Spektrum an Mikroorganismen, ist die Expression der Superoxid Dismutase (SOD). Die SOD katalysiert die Disproportionierung des Superoxidanion-Radikals ( $\text{O}_2^-$ ) zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Das Fehlen von  $\text{O}_2^-$  als potentiellen Reaktionspartner für NO verhindert die Bildung des hochreaktiven Peroxynitrits und somit einer wichtigen RNS für mögliche Zellmodifikationen. Ebenso artspezifisch ist die Möglichkeit Radikal-scavenger bereitzustellen, die in der Lage sind, die RNS zu entgiften. In diesem Zusammenhang wird in der Literatur häufig das Glutathion (GSH) erwähnt.<sup>[110,111]</sup> Der ohnehin schon komplexe Stoffwechsel des GSH ist, als Reaktionspartner für NO, in erster Linie abhängig von der Konzentration aller Reaktionspartner und der Anwesenheit anderer Thiole oder Sauerstoff. Außerdem konnte schon gezeigt werden, dass spezialisierte Permeasen im Stande sind, S-Nitroso-GSH gezielt sowohl in die Zelle ein- wie auch auszuschleusen.<sup>[112]</sup> Ein weiterer bedeutender NO-scavenger ist das Homocystein (HC). Die oben erwähnten zellulären Targets und die defensiven Mechanismen der Mikroorganismen gegen die RNS sind in Abbildung 36 zusammengefasst.

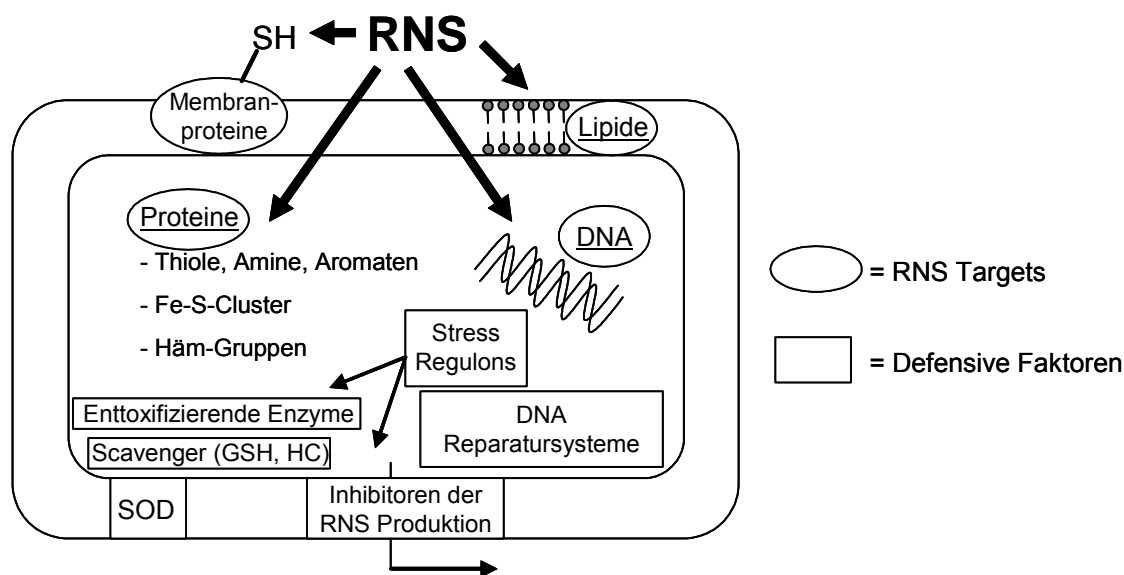


Abb. 36 Zelluläre Angriffspunkte der RNS und unterschiedliche Abwehrmechanismen

Es ist wahrscheinlich, dass einige der diskutierten Abwehrmechanismen gegen die RNS bei einigen Pilz- oder Bakterienarten unterentwickelt oder gar nicht vorhanden sind. Diese Theorie würde die in Veröffentlichung 3 beschriebene, äußerst hohe Empfindlichkeit der drei *Aspegillus* Stämme und des *Fusarium oxysporum* Stamms gegenüber der Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen erklären.

Die synergistischen Effekte von Ketoconazol und NO lassen sich ebenfalls nicht quantitativ in einer definierten Pharmakodynamik begründen. In der Literatur wird berichtet, dass die Diazoniumdiolate DPTA/NO und DETA/NO in fixer Kombination mit Ketoconazol, Amphotericin B oder Terbinafin *in vitro* nicht immer gleich effektiv sind.<sup>[113]</sup> Es könnte ein Synergismus für die Kombination der NO-Donoren mit Ketoconazol und Amphotericin B, weniger aber für die Kombination mit

Terbinafin nachgewiesen werden. Ein Grund könnte sein, dass der Synergismus nur zustande kommt, wenn der NO-Donor durch die veränderte Zellpermeabilität leichter und somit in höheren Konzentrationen in die Pilzzelle gelangt. Im Gegensatz zu den beiden anderen Antimykotika ist der zellmembrandestabilisierende Effekt des Terbinafin nicht bedingt durch den Einbau strukturell falscher Sterole, sondern mehr durch die Squalen-Epoxidase Hemmung verursachten Überschuss an Squalen gegenüber Ergosterol.<sup>[93]</sup> Dieser Theorie nach ist die synergistische Wirkung in erster Linie abhängig von der intrazellulären NO-Konzentration, sei es durch erhöhte Zellpermeabilität oder durch aktive Transportvorgänge. Die um ein Vielfaches höhere synergistische Wirkung der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen lässt sich dadurch erklären, dass durch die chemisch stabile Verbindung der beiden Wirkprinzipien das NO nur in Kombination mit dem Ketoconazol in die Pilzzelle gelangt. Dort erfolgt der NO-freisetzende Metabolismus und führt folglich zu einer höheren intrazellulären NO Konzentration als bei fixer Kombination von Ketoconazol und NO-Donor. Versucht man den Grund des Synergismus zu erörtern, ist es auch durchaus denkbar, dass die Anbindung des Azol-Antimykotikums an die Cyt-P450 abhängige 14- $\alpha$ -Demethylase (siehe Kapitel 1.4.2) durch das NO verstärkt wird. Wie schon erwähnt, bindet der Azol-Rest des Ketoconazol an das Häm-Eisen der Cyt-P450, wodurch die 14- $\alpha$ -Demethylase gehemmt wird. Die hohe Affinität des NO an Häm-Eisen zu binden könnte denselben oder sogar verstärkt hemmenden Effekt haben.

Für das Zutreffen der oben genannten Hypothesen sprechen einige Daten aus Veröffentlichung 3. Der relativ geringe Synergismus der direkt und spontan NO-freisetzenden Ketoconazol-Diazoniumdiolat Hybridverbindung lässt sich dadurch begründen, dass das NO bereits freigesetzt wird bevor die Verbindung in die Zelle gelangen kann. Die Stabilisierung der NONOat-Gruppe durch die Umsetzung zum Prodrug, durch Anbinden des Ethyl- oder Methoxymethylen-Restes, bewirkt die für synergistische Effekte ausschlaggebende höhere intrazelluläre NO-Konzentrationen und somit vielfach größere antimykotische Aktivität dieser Derivate.

