

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02816305.2

[51] Int. Cl.

C07D 405/06 (2006.01)

C07D 493/08 (2006.01)

A61K 31/445 (2006.01)

A61K 31/335 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1310908C

[22] 申请日 2002.8.21 [21] 申请号 02816305.2

[30] 优先权

[32] 2001. 8. 22 [33] US [31] 60/314,211

[86] 国际申请 PCT/US2002/026622 2002. 8. 21

[87] 国际公布 WO2003/018573 英 2003. 3. 6

[85] 进入国家阶段日期 2004. 2. 20

[73] 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 T·朱 M·B·法齐

[56] 参考文献

US5446158A 1995. 8. 29

GB2247456A 1992. 3. 4

CN1235608A 1999. 11. 17

CN1174554A 1998. 2. 25

审查员 欧 存

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 韦欣华 谭明胜

权利要求书 2 页 说明书 15 页

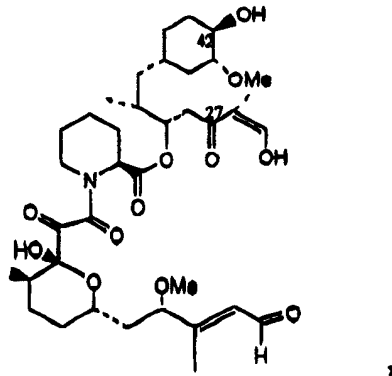
[54] 发明名称

雷帕霉素 29 - 烯醇

[57] 摘要

本发明提供了在实体瘤和血管疾病的治疗中可用作神经营养剂的非免疫抑制的雷帕霉素 29 - 烯醇。

1. 一种化合物，其具有下式的雷帕霉素 29-烯醇核：



或其可药用的盐，

其中所述化合物选自雷帕霉素 29-烯醇和 42-O-(2-羟基)乙基雷帕霉素 29-烯醇。

2. 如权利要求 1 所述的化合物，其是雷帕霉素 29-烯醇。
3. 如权利要求 1 所述的化合物，其是 42-O-(2-羟基)乙基雷帕霉素 29-烯醇。
4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备刺激哺乳动物神经细胞生长的药物中的应用。
5. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备刺激哺乳动物神经再生的药物中的应用。
6. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备刺激哺乳动物受损的外周神经生长的药物中的应用。
7. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备治疗或抑制哺乳动物的神经变性病症的药物中的应用。
8. 如权利要求 7 所述的应用，其中所述的神经变性病症是痴呆、帕金森病、阿耳茨海默氏病、或肌萎缩性一侧硬化。
9. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备治疗哺乳动物外周神经损害的药物中的应用。
10. 如权利要求 9 所述的应用，其中所述的外周神经损害是由物理性损伤或创伤造成的。
11. 如权利要求 10 所述的应用，其中所述的外周神经损害是由脊髓损伤或创伤、坐骨神经或面神经损伤或损伤所造成的。
12. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在

制备治疗哺乳动物实体瘤的药物中的应用。

13. 如权利要求 12 所述的应用, 其中所述的实体瘤选自星形细胞瘤、前列腺癌、乳癌、结肠癌、小细胞肺癌、和卵巢癌; 以及成人 T-细胞白血病/淋巴瘤。

14. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐在制备治疗或抑制哺乳动物过度增生性血管病症的药物中的应用。

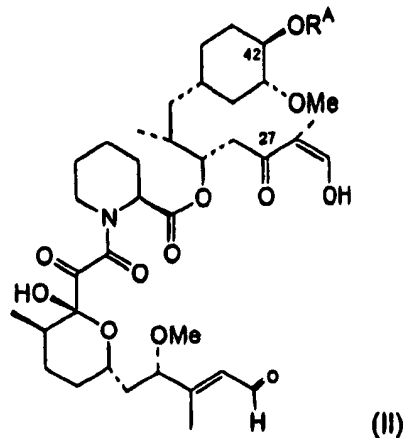
15. 如权利要求 14 所述的应用, 其中所述的过度增生性血管病症是再狭窄。

16. 一种药物组合物, 其包括如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的化合物或其可药用的盐以及药用载体。