## **5.5 Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen Diazen-1-ium-1,2-diolaten und ihren biologischen Effekten**

### **5.5.1 Vasodilatorische Effekte**

Eine genaue Struktur-Wirkungsbeziehung der Diazoniumdiolate in Hinblick auf eine Ligand-Rezeptor Interaktion ist bezüglich vasodilatorischer Effekte nicht möglich, da man davon ausgehen kann, dass ausschließlich das NO die lösliche Guanylatcyclase aktiviert und nicht die untersuchten NONOate oder NONOat-Prodrugs selbst. Andere Angriffspunkte als die sGC für NO und der resultierenden RNS spielen, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle. Ausschlaggebend ist somit nur die in Veröffentlichung 4 und Kapitel 4.2.1 diskutierte NO-Freisetzungs kinetik. Die relativ hohe Konzentration des Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO, die benötigt wird um den halbmaximalen Effekt an den isolierten Gefäßringen auszulösen, lässt sich dadurch begründen, dass die Metabolisierung des Prodrugs zum freien NONOat den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

### 5.5.2 Einfluss auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke

Um den Einfluss der untersuchten NO-Donoren auf die Bluthirnschranke diskutieren zu können, sollen der Übersicht wegen folgende Ergebnisse und Informationen aus Veröffentlichung 5 zusammengefasst werden:

1. Die direkten (also spontan in Lösung freisetzenden) NO-Donoren "verdichten" die Bluthirnschranke (blood-brain-barrier; BBB). Methylenblau (MB) blockiert diesen Effekt, wodurch die BBB wieder permeabler wird.
2. Die NONOat-Prodrugs erhöhen die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke und dieser Effekt wird durch MB nicht blockiert.
3. MB ist nur in einem geringen Maße intrazellulär verfügbar, verhindert die cGMP-Bildung der Guanylatcyclase und kann ebenfalls als scavenger NO abfangen.<sup>[114,115]</sup>

Geht man davon aus, dass NO die BBB für den Marker Carboxyfluorescein weniger permeabel macht, lässt sich folgende Erklärung für die unterschiedliche Wirkung der NONOate und der NONOat-Prodrugs aufstellen. Die direkt NO-freisetzenden NONOate setzen unmittelbar nach ihrer Applikation NO in das Medium frei, wobei ein eher geringer Teil tatsächlich in die Zellen eindringt. Durch die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase wird eine biochemische Kaskade in Gang gesetzt, die dann die Zellen weniger permeabel macht. MB blockiert diesen Effekt, da ein Teil des NO schon im Medium abgefangen wird, der intrazellulär verfügbare NO-Gehalt dann aber nicht ausreicht, um für das MB an der Guanylatcyclase eine Konkurrenz darstellen zu können. Es ist bereits bekannt, dass zwischen dem Actin im Zytosklett eukaryotischer Zellen und cGMP-abhängigen Proteinkinasen ein Zusammenhang besteht.<sup>[116]</sup> Die Prodrugs wiederum müssen erst in die Zellen gelangen, um dort NO freisetzen zu können. Dies führt zu einer sehr viel höheren intrazellulären NO-Konzentration als bei den direkten NO-Donoren. Diese Konzentration könnte unter Umständen aufgrund der schon erwähnten oxidativen-, nitrierenden- oder nitrosylierenden Reaktionen schädigend für die Zellen sein. Das simple Absterben der Zellen verursacht dann die Erhöhung der BBB-Permeabilität, was auch unabhängig von einer MB-Zugabe geschieht.

### 5.5.3 Neuroregenerative Eigenschaften und Verringerung des Photothrombosevolumens

Die teilweise spekulativen Interpretationen über genaue Wirkmechanismen des NO<sup>•</sup> finden bei der Diskussion möglicher Zielstrukturen im ZNS ihre Fortsetzung. Zum Beispiel findet man Studien, in denen ein klarer Zusammenhang zwischen neuronaler Zytotoxizität und erhöhter NMDA-Rezeptor Aktivität beschrieben wird. Diese NMDA-Rezeptor vermittelte Neurotoxizität lässt sich durch NOS Inhibitoren, wie N-Monomethyl-L-arginin, verringern, bei nNOS knockout Mäusen verschwindet sie sogar fast völlig.<sup>[117,118]</sup> Inwiefern NO direkt den NMDA-Rezeptor moduliert oder eventuell früher in die Reaktionskaskade eingreift, z.B. durch Vermittlung der Glutamat-Freisetzung, ist unklar. Im

Gegensatz dazu konnte in einem *in vitro* Modell die durch NMDA ausgelöste Neurotoxizität durch Zugabe verschiedenartiger NO-Donoren signifikant verringert werden.<sup>[119]</sup> Für das Diazeniumdiolat DETA/NO konnte bereits festgestellt werden, dass nach intravenöser Applikation an Mäusen, die neuronale Zellproliferation im Gyrus dentatus signifikant zunimmt.<sup>[120]</sup> Bei dieser *in vivo* Studie wurden neben den histologischen Befunden ebenfalls erhöhte kortikale cGMP-Spiegel und die Amplifikation des Ca<sup>2+</sup>-Signals durch NMDA-Rezeptor Stimulation festgestellt. Es ist natürlich möglich, dass nicht diese biochemischen Prozesse, sondern andere für die NO-induzierte Neuroneogenese verantwortlich sind. Für das cGMP findet man jedoch häufig Berichte über Zusammenhänge zwischen dem cGMP-Spiegel und essentiellen Neurogenese Aktivitäten, wie z.B. Axonstreckung und Axonkontraktion.<sup>[121,27]</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten und im Kapitel 4.2.2 beschriebenen *in vivo* Untersuchungen konnten die neuroregenerativen Eigenschaften des Diazeniumdiolats DETA/NO bestätigen. Das für diese Studie neu entwickelte Diazeniumdiolat-Prodrug Et-BUPIPERAZI/NO zeigte diesbezüglich jedoch eine höhere Aktivität. Die Gründe für dieses Ergebnis könnten in der höheren Bioverfügbarkeit des Prodrugs liegen, sei es durch erleichterte Passage der Bluthirnschranke oder der größeren Stabilität des NO-Donors im Blut. Da die Ergebnisse dieser Studie noch nicht vollständig vorliegen, insbesondere die der phänotypischen Bestimmung der proliferierten Zellen, ist eine genauere Diskussion über mögliche neurobiochemische Prozesse nicht möglich.

## 6. Zusammenfassung

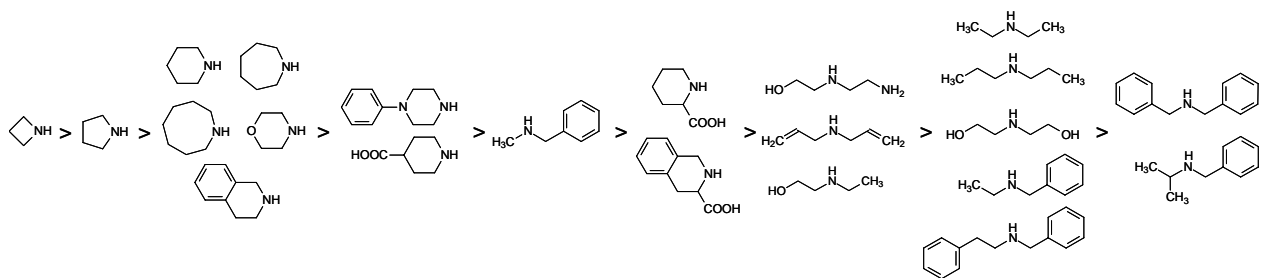
Entsprechend der Gliederung in Kapitel 1.5 seien die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefasst.

### 6.1 Chemische Aspekte

Anhand der durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Diazeniumdiolaten durch die *NOtizer*<sup>®</sup> Apparatur hinsichtlich Reaktionszeit, Reinheit und Ausbeute der Produkte eine Verbesserung darstellt. Die Reaktionsendpunkte sind, abhängig von eingesetztem Amin und den Reaktionsbedingungen, sehr unterschiedlich und lassen sich durch die Aufzeichnung des NO-Gasverbrauchs feststellen (Veröffentlichung 1).

1. Gibt es Zusammenhänge zwischen der Struktur des eingesetzten Amines und der Bildungsgeschwindigkeit des resultierenden NONOates?