17. 一种制备如权利要求 1 所定义的化合物的方法, 其包含下面步骤中的一种:

a) 将雷帕霉素进行臭氧分解, 得到雷帕霉素 29-烯醇; 或

b) 用包含 R^A 基团的酰化剂将在反应性取代基上进行了保护或未进行保护的雷帕霉素 29-烯醇进行酰化, 得到式 (II) 的雷帕霉素 29-烯醇化合物:



其中 R^A 是所选择的成酯基团, 然后除去任选的保护基团; 或

c) 将在反应性取代基上进行了保护或未进行保护的雷帕霉素 29-烯醇用包含上面所定义的 R^A 基团的酰化剂进行酰化, 得到雷帕霉素 29-烯醇, 然后除去任选的保护基团。

雷帕霉素 29-烯醇

本发明涉及在实体瘤、以及血管疾病中可用作神经营养剂的非免疫抑制性雷帕霉素 (rapamycin) 29-烯醇, 本发明还涉及其制备方法以及包含其的药物组合物。

雷帕霉素是由吸湿链霉菌产生的一种大环三烯抗生素, 已经发现其在体内和体外都具有抗真菌活性, 特别是可对抗白色念珠菌 [C. Vezina 等人, J. Antibiot. 28, 721 (1975); S. N. Sehgal 等人, J. Antibiot. 28, 727 (1975); H. A. Baker 等人, J. Antibiot. 31, 539 (1978); US 3, 929, 992; 和 US 3, 993, 749]。此外, 已经表明单独 (US 4, 885, 171) 或与溶链菌联合 (US 4, 401, 653) 的雷帕霉素具有抗肿瘤活性。

在 FASEB 3, 3411 (1989) 中已经公开了雷帕霉素的免疫抑制作用。已表明其它的大环分子——环孢菌素 A 和 FK-506 也是有效的免疫抑制剂, 因此可用于预防移植排斥 [FASEB 3, 3411 (1989); FASEB 3, 5256 (1989); R. Y. Calne 等人, Lancet 1183 (1978); 和 US 5, 100, 899]。R. Martel 等人 [Can. J. Physio. Pharmacol. 55, 48 (1977)] 公开了雷帕霉素在实验的变应性脑脊髓炎模型——一种用于多发性硬化的模型中有效; 在佐剂关节炎模型——一种用于类风湿关节炎的模型中有效; 并且可有效抑制 Ig-E 样抗体的形成。已经表明 FK-506 和一些合成的 FKBP-12 结合配体具有神经保护和神经再生作用 [US5696135、US5721256、US5780484、US5811434 和 US 5840736]。

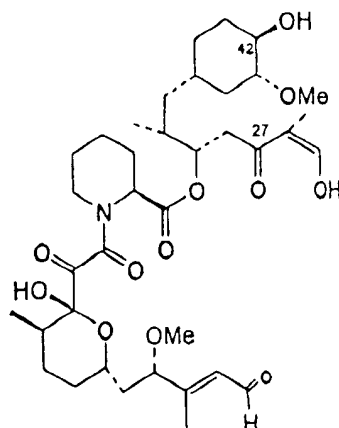
雷帕霉素还可用于预防或治疗全身性红斑狼疮 [US 5, 078, 999]、肺部炎症 [US 5, 080, 899]、胰岛素依赖性糖尿病 [US 5, 321, 009]、皮肤病, 如牛皮癣 [US 5, 286, 730]、内脏病症 [US 5, 286, 731]、血管损伤后的平滑肌细胞增生和内膜变厚 [US 5, 288, 711 和 US 5, 516, 781]、成人 T-细胞白血病/淋巴瘤 [EP 525, 960 A1]、眼部炎症 [US 5, 387, 589]、恶性肿瘤 [US 5, 206, 018]、心脏炎性疾病 [US 5, 496, 832]、贫血 [US 5, 561, 138] 和增加的轴突赘疣 [Parker, E.M. 等人, Neuropharmacology 39, 1913-1919, 2000]。

体内动物肿瘤模型和 I 期临床试验中已经表明一种雷帕霉素酯—

— 与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成的雷帕霉素 42-酯[公开于 US 5,362,718 中], 也被称为 CCI-779——具有对抗各种肿瘤细胞系的抗肿瘤活性。[Gibbons, J., Proc. Am. Assoc. Can. Res. 40: 301 (1999); Georger, B., Proc. Am. Assoc. Can. Res. 40: 603 (1999); Alexandre, J., Proc. Am. Assoc. Can. Res. 40: 613 (1999); 和 Alexandre, J., Clin. Cancer Res. 5 (November Supp.) : Abstr. 7 (1999)]。