Die 22 unterschiedlichen aliphatischen- und alizyklischen Amine, dargestellt in Veröffentlichung 2, wurden entsprechend dieser Fragestellung analysiert. Aus den Reaktionsdaten wird deutlich, dass sterisch anspruchsvolle Substituenten und Heteroatome in der Umgebung des sekundären Aminstickstoffs die Reaktion verlangsamen. Zyklische Amine mit sterisch entschirmtem Stickstoff reagieren besser als konformativ beweglichere aliphatische Amine, wobei Ringspannung die Reaktivität weiter steigert. Die abnehmende Reaktivität der untersuchten Amine gegenüber NO<sup>•</sup> lässt sich folgendermaßen zusammenfassen (Veröffentlichung 2):



2. Welche Abhängigkeiten bestehen zwischen der Bildungsgeschwindigkeit der NONOate und Parameter wie Reaktionstemperatur, NO-Druck, Lösungsmittel und Natur der zugesetzten Base?

Die Umsetzung der Amine mit NO<sup>•</sup> wurde in mehreren Beispielen als exotherme Reaktion erkannt und wird durch Kühlen des Reaktionsgemisches verlangsamt. Bei Temperaturen von 80°C bildet sich nicht nur das NONOat, sondern auch das korrespondierende Nitrosamin. Eine Erhöhung des Drucks, auch bei NO/Inertgas Mischungen, beschleunigt die NONOat-Bildung und erhöht die Ausbeute. Als ideales Lösungsmittel konnte Methanol für die Synthese von NONOat-Natriumsalzen und Acetonitril für intramolekulare NONOat-Ammoniumsalze bestätigt werden. Starke Basen, wie z.B. das Methanolat-



Anion, verschieben das Reaktionsgleichgewicht zugunsten des Produktes, die Natur des NONOat-Gegenions spielte bei den durchgeführten Experimenten keine Rolle (Kapitel 4.1.1 und Veröffentlichung 1).

3. *Welche Zusammenhänge gibt es zwischen Struktur des NONOates und der Freisetzungsgeschwindigkeit von Stickstoffmonoxid aus ihnen?*

Der Zusammenhang zwischen NONOat-Struktur und NO-Freisetzungsgeschwindigkeit (Veröffentlichung 2) ist im Vergleich zur Bildungsgeschwindigkeit weniger einheitlich. Allgemein lässt sich festhalten, dass sterisch anspruchsvolle Substituenten in direkter Umgebung des [N(O)NO]-Gruppe bindenden N-Atoms, sowie weitere protonierbare Amine im NONOat die NO-Freisetzung verlangsamen. Eine Ausnahme bilden benachbarte Carboxylat-Gruppen, welche den Zerfall des NONOates beschleunigen. Ebenso spielen außergewöhnlich ringgespannte Bindungswinkel am sekundären Amin für die Freisetzungsgeschwindigkeit eine entscheidende Rolle. So zeigte überraschend das sehr rasch zu synthetisierende Azetidin-NONOat von allen untersuchten zyklischen NONOaten die mit Abstand langsamste NO-Freisetzung. Die für diese Untersuchungen verwendete amperometrische Messmethode (direkter NO-Nachweis) konnte mit der UV-spektroskopischen Messmethode (indirekter Nachweis) verglichen und die Ergebnisse gegenseitig gesichert werden.

4. *Welche Zusammenhänge gibt es zwischen der Bildungsgeschwindigkeit von Diazeniumdiolaten und den NO-Freisetzungsprofilen aus ihnen?*

Trägt man die Daten aus der Bildungs- und Freisetzungsgeschwindigkeit der NONOate in einem Diagramm gegeneinander auf, so kann man allgemein festhalten, dass generell NONOate die sich langsam bilden, auch langsam NO freisetzen und umgekehrt (Veröffentlichung 2 und Kapitel 5.2.3).

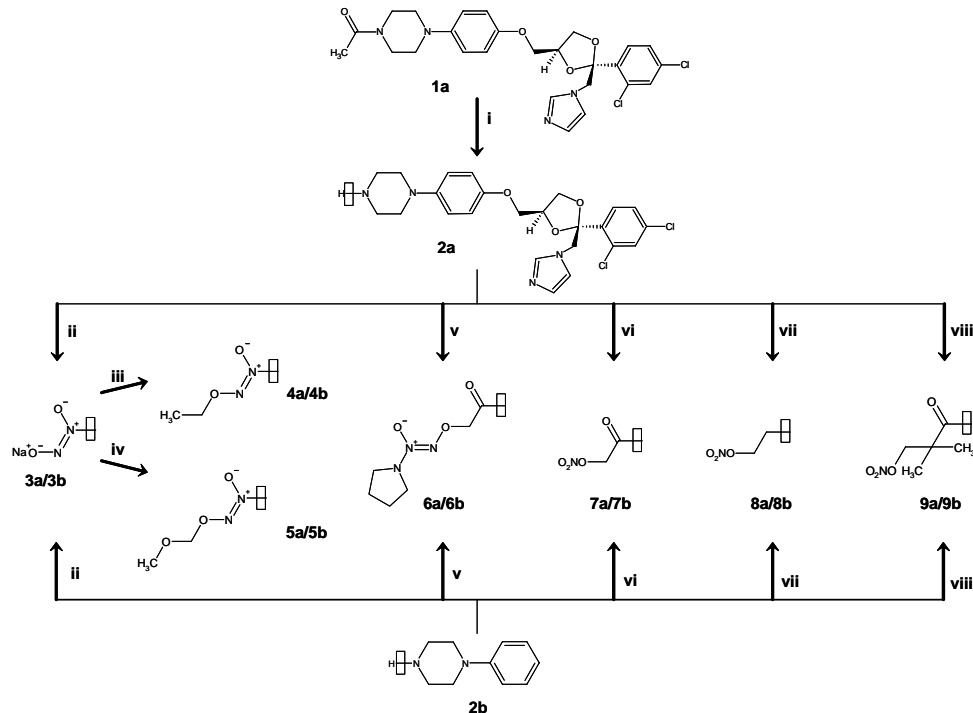
5. *Synthese von Diazeniumdiolat-Prodrugs.*

Die Alkylierung und Acylierung einiger NONOate zu NONOat-Prodrugs erfolgte durch Anpassung literaturbekannter Methoden an die speziellen Anforderungen des jeweiligen NONOates. Einige Methoden, wie z.B. die Synthese des Tosyl-PYRRO/NO (Kapitel 4.1.3) oder der Prodrugs in Veröffentlichung 3 und 5, wurden neu entwickelt.

6. *Synthese von Stickstoffmonoxid freisetzenden Hybridverbindungen.*

Neben dem spontan NO-freisetzenden Ketoconazol-NONOat **3a** wurden drei unterschiedlich bioaktivierbare Ketoconazol-NONOat-Prodrugs **4a**, **5a**, **6a** hergestellt. Besonderheit von **6a** ist, dass es als Pyrrolidin-basiertes "inverses NONOat-Prodrug", nach biologischer Aktivierung, eine andere und schnellere NO-Freisetzungskinetik aufweist, als die anderen durch Phenylpiperazin-basierten Ketoconazol-NONOat Prodrugs. Zusätzlich wurden Ketoconazol-Organonitrat Hybride **7a**, **8a**, **9a** hergestellt. Strukturelle Variationen am Organonitrat-Rest erfolgten, um mögliche Struktur-Wirkungs

Prinzipien erkennen zu lassen. Um auch die alleinige Ketoconazol-unabhängige NO-Wirkung und NO-Freisetzungskinetik zu charakterisieren, wurden alle oben erwähnten Derivatisierungen auch mit der Ketoconazolteilstruktur Phenylpiperazin (b-Reihe) durchgeführt (Veröffentlichung 3 und 6). Das folgende Schema fasst die oben genannten Derivatisierungen zusammen (1a = Ketoconazol):



## 6.2 Biologische Aspekte

### 7. Untersuchung der vasodilatatorischen Potenz von NONOaten und NONOat-Prodrugs an isolierten Pulmonalarterien des Schweins.

Die NONOate PHEPIPERAZI/NO, DPA/NO, ISONIPECO/NO zeigten an den isolierten Gefäßringen hohe Aktivität mit  $EC_{50}$ -Werten im nanomolaren Bereich und waren potenter als die Referenzsubstanz Glyceroltrinitrat (GTN). Die GTN-typische Tachyphylaxie blieb bei allen untersuchten NONOaten aus. Eine Präinkubation der Gefäßringe mit dem Inhibitor der löslichen Guanylatcyclase ODQ verschob die Konzentrations-Wirkungskurven nach rechts zu größeren  $EC_{50}$ -Werten. Die geringere Aktivität des NONOat-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO ist bioaktivierungsbedingt (Veröffentlichung 4, Kapitel 4.2.1).

### 8. Einfluss von NONOaten und NONOat-Prodrugs auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke in einem *in vitro* Modell mit kultivierten cerebralen Endothelzellen.

Drei direkt NO-freisetzende NONOate (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO) und drei NONOat-Prodrugs (Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO, Et-BUPIPERAZI/NO) wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke in einem *in vitro* Modell untersucht. Die Permeabilität der Markersubstanz Carboxyfluorescein wird durch die direkten NO-Donoren verringert,

während die Permeabilität nach Inkubation mit den NONOat-Prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO und Tosyl-PYRRO/NO zunimmt. Das Et-BUPIPERAZI/NO nimmt in Bezug auf die Veränderung der Durchlässigkeit der Bluthirnschranke eine Mittelstellung ein. Mit Methylenblau konnten die permeabilitätssenkenden Effekte blockiert werden, die permeabilitätssteigernden jedoch nicht (Veröffentlichung 5).

*9. In vivo Untersuchungen des Einflusses von NONOaten und NONOat-Prodrugs auf neuroregenerative Prozesse nach experimentell induzierten Hirninfarkten bei Ratten.*

Die bisher vorliegenden Ergebnisse ergaben, dass die Gabe des NONOat-Prodrugs Et-BUPIPERAZI/NO noch mehr als der direkte NO-Donor DETA/NO als Referenz, bei den Versuchstieren die Anzahl BrdU-positiver Zellen (Indikator für Proliferation) deutlich erhöht und das infarktbedingte Photothrombose-Volumen stärker verringert.

*10. Antimykotische und antibakterielle Wirkprofile verschiedener Ketoconazol-Diazeniumdiolat-Hybride und verwandter Strukturen.*

Die antimikrobielle Aktivität der Ketoconazol-NO-Donor Hybridverbindungen wurde an einem breiten Bakterien- und Pilzspektrum untersucht. Die Hemmung des Bakterienwachstums wies bei den untersuchten Derivaten nur geringe Unterschiede gegenüber Ketoconazol auf. Dagegen wurden für die Inhibition des Pilzwachstums deutliche Unterschiede festgestellt. Die Ketoconazol-Hybride mit Organonitrat- und Diazeniumdiolat-Prodrug-Gruppe zeigten eine höhere Aktivität und ein verändertes Wirkspektrum im Vergleich zu Ketoconazol. Eine entsprechende Patentschrift wurde eingereicht. Die NO-Donor Referenzsubstanzen ohne das gesamte Ketoconazol-Grundgerüst (b-Reihe) zeigten eine vergleichsweise geringe Inhibition des Pilz- und Bakterienwachstums (Veröffentlichung 3). Für das Ketoconazol-PYRRO/NO-Prodrug Hybrid konnten zusätzlich antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden (Veröffentlichung 6).

## 7. Conclusion

Nitrogen-bound diazen-1-ium-1,2-diolates (diazoniumdiolates, "NONOates", "solid NO") are generally prepared from secondary amines and nitric oxide (NO) and are compounds of first choice for a direct release of NO. A series of differently sized and substituted cyclic and aliphatic amines were used to quantify the reactivity towards NO by monitoring the decrease of NO pressure with the *NOtizer*<sup>®</sup>, an apparatus developed for this study. The release of NO was measured amperometrically with an NO sensitive electrode and the half-lives of novel diazeniumdiolates were determined via UV-spectroscopy. It was found that steric hindrance and heteroatomic substituents in the amines side chains decrease the formation rates of sodium salt NONOates and also slow down NO release from them. Exceptions were found to be piperidine-2-carboxylic acid derivatives which react to NONOates slower than piperidine, but released NO much faster despite steric hindrance. A secondary amine carrying an additional primary amine reacted fast with NO, but the corresponding NONOate showed to be a slow releaser due to formation of an intramolecular NONOate salt together with the sodium salt derivative. Azetidine reacts faster with NO than all of the other amines, but decomposition of the corresponding NONOate showed to be unexpectedly slow. The usefulness of the amperometric NO-detection (direct NO measurement) could be demonstrated in comparison to the UV-spectroscopic method (indirect measurement). In a series of different experiments it could be shown that the reaction of secondary amines with NO is exothermic and that external heating above 80 °C leads to the formation of the corresponding N-nitrosamine as a byproduct to the NONOate. The pressure dependence of the reaction was quantified by using mixtures of NO/inert-gas in the reaction with amines and plotting the decrease in pressure.

Novel nitric oxide donors and hybrid drugs combining the modified antifungal drug ketoconazole with a diazeniumdiolate or an organic nitrate moiety were synthesized and their activities against a broad variety of bacteria and fungal strains were tested. Whereas the efficacy of the compounds against bacteria showed little variation, the ketoconazole-NO-donor hybrid drugs differed in their effectiveness and susceptibility against fungi. The ketoconazole-NO-donor hybrids with an alkylated NONOate group or organic nitrate moiety showed to be much more effective than ketoconazole alone, especially against *Aspergillus* species, proving a change in the susceptibility spectrum. The NO-donors bound to phenylpiperazine alone, which is part of the ketoconazole structure, showed insufficient effectiveness.

The sodium salt NONOates PHEPIPERAZI/NO, DPA/NO and ISONIPECO/NO were measured *in vitro* on isolated porcine pulmonary arteries and showed nanomolar efficacies concerning vasodilatation. Also, tolerance-devoid activity for the tested compounds could be demonstrated and compared with glyceryl trinitrate and pentaerythrityl tetranitrate. The comparable lower activity of the NONOate prodrug Et-PHEPIPERAZI/NO was related to bioactivation processes.

Three direct NO releasing agents (PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO) and three NONOate prodrugs (Et-PHEPIPERAZI/NO, Tosyl-PYRRO/NO, Et-BUPIPERAZI/NO) were tested on their effect on the permeability of the blood-brain-barrier (BBB) in an *in vitro* model procedure. By measuring the

---

flux of a small polar molecule (carboxyfluorescein) it could be shown, that the releasers PHEPIPERAZI/NO, DBA/NO, DETA/NO reduced the BBB permeability. In contrast, the prodrugs Et-PHEPIPERAZI/NO and Tosyl-PYRRO/NO increased the permeability, whereas the prodrug Et-BUPIPERAZI/NO showed a medial setting. Blocking the effect of the BBB permeability reducing compounds could be done by methylene blue, whereas permeability increasing effects could not be blocked.

Neuroregenerative properties were tested for the NONOate prodrug Et-BUPIPERAZI/NO in comparison to the direct releaser DETA/NO on an *in vivo* model of rats after experimentally induced brain stroke. The prodrug showed to produce higher amounts of BrdU-positive cells (as an indicator for proliferation) than DETA/NO. Additionally, the stroke related volume of the thrombus was significantly reduced.