本发明的描述

本发明提供了非免疫抑制的雷帕霉素 29-烯醇、以及这里所描述的使用其的方法。这里所定义的术语“雷帕霉素 29-烯醇”指的是一类包含基本的雷帕霉素 29-烯醇核(如下所示)的神经营养性化合物。这些化合物缺乏与完整的雷帕霉素核有关的免疫抑制性。本发明的雷帕霉素 29-烯醇包括的是雷帕霉素 29-烯醇衍生物形式的化学或生物学改性的仍然保留了神经营养性的化合物。因此, 术语“雷帕霉素 29-烯醇”包括雷帕霉素的酯、醚、肟、脞、和羟胺、以及其中雷帕霉素 29-烯醇核上的官能团已经被改性, 例如通过还原或氧化进行了改性的雷帕霉素 29-烯醇。术语“雷帕霉素 29-烯醇”还包括雷帕霉素 29-烯醇可药用的盐, 其能通过包含酸性或碱性部分来形成该类盐。



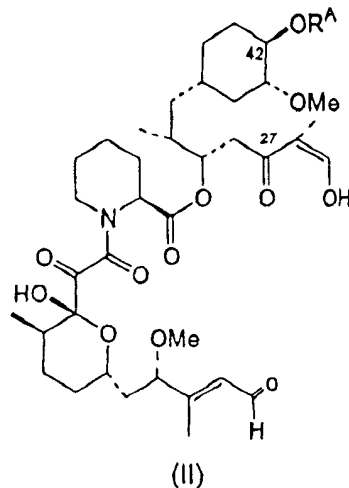
雷帕霉素 29-烯醇

优选地, 雷帕霉素 29-烯醇的酯和醚是在雷帕霉素 29-烯醇核 42-

位上的羟基的酯和醚，肟、脞和羟胺是雷帕霉素 29-烯醇核 42-位上的酮（42-羟基氧化后形成的）和 27-酮形成的。

在下面的专利中公开了用作相应的雷帕霉素 29-烯醇的起始材料的优选的雷帕霉素 42-酯和醚，其在这里都被引入作为参考：烷基酯 (US 4, 316, 885)；氨基烷基酯 (US 4, 650, 803)；氟化酯 (US 5, 100, 883)；酰胺酯 (US 5, 118, 677)；氨基甲酸酯 (US 5, 118, 678)；甲硅烷基醚 (US 5, 120, 842)；氨基酯 (US 5, 130, 307)；缩醛类 (US 5, 51, 413)；氨基二酯 (US 5, 162, 333)；磺酸酯和硫酸酯 (US 5, 177, 203)；酯 (US 5, 221, 670)；烷氧基酯 (US 5, 233, 036)；O-芳基、-烷基、-链烯基、和-炔基醚 (US 5, 258, 389)；碳酸酯 (US 5, 260, 300)；芳基羰基和烷氧基羰基氨基甲酸酯 (US 5, 262, 423)；氨基甲酸酯 (US 5, 302, 584)；羟基酯 (US 5, 362, 718)；受阻酯类 (US 5, 385, 908)；杂环酯 (US 5, 385, 909)；偕-二取代的酯 (US 5, 385, 910)；氨基链烷酸酯 (US 5, 389, 639)；磷酰基氨基甲酸酯 (US 5, 391, 730)；氨基甲酸酯 (US 5, 411, 967)；氨基甲酸酯 (US 5, 434, 260)；脒基氨基甲酸酯 (US 5, 463, 048)；氨基甲酸酯 (US 5, 480, 988)；氨基甲酸酯 (US 5, 480, 989)；氨基甲酸酯 (US 5, 489, 680)；受阻的 N-氧化物酯 (US 5, 491, 231)；生物素酯 (US 5, 504, 091)；O-烷基醚 (US 5, 665, 772)；和雷帕霉素的 PEG 酯 (US 5, 780, 462)。这些酯和醚的制备在上面所列的专利中进行了公开。相应的雷帕霉素 29-烯醇的酯和醚可以用这些专利中所描述的方法，用雷帕霉素作为起始材料，然后进行本文所描述的开环反应来进行制备。在 US 6, 277, 539 中公开了改良的雷帕霉素 42-酯和醚的合成，该专利在这里被引入作为参考。

因此，雷帕霉素 29-烯醇的实例包括式雷帕霉素 29-烯醇和式 (II) 的 42-酯和醚化合物：



其中 R^A 选自氢和上述 US/EP 专利中任何一个所公开的酯或醚形成基团 (例如酰基并且可以任选地被烷基取代)。

优选的雷帕霉素的脞、脞、和羟胺在 US 5,373,014、5,378,836、5,023,263、5,023,264、和 5,563,145 中进行了公开,其在这里被引入作为参考。这些作为相应雷帕霉素 29-烯醇的起始材料的脞、脞、和羟胺的制备在上面所列的专利中进行了公开。相应的雷帕霉素 29-烯醇的脞、脞、和羟胺的制备可以用这些专利中所描述的方法,从雷帕霉素开始,然后进行本文所述的开环反应来完成。

特别优选的雷帕霉素 29-烯醇类物质包括雷帕霉素 29-烯醇、与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成的雷帕霉素 29-烯醇 42-酯 [见 US 5,362,718 和 6,277,539,用于与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成雷帕霉素 42-酯的制备]、和 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素 29-烯醇 [见 US 5,665,772,用于 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素的制备]。

当雷帕霉素包含适宜的碱性部分时,可以根据需要由有机酸和无机酸来形成可药用的盐,所说的有机酸和无机酸例如醋酸、丙酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、丙二酸、苦杏仁酸、苹果酸、邻苯二甲酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、萘磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、樟脑磺酸、以及类似的公知的可接受的酸。当雷帕霉素包含适宜的酸性部分时,可以与有机碱或无机碱形成盐,如碱金属盐 (例如,钠、锂、或钾盐)、碱土金属盐、铵盐、包含 1-6 个碳原子的烷基铵盐或在各烷基部分包含 1-6 个碳原子的二烷基

铵盐、以及在各烷基部分包含 1-6 个碳原子的三烷基铵盐。

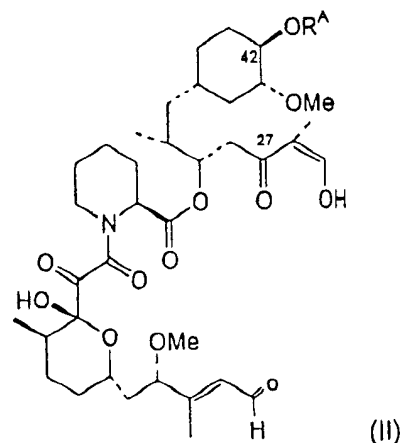
在本发明的范围内涉及提供一种化合物或物质时本发明所用的术语“提供”指的是将该类化合物或物质直接给药，或者是将在体内可形成有效量该化合物或物质的前体药物、衍生物或类似物进行给药。

本发明的化合物可以用可通过商业途径获得的材料由雷帕霉素制得或者可以由可根据文献方法进行制备的起始材料来进行制备。所需的雷帕霉素 29-烯醇可以通过将雷帕霉素用臭氧进行处理，对反应过程进行监测直至形成所需的产物来进行制备。

因此，本发明提供了一种制备这里所定义的雷帕霉素 29-烯醇的方法，其包括下面步骤中的一种：

a) 将雷帕霉素(例如雷帕霉素、与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成的雷帕霉素 42-酯、或 42-O-(2-羟基)乙基雷帕霉素)进行臭氧分解从而制造出雷帕霉素 29-烯醇(例如雷帕霉素 20-烯醇、与 3-羟基-2-(羟基甲基)-2-甲基丙酸形成的雷帕霉素 29-烯醇 42-酯或 42-O-(2-羟基)乙基雷帕霉素 29-烯醇)；或者

b) 用酰化剂(例如包含上面所定义的 R^A 基团的酰化剂)将在反应性取代基上任选地进行了保护的雷帕霉素 29-烯醇进行酰化，得到雷帕霉素 29-烯醇，例如式 (II) 的 42-酯衍生物：