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] Davis, K. L.; Martin, E.; Turko, I. V.; Murad, F. Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2001**, 41, 203-236.
- [2] Wink, D. A.; Osawa, Y.; Darbyshire, J. F.; Jones, C. R.; Eshenaur, S. C.; Nims, R. W. Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1993**, 300 (1), 115-123.
- [3] Wang, P. G.; Cai, T. B.; Taniguchi, N. Nitric Oxide Donors For Pharmaceutical and Biological Applications. 1. Auflage **2005**, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN-13: 978-3-527-31015-9.
- [4] van der Vliet, A.; Eiserich, J. P.; Morrissey, B.; Cross, C. E. Reactive nitrogen species and tyrosine nitration in airway inflammation. *Lung Biology in Health and Disease* **2003**, 177, 101-121.
- [5] Wolin, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2000**, 20, 1430-1442.
- [6] Ohara, Y.; Peterson, T. E.; Harrison, D. G. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of Clinical Investigation* **1993**, 91, 2546-2551.
- [7] Heck, D. E. \*NO, RSNO, ONOO<sup>-</sup>, NO<sup>+</sup>, \*NOO, NO<sub>x</sub>--dynamic regulation of oxidant scavenging, nitric oxide stores, and cyclic GMP-independent cell signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **2001**, 3 (2), 249-260.
- [8] Stamler, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **1994**, 78(6), 931-936.
- [9] Fukuto, J. M.; Bartberger, M. D.; Dutton, A. S.; Paolocci, N.; Wink, D. A.; Houk, K. N. The physiological chemistry and biological activity of nitroxyl (HNO): The neglected, misunderstood and enigmatic nitrogen oxide. *Chemical Research in Toxicology* **2005**, 18 (5), 790-801.
- [10] Bloodsworth, A.; O'Donnell, V. B.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme - mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* **2000**, 20 (7), 1707-1715.
- [11] Tsai, A. L. How does NO activate heme-proteins? *FEBS Letters*. **1994**, 341, 141-145.

- 
- [12] Denninger, J. W.; Marletta, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1411, 334-350.
- [13] Cornwell, T. L.; Pryzwansky, K. B.; Wyatt, T. A.; Lincoln, T. M. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* **1991**, 40 (6), 923-931.
- [14] Reinhard, M.; Halbrugge, M.; Scheer, U.; Wiegand, C.; Jockusch, B. M.; Walter, U. The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *European Molecular Biology Organization Journal* **1992**, 11, 2063-2070.
- [15] Horstrup, K.; Jablonka, B.; Honig-Liedl, P.; Just, M.; Kochsiek, K.; Walter, U. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *European Journal of Biochemistry* **1994**, 225, 21-27.
- [16] Hartzell, H. C.; Fischmeister, R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on calcium current in single heart cells. *Nature* **1986**, 323 (6085), 273-275.
- [17] Cook, S. J.; McCormick, F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* **1993**, 262 (5136), 1069-1072.
- [18] Schwartz, S. M. Smooth muscle migration in atherosclerosis and restenosis. *Journal of Clinical Investigation* **1997**, 100 (11), 87-89.
- [19] Biel, M.; Seeliger, M.; Pfeifer, A.; Kohler, K.; Gerstner, A.; Ludwig, A.; Jaissle, G.; Fauser, S.; Zrenner, E.; Hofmann, F. Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1999**, 96, 7553-7557.
- [20] Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C. L.; Nielsen, E. B.; Schmidt, K.; Mayer, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-a]-quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology* **1995**, 48, 184-188.
- [21] Schrammel, A.; Behrends, S.; Schmidt, K.; Koesling, D.; Mayer, B. Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Molecular Pharmacology* **1996**, 50, 1-5.

- [22] Weissmann, N.; Voswinckel, R.; Tadic, A.; Hardebusch, T.; Ghofrani, H. A.; Schermuly, R. T.; Seeger, W.; Grimminger, F. Nitric oxide (NO)-dependent but not NO-independent guanylate cyclase activation attenuates hypoxic vasoconstriction in rabbit lungs. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **2000**, 23 222-227.
- [23] Hasegawa, T.; Bando, A.; Tsuchiya, K.; Abe, S.; Okamoto, M.; Kirima, K.; Ueno, S.; Yoshizumi, M.; Houchi, H.; Tamaki, T. Enzymatic and nonenzymatic formation of reactive oxygen species from 6-Anilino-5,8-quinolinequinone. *Biochimica et Biophysica Acta* **2004**, 1670, 19-27.
- [24] Mayer, B.; Brunner, F.; Schmidt, K. Novel actions of methylene blue. *European Heart Journal* **1993**, 14, 22-26.
- [25] Lipton, S. A.; Singel, D. J.; Stamler, J. S. Neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and redox congeners. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1994**, 738, 382-387.
- [26] Gordh, T.; Karlsten, R; Kristensen, J. Intervention with spinal NMDA, adenosine, and NO systems for pain modulation. *Annals of Medicine* **1995**, 27, 229-234.
- [27] Garthwaite, J.; Boulton, C. L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annual Reviews of Physiology* **1995**, 57, 683-706.
- [28] Melino, G.; Bernassola, F.; Catani, M. V.; Rossi, A.; Corazzari, M.; Sabatini, S.; Vilbois, F.; Green, D. R. Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Research* **2000**, 60, 2377-2383.
- [29] Stamler, J. S.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **1992**, 258, 1898-1902.
- [30] Li, R.; Liu, Z.; Zhou, Y.; Wu, L. Highly stereoselective nitration of chalcone derivatives with nitric oxide. *Synthesis Letters* **2006**, 9, 1367-1368.
- [31] Nishida, K.; Ohta, Y.; Ishiguro, I. Relation of inducible nitric oxide synthase activity to lipid peroxidation and nonprotein sulfhydryl oxidation in the development of stress-induced gastric mucosal lesions in rats. *Nitric Oxide* **1998**, 2 (4), 215-223.
- [32] Becker, K.; Savvides, S. N.; Keese, M.; Schirmer, R. H.; Karplus, P. A. Enzyme inactivation through sulfhydryl oxidation by physiologic NO-carriers. *Nature Structural and Molecular Biology* **1998**, 5 (4), 267-271.



- 
- [33] Cygler, M.; Mort, J. S. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* **1997**, 79, 645-652.
- [34] Denis, F.; Rheaume, S. M.; Aouad, A.; Alam, R. P.; Sekaly, P.; Cohen, L. Y. The role of caspases in T-cell development and the control of immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **1998**, 54, 1005-1019.
- [35] Alam, A.; Cohen, L. Y.; Aouad, S.; Sekaly, R. P. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, 190, 1879-1890.
- [36] Elkon, K. B. Caspases: Multifunctional Proteases. *Journal of Experimental Medicine* **1999**, 190, 1725-1727.
- [37] Colasanti, M.; Salvati, L.; Venturini, G.; Ascenzi, P.; Gradoni, L. Cysteine protease as a target for nitric oxide in parasitic organisms. *Trends in Parasitology* **2001**, 17 (12), 575.
- [38] Farias-Eisner, R.; Sherman, M. P.; Aeberhard, E.; Chaudhuri, G. Nitric oxide is an important mediator for tumoricidal activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1994**, 91 (20), 9407-9411.
- [39] Boyd, C. S.; Cadenas, E. Nitric oxide and cell signaling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biological Chemistry* **2002**, 383 (3/4), 411-423.
- [40] Moochhala, S.; Rajnakova, A. Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Radical Research* **1999**, 31 (6), 671-679.
- [41] Riederer, U., Darstellung und Reaktionen von aktiven Stickstoffspezies mit DNA/RNA-Teilstrukturen als biologische Zielmoleküle. *Dissertation* **1999**.
- [42] Felley-Bosco, E.; Mirkovitch, J.; Ambs, S.; Mace, K.; Pfeifer, A.; Keefer, L. K.; Harris, C. C. Nitric oxide and ethylnitrosourea: relative mutagenicity in the p53 tumor suppressor and hypoxanthine-phosphoribosyltransferase genes. *Carcinogenesis* **1995**, 16 (9), 2069-2074.
- [43] Wink, D. A.; Mitchell, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical biology & medicine* **1998**, 25 (4-5), 434-456.
- [44] Hogg, N.; Kalyanaraman, B. Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1411 (2-3), 378-384.

- [45] Patel, R. P.; McAndrew, J.; Sellak, H.; White, C. R.; Jo, H.; Freeman, B. A.; Darley-Usmar, V. M. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta* **1999**, 1411 (2-3), 385-400.
- [46] Rubbo, H.; Parthasarathy, S.; Barnes, S.; Kirk, M.; Kalyanaraman, B.; Freeman, B. A. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low-density lipoprotein oxidation: Termination of radical chain propagation reactions and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1995**, 324 (1), 15-25.
- [47] Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, 269 (42), 26066-26075.
- [48] Rubbo, H.; Radi, R.; Anselmi, D.; Kirk, M.; Barnes, S.; Butler, J.; Eiserich, J. P.; Freeman, B. A. Nitric oxide reaction with lipid peroxyl radicals spares  $\alpha$ -tocopherol during lipid peroxidation: greater oxidant protection from the pair nitric oxide/ $\alpha$ -tocopherol than  $\alpha$ -tocopherol/ascorbate. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (15), 10812-10818.
- [49] Hogg, N.; Struck, A.; Goss, S. P. A.; Santanam, N.; Joseph, J.; Parthasarathy, S.; Kalyanaraman, B. Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. *Journal of Lipid Research* **1995**, 36 (8), 1756-62.
- [50] Graham, A.; Hogg, N.; Kalyanaraman, B.; O'Leary, V.; Darley-Usmar, V.; Moncada, S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Letters* **1993**, 330 (2), 181-185.
- [51] Mayer, B. Handbook of Experimental Pharmacology, Nitric Oxide. *Springer Verlag* **2000**, 143, 17, ISBN 3-540-66122-0.
- [52] Walker, J. E.; Saraste, M. Membrane proteins membrane protein structure. *Current Opinion in Structural Biology* **1996**, 6 (4), 457-459.
- [53] Ford, P. C.; Wink, D. A.; Stanbury, D. M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Letters* **1993**, 326 (1-3), 1-3.
- [54] Wink, D. A.; Grisham, M. B.; Miles, A. M.; Nims, R. W.; Krishna, M. C.; Pacelli, R.; Teague, D.; Poore, C. M. B.; Cook, J. A.; Ford, P. C. Determination of selectivity of reactive nitrogen oxide species for various substrates. *Methods in Enzymology* **1996**, 268, 120-130.
- [55] Enicola, A.; Souza, J. M.; Radi, R.; Lissi, E. Nitric oxide diffusion in membranes determined by fluorescence quenching. *Archives of biochemistry and biophysics* **1996**, 328 (1), 208-212.

- 
- [56] Lehmann, J. Nitric oxide donors - current trends in therapeutic applications. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **2000**, 10 (5), 559-574.
- [57] Needleman, P.; Harkey, A. B. Role of endogenous glutathione in the metabolism of glyceryl trinitrate by isolated perfused rat liver. *Biochemical Pharmacology* **1971**, 20 (8), 1867-1876.
- [58] Servent, D.; Delaforge, M.; Ducrocq, C.; Mansuy, D.; Lenfant, M. Nitric oxide formation during microsomal hepatic denitration of glyceryl trinitrate: involvement of the cytochrome P-450. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1989**, 163 (3), 1210-1216.
- [59] Millar, T. M.; Stevens, C. R.; Blake, D. R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischemia. *Biochemical Society Transactions* **1997**, 25 (3), 528.
- [60] Chen, Z.; Zhang, J.; Stamler, J. S. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2002**, 99 (12), 8306-8311.
- [61] Fink, B.; Bassenge, E. Unexpected, tolerance - devoid vasomotor and platelet actions of pentaerythritol tetranitrate. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1997**, 30 (6), 831-836.
- [62] Pfaffenrath, V.; de la Motte, S.; Harrison, F.; Ruthning, C. Actions of pentaerythritol tetranitrate, isosorbide mononitrate and placebo on headache and ability to work of healthy subjects. *Arzneimittel-Forschung* **1998**, 48 (6), 646-650.
- [63] Harrison, D. G.; Bates, J. N. The nitrovasodilators: new ideas about old drugs. *Circulation* **1993**, 87 (5), 1461-1467.
- [64] Bohn, H.; Schoenafinger, K. Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* **1989**, 14, 6-12.
- [65] Rudolph, W.; Dirschinger, J. Clinical comparison of nitrates and sydnonimines. *European Heart Journal* **1991**, 12, 33-41.
- [66] Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *American journal of physiology* **1995**, 268 (5), 699-722.
- [67] Stamler, J. S.; Simon, D. I.; Osborne, J. A.; Mullins, M. E.; Jaraki, O.; Michel, T.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1992**, 89 (1), 444-448.

- [68] Simon, D. I.; Stamler, J. S.; Jaraki, O.; Keane, J. F.; Osborne, J. A.; Francis, S. A.; Singel, D. J.; Loscalzo, J. Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor. *Arteriosclerosis and Thrombosis* **1993**, 13 (6), 791-799.
- [69] Stamler, J. S. S-Nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **1995**, 196, 19-36.
- [70] Drago, R. S.; Paulik, F. E. The reaction of nitrogen(II) oxide with diethylamine. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, 96-98.
- [71] Davies, K. M.; Wink, D. A.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K. Chemistry of the diazeniumdiolates. 2. Kinetics and mechanism of dissociation to nitric oxide in aqueous solution. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123 (23), 5473-5481.
- [72] Fitzhugh, A. L.; Anadu, N. O.; Waterhouse, D. J.; Hrabie, J. A.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K. Qualitative thin-layer and high-performance liquid chromatographic analysis of 1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates on aminopropyl-bonded silica gel. *Analytical Biochemistry* **2002**, 301 (1), 97-102.
- [73] Dutton, A. S.; Fukuto, J. M.; Houk, K. N. The mechanism of NO formation from the decomposition of dialkylamino diazeniumdiolates: Density functional theory and CBS-QB3 predictions. *Inorganic Chemistry* **2004**, 43 (3), 1039-1045.
- [74] Zhang, H.; Annich, G. M.; Miskulin, J.; Stankiewicz, K.; Osterholzer, K.; Merz, S. I.; Bartlett, R. H.; Meyerhoff, M. E. Nitric Oxide-releasing fumed silica particles: Synthesis, characterization, and biomedical application. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, 125 (17), 5015-5024.
- [75] Keefer, L. K.; Nims, R. W.; Davies, K. M.; Wink, D. A. "NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology* **1996**, 268, 281-293.
- [76] Srinivasan, A.; Kebede, N.; Saavedra, J. E.; Nikolaitchik, A. V.; Brady, D. A.; Yourd, E.; Davies, K. M.; Keefer, L. K.; Toscano, J. P. Chemistry of the Diazeniumdiolates. 3. Photoreactivity. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, 123 (23), 5465-5472.
- [77] Saavedra, J. E.; Southan, G. D.; Davies, K. M.; Lundell, A.; Markou, C.; Hanson, S. R.; Adrie, C.; Hurford, W. E.; Zapol, W. M.; Keefer, L. K. Localizing antithrombotic and vasodilatory activity with a novel, ultrafast nitric oxide donor. *Journal of Medicinal Chemistry* **1996**, 39 (22), 4361-4365.