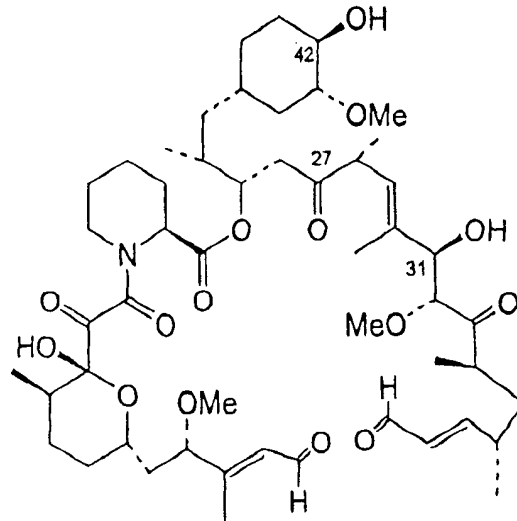


其中 R^A 是所选择的成酯基团(例如酰基基团)，然后除去任何保护基团；或

c) 将在反应性取代基上任选地进行了保护的雷帕霉素 29-烯醇用酰化剂(例如包含上面所定义的 R^A 基团的酰化剂)进行酰化，得到雷

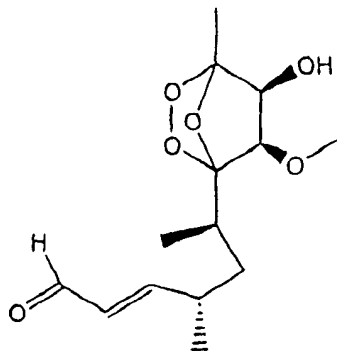
帕霉素 29-烯醇(例如其中 R^A 是所选择的成醚基团的式 (II) 的 42-醚衍生物), 然后除去任何保护基团。

除了产生雷帕霉素 29-烯醇外, 在臭氧分解氧化期间还产生相应的雷帕霉素二醛。 下面提供了雷帕霉素二醛的结构。



雷帕霉素二醛

此外, 在雷帕霉素的臭氧分解期间, 还产生具有如下所示结构的 (2E, 4S, 6R)-6-[(5S, 6R)-5-羟基-6-甲氧基-4-甲基-2, 3, 7-三氧杂二环 [2.2.1] 庚-1-基]-4-甲基庚-2-烯醛 (实施例 3)。



用标准的药理学试验操作, 通过对作为本发明有代表性化合物的雷帕霉素二醛 (实施例 1) 和雷帕霉素 29-烯醇 (实施例 2) 在体外对抗 SH-SY5Y 细胞的活性进行评估, 证实了本发明化合物的神经再生活性 [Gold 等人, Exp Neurol 147: 269-278, 1997]。 简要地说, 将 SH-SY5Y

细胞在用阿非迪霉素进行了处理的 6 孔板中放置 5 天, 然后用 6-孔板用试验化合物来进行。作为对照, 孔是未进行处理的, 或者只用神经生长因子 (NGF) 进行处理。将试验孔用 NGF 加实施例 1 和实施例 2、或雷帕霉素进行处理。在 168 小时对细胞进行照相。用与带有适宜软件 (Bioquant IV, R & M Biometrics, Nashville, TN) 的 IBM XT 计算机相连的 Houston Instrument HI-PAD 数字化输入板在照片上进行神经炎长度分析。用 ANOVA (STATVIEW, Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA) 对轴突区域的均值进行比较。下面的表对所得的结果进行了总结。

表 1. 在 168 小时后平均轴突长度

	轴突长度 (μm)	
未进行处理的细胞	109.5 \pm 2.6 ^a	(n=115)
NGF	196.5 \pm 7.7 [*]	(n=112)
雷帕霉素+NGF	261.4 \pm 13.1 ^{**}	(n=119)
实施例 1+NGF	229.8 \pm 9.5 ^{**}	(n=141)
实施例 2+NGF	239.7 \pm 10.0 ^{**}	(n=155)