- [78] Hrabie, J. A.; Klose, J. R.; Wink, D. A.; Keefer, L. K. New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, 58 (6), 1472-1476.
- [79] Saavedra, J. E.; Billiar, T. R.; Williams, D. L.; Kim, Y.-M.; Watkins, S. C.; Keefer, L. K. Targeting nitric oxide (NO) delivery in vivo. Design of a liver-selective NO donor prodrug that blocks tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced apoptosis and toxicity in the liver. *Journal of Medicinal Chemistry* **1997**, 40 (13), 1947-1954.
- [80] Liu, J.; Qu, W.; Saavedra, J. E.; Waalkes, M. P. The nitric oxide donor, O<sup>2</sup>-vinyl-1-(pyrrolidin-1-yl)diazene-1-ium-1,2-diolate (V-PYRRO/NO), protects against cadmium-induced hepatotoxicity in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2004**, 310 (1), 18-24.
- [81] Hrabie, J. A.; Keefer, L. K. Chemistry of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolate ("Nitrosohydroxylamine") functional group and its oxygen-substituted derivatives. *Chemical Reviews* **2002**, 102 (4), 1135-1154.
- [82] Saavedra, J. E.; Srinivasan, A.; Bonifant, C. L.; Chu, J.; Shanklin, A. P.; Flippen-Anderson, J. L.; Rice, W. G.; Turpin, J. A.; Davies, K. M.; Keefer, L. K. The secondary amine/nitric oxide complex ion R<sub>2</sub>N[N(O)NO]<sup>-</sup> as nucleophile and leaving group in S<sub>N</sub>Ar reactions. *Journal of Organic Chemistry* **2001**, 66 (9), 3090-3098.
- [83] Liu, J.; Li, C.; Qu, W.; Leslie, E.; Bonifant, C. L.; Buzard, G. S.; Saavedra, J. E.; Keefer, L. K.; Waalkes, M. P. Nitric oxide prodrugs and metallochemotherapeutics: JS-K and CB-3-100 enhance arsenic and cisplatin cytotoxicity by increasing cellular accumulation. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3 (6), 709-714.
- [84] Wu, X.; Tang, X.; Xian, M.; Wang, P. G. Glycosylated diazeniumdiolates: a novel class of enzyme-activated nitric oxide donors. *Tetrahedron Letters* **2001**, 42 (23), 3779-3782.
- [85] Velazquez, C.; Rao, P. N.; Knaus, E. E. Novel nonsteroidal antiinflammatory drugs possessing a nitric oxide donor diazen-1-ium-1,2-diolate moiety: Design, synthesis, biological evaluation, and nitric oxide release studies. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48 (12), 4061-4067.
- [86] Velazquez, C.; Knaus, E. E. Synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydropyridine calcium channel modulators having a diazen-1-ium-1,2-diolate nitric oxide donor moiety for the potential treatment of congestive heart failure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, 12 (14), 3831-3840.

- [87] Saavedra, J. E.; Mooradian, D. L.; Mowery, K. A.; Schoenfisch, M. H.; Citro, M. L.; Davies, K. M.; Meyerhoff, M. E.; Keefer, L. K. Conversion of a polysaccharide to nitric oxide-releasing form. Dual-mechanism anticoagulant activity of diazeniumdiolated heparin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2000**, 10 (8), 751-753.
- [88] Keefer, L. K. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2003**, 43, 585-607.
- [89] Horstmann, A. Diazeniumdiolate als direkte NO-Donoren - Synthese, Pharmakologie und Untersuchungen der NO-Freisetzungskinetik durch Laser Magnet Resonanz Spektroskopie. *Dissertation* **2003**.
- [90] Gaebler, R.; Lehmann, J. Sensitive and isotope selective ( $^{14}\text{NO}/^{15}\text{NO}$ ) online detection of nitric oxide by Faraday-laser magnetic resonance spectroscopy. *Methods in Enzymology* **2005**, 396, 54-60.
- [91] Iijima, K.; Henry, E.; Moriya, A.; Wirz, A.; Kelman, A. W.; McColl, K. E. L. Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* **2002**, 122 (5), 1248-1257.
- [92] Hunnius. Pharmazeutisches Wörterbuch, *Walter de Gruyter Verlag* **1998**, 8.
- [93] Mutschler, E. Arzneimittelwirkung, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart* **1997**, 7.
- [94] Lüllmann, H.; Mohr, K. Pharmakologie und Toxikologie, *Georg Thieme Verlag* **1999**, 14.
- [95] Longhi, R.; Ragsdale, R. O.; Drago, R. S. Reactions of nitrogen(II)oxide with miscellaneous lewis bases. *Inorganic Chemistry* **1962**, 1, 768-770.
- [96] Hrabie, J. A.; Saavedra, J. E.; Davies, K. M.; Keefer, L. K. Adducts of piperazine with nitric oxide. *Organic Preparations and Procedures International* **1999**, 31 (2), 189-192.
- [97] Zolfigol, M. A.; Choghamarani, A. G.; Hazarkhani, H. Trichloroisocyanuric acid/ $\text{NaNO}_2$  as a novel heterogeneous system for the N-nitrosation of N,N-dialkylamines under mild conditions. *Synthesis Letters* **2002**, 6, 1002-1004.
- [98] Nordberg, R.; Albridge, R. G.; Bergmark, T.; Ericson, U.; Hedman, J.; Nordling, C.; Siegbahn, K.; Lindberg, B. J. Molecular spectroscopy by means of electron spectroscopy for chemical analysis. Charge distribution in nitrogen compounds. *Arkiv foer Kemi* **1967**, 28 (19), 257-278.

- 
- [99] Keiner, Silke. Zellproliferation und –differenzierung in der Umgebung experimentell induzierter Hirninfarkte bei der Ratte - Einfluss von rehabilitativem Training und intrahekalen Applikation des Wachstumsfaktors Brain-derived neurotrophic factor sowie des Zytostatikums Cytarabin. *Dissertation* **2007**.
- [100] Kunze, A.; Grass, S.; Witte, O. W.; Yamaguchi, M.; Kempermann, G.; Redecker, C. Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain. *Neurobiology of Disease* **2006**, 21 (2), 324-332.
- [101] Wurm, F.; Keiner, S.; Kunze, A.; Witte, O.W.; Redecker, C. Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis in the lesioned and intact adult brain. *Stroke* **2007**, im Druck.
- [102] Maragos, C. M.; Morley, D.; Wink, D. A.; Dunams, T. M.; Saavedra, J. E.; Hoffman, A.; Bove, A. A.; Isaac, L.; Hrabie, J. A.; Keefer, L. K. Complexes of NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects. *Journal of medicinal chemistry* **1991**, 34 (11), 3242-3247.
- [103] Nablo, Brian J.; Schoenfisch, Mark H. In vitro cytotoxicity of nitric oxide-releasing sol-gel derived materials. *Biomaterials* **2005**, 26 (21), 4405-4415.
- [104] IUPAC. *Pure and Applied Chemistry* **1996**, 68 (1), 64.
- [105] Reynolds, M. M.; Zhou, Z.; Oh, B. K.; Meyerhoff, M. E. Bis-diazeniumdiolates of dialkyldiamines: Enhanced nitric oxide loading of parent diamines. *Organic Letters* **2005**, 7 (14), 2813-2816.
- [106] Suzuki, T. DNA damage and mutation caused by vital biomolecules, water, nitric oxide, and hypochlorous acid. *Genes and Environment* **2006**, 28 (2), 48-55.
- [107] Juedes, M. J.; Wogan, G. N. Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. Mutation Research. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **1996**, 349 (1), 51-61.
- [108] Drapier, J. C.; Hibbs, J. B. Jr. Aconitases: A class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis. *Methods in Enzymology* **1996**, 269, 26-36.
- [109] Pacelli, R.; Wink, D. A.; Cook, J. A.; Krishna, M. C.; DeGraff, W.; Friedman, N.; Tsokos, M.; Samuni, A.; Mitchell, J. B. Nitric oxide potentiates hydrogen peroxide-induced killing of *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Medicine* **1995**, 182 (5), 1469-1479.

- [110] Kaplan, S. S.; Lancaster, J. R., Jr.; Basford, R. E.; Simmons, R. L. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infection and Immunity* **1996**, 64 (1), 69-76.
- [111] Newton, G. L.; Arnold, K.; Price, M. S.; Sherrill, C.; Delcardayre, S. B.; Aharonowitz, Y.; Cohen, G.; Davies, J.; Fahey, R. C.; Davis, C. Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *Journal of Bacteriology* **1996**, 178 (7), 1990-1995.
- [112] Abouhamad, W. N.; Manson, M.; Gibson, M. M.; Higgins, C. F. Peptide transport and chemotaxis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Characterization of the dipeptide permease (Dpp) and the dipeptide-binding protein. *Molecular Microbiology* **1991**, 5 (5), 1035-1047.
- [113] Falahati, M.; Shabani, M.; Rodaki, M. M. A.; Jahaniani, F.; Bagheri, K. P.; Ahmed Ebrahimi, S. Interaction between ketoconazole, amphotericin B and terbinafine and three diazepam derivatives in concomitant uses against some fungal species. *Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences* **2006**, 14 (2), 87-92.
- [114] Martin, W.; Villani, G. M.; Jothianandan, D.; Furchgott, R. F. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1985**, 232 (3), 708-716.
- [115] Marczin, N.; Ryan, U. S.; Catravas, J. D. Methylene blue inhibits nitrovasodilator- and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via generation of superoxide anion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1992**, 263 (1), 170-179.
- [116] Chen, Y.; McCarron, R. M.; Golech, S.; Bemby, J.; Ford, B.; Lenz, F. A.; Azzam, N.; Spatz, M. ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells. *American Journal of Physiology* **2003**, 284, 243-249.
- [117] Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; London, E. D.; Bredt, D. S.; Snyder, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1991**, 88 (14), 6368-6371.
- [118] Ayata, C.; Ayata, G.; Hara, H.; Matthews, R. T.; Beal, M. F.; Ferrante, R. J.; Endres, M.; Kim, A.; Christie, R. H.; Waeber, C.; Huang, P. L.; Hyman, B. T.; Moskowitz, M. A. Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *Journal of Neuroscience* **1997**, 17 (18), 6908-6917.



- 
- [119] Vidwans, A. S.; Kim, S.; Coffin, D. O.; Wink, D. A.; Hewett, S. J. Analysis of the neuroprotective effects of various nitric oxide donor compounds in murine mixed cortical cell culture. *Journal of Neurochemistry* **1999**, 72 (5), 1843-1852.
- [120] Zhang, R.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Wang, Y.; Lu, M.; LaPointe, M.; Chopp, M. A nitric oxide donor induces neurogenesis and reduces functional deficits after stroke in rats. *Annals of Neurology* **2001**, 50 (5), 602-611.
- [121] Williams, C. V.; Nordquist, D.; McLoon, S. C. Correlation of nitric oxide synthase expression with changing patterns of axonal projections in the developing visual system. *Journal of Neuroscience* **1994**, 14, 1746-1755.

**Curriculum vitae**

Name: Konter  
Vorname: Jörg  
Berufsbezeichnung: Apotheker  
Adresse (dienstlich): Philosophenweg 14  
07743 Jena  
Geburtsdatum: 24.02.1978  
Geburtsort: Leverkusen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

**Tabellarischer Lebenslauf**

24.02.78	geboren in Leverkusen
1985-1988	Grundschule in Neuss/Rosellen 1988 Wechsel zur Webster Elementary-School (5. Schuljahr) in Houston, Texas, USA
1989-1992	Junior High-School Clear Creek (6.-8. Schuljahr) in Houston, Texas, USA
1992-1997	1992 Wechsel zum Norbert-Gymnasium Knechtsteden (ab 9. Schuljahr); Abschluss der Ausbildung mit Erhalt des Abiturs
01.07.97-30.04.98	Grundwehrdienst bei der technischen Schule des Heeres in Aachen
01.04.98	Beginn des Studiums der Pharmazie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
17.03.2000	1. Staatsexamen
26.03.2002	2. Staatsexamen

---

01.05.02-31.10.02	Apotheke am Lessingplatz, Neuss (Praktisches Jahr) Apotheker Jürgen Linder
01.11.02-30.04.03	Bayer AG Leverkusen, Pharmaforschung, Cell Membrane Proteomics (Praktisches Jahr) Dr. Hans-Ulrich Siegmund
12.06.03	3. Staatsexamen in Düsseldorf; Erhalt der Approbation zum Apotheker
August 2003	Urlaubsvertretung in der Apotheke am Lessingplatz, Neuss
01.10.03-heute	Promotion und wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Medizinische/Pharmazeutische Chemie im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. J. Lehmann

### Tagungen

Okt. 2003	Joint Meeting on Medicinal Chemistry	Krakau, Polen
Sept. 2004	W.C. on Dosing of Antiinfectives	Nürnberg
Okt. 2004	DPhG Jahrestagung	Regensburg
Feb. 2005	DPhG/APV Doktorandentagung	Leipzig
Okt. 2005	DPhG Jahrestagung	Mainz
Juni 2006	4 <sup>th</sup> Intl. Conference on Nitric Oxide	Monterey, Ca, USA
Okt. 2006	DPhG Jahrestagung	Marburg

## **Publikationsverzeichnis**

**The NOTizer- A Device for the Convenient Preparation of Diazen-1-ium-1,2-diolates.** Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din Ali Ahmed Hassan; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. *Methods in Enzymology* (2005), 396 (Nitric Oxide, Part E), 17-26.

**Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates Monitored by the "NOTizer" Apparatus: Relationship between Formation Rates, Molecular Structure and the Release of Nitric Oxide.** Konter, Joerg; Abuo-Rahma, Gamal El-Din A. A.; El-Emam, Ali; Lehmann, Jochen. *European Journal of Organic Chemistry* (2007), 4, 616-624.

**NO Donors, part 17: Synthesis and Antimicrobial Activity of Novel Ketoconazole-NO-Donor Hybrid Drugs and Corresponding Nitric Oxide Donors.** Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. *Journal of Medicinal Chemistry*. In Vorbereitung.

**Potency and In Vitro Tolerance of Organic Nitrates: Partially Denitrated Metabolites Contribute to the Tolerance-Devoid Activity of Pentaerythrityl Tetranitrate.** Koenig, Andreas; Lange, Kathrin; Konter, Joerg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (2007), 50, 68-74.

**Permeability changes in response to NONOate and NONOate prodrug derived nitric oxide in a blood-brain barrier model formed by primary porcine endothelial cells.** Winter, Sven; Konter, Joerg; Scheler, Stefan; Lehmann, Jochen; Fahr, Alfred. *Nitric Oxide*. Eingereicht (2007).

**Neue Ketoconazol-Derivate sowie deren Herstellung und Verwendung als antimikrobielle und antiinflammatorische Wirkstoffe.** Konter, Joerg; Möllmann, Ute; Lehmann, Jochen. Eingereicht beim Deutschen Patent- und Markenamt (25.07.2007).

**Kinetic Studies and an improved Synthesis of diazen-1-ium-1,2-diolates ("solid NO") using the NOTizer.** Konter, Joerg; Lehmann, Jochen; DPhG Jahrestagung Regensburg. Poster (2004).

**Monitoring the Synthesis of Diazen-1-ium-1,2-diolates -The Relationships Between Formation Rates, Molecular Structure and Release of Nitric Oxide.** Konter, Joerg; Lehmann, Jochen; Intl. Conference of Nitric Oxide Monterey, USA. Poster (2006).

**Diazeniumdiolate als NO-Donoren.** Konter, Joerg. NO-Symposium Jena. Vortrag (2005).

**Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich,

dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist.

Die vorliegende Arbeit habe ich selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt.

Ich habe weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen, noch unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen in Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation an Dritte erbracht.

Die vorliegende Dissertation habe ich ausschließlich an der Friedrich-Schiller Universität Jena als Prüfungsarbeit eingereicht.

Jena, im August 2007