^a 值是均值 \pm SEM (单位为 μm)。n, 细胞数。

^{*} 与未进行处理的细胞相比 $p < 0.05$

^{**} 与 NGF 和未进行处理的细胞相比 $p < 0.05$

用标准药理学试验操作所得的结果证明本发明的化合物可用作神经营养剂, 并且在促进神经元再生和功能恢复方面特别有用, 而且可以刺激轴突生长, 所以可对各种神经病理学状况进行治疗, 所说的神经病理学状况包括由物理损伤 (例如脊髓损伤和创伤、坐骨神经或面神经损害或损伤)、疾病 (例如糖尿病性神经病)、癌症化疗 (例如长春花生物碱和阿霉素)、与中风有关的脑损伤和与中风有关的局部缺血、以及神经病学病症所造成的周边神经系统和中枢神经系统损伤, 所说的神经病学病症非限制性地包括各种涉及神经变性的外周神经病和神经性病症, 其非限制性地包括: 三叉神经痛、舌咽神经痛、Bell's 麻痹、重症肌无力、肌营养不良、肌肉萎缩性一侧硬化、进行性肌萎缩、进行性延髓遗传性肌萎缩、突出、破裂或下垂的脊椎盘综合征、颈部脊

椎强硬症、神经丛病症、胸廓出口破坏综合征、神经病如由铅、丙烯酰胺、 γ -二酮(glue-sniffer's 神经病)、二硫化碳、氮苯砒、蜂所造成的神经病、卟啉症、Gullain-Barre 综合征、痴呆(dementia)、阿耳茨海默氏疾病、帕金森病、和亨廷顿氏舞蹈病。

通过对本发明有代表性的化合物(实施例 1-5)在体外对抗六种肿瘤细胞系的抗肿瘤活性进行评估来证实了本发明化合物的抗肿瘤活性。简要地说,将得自六种细胞系的肿瘤细胞放置在 96 孔微量滴定板中。使用了下面的肿瘤细胞系:3T3(卵巢)、3T3/H2N(卵巢-对顺铂有抗药性)、A431(得自外阴表皮)、SW620(结肠)、SKBR3(乳腺)、和 MDA-435(乳腺)。使肿瘤细胞在存在要进行评估的化合物系列稀释物的情况下生长 48 小时,并且用比色法(sulforhodamine B)来测定细胞生长。与添加试验化合物时的细胞数相比来计算生长抑制。将结果表示为 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$);并将其列于表 2 中。

表 2. 抗肿瘤活性(IC_{50} $\mu\text{g/ml}$)

细胞系	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
3T3	0.72	>5	4.11	1.5	>5
3T3/H2N	0.68	>5	>5	0.72	4.96
A431	0.91	>5	3.01	2.64	>5
SKBR3	0.52	>5	2.05	0.36	2.69
MDA435	1.23	>5	4.13	1.1	>5
SW620	1.41	>5	>5	3.04	>5

这种标准药理学试验方法的结果证明本发明的化合物可用作抗肿瘤剂。本发明的化合物特别是可用于对抗实体瘤,包括肉瘤类和癌;并且可更特定地对抗星形细胞瘤、前列腺癌、乳癌、结肠癌、小细胞肺癌、以及卵巢癌;和 T-细胞白血病/淋巴瘤。

本发明的化合物还可用于治疗或抑制过度增生性血管疾病如再狭窄。

当用于再狭窄时,优选地用本发明的化合物来治疗血管成形术操作后发生的再狭窄。当用于治疗这种血管成形术后的再狭窄时,本发明的化合物可以在该操作之前进行给药、在该操作期间进行给药、在该操作之后进行给药、或采用任何上述给药方式的组合。

应当清楚的是，雷帕霉素 29-烯醇的有效剂量可根据所用的化合物、给药方式、所治疗的病症和所治疗病症的严重程度、以及与所治疗个体有关的各种体质因素而变化。正如本发明所用的这样，当将雷帕霉素 29-烯醇以预计的日剂量进行给药时可以获得令人满意的结果，活性化合物预计的日剂量为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $100 \text{mg}/\text{kg}$ ，优选地为 0.001 - $25 \text{mg}/\text{kg}$ ，并且更优选地为 0.01 - $5 \text{mg}/\text{kg}$ 。该预计的日剂量将随着给药途径而变化。

当用雷帕霉素 29-烯醇作为组合方案的一部分时，在所需的治疗时期将该组合各组分的剂量进行给药。该组合的组分可以同时给药；或者可以以包含两种组分的单元剂型或独立的剂量单位的形式进行给药；该组合的组分还可以在治疗周期的不同时间进行给药，或者一种可以以另一种的预治疗的形式进行给药。

该剂量可以以可用于使本发明的活性化合物进入接受者血液中的任何方式来进行给药，包括口服给药、通过植入进行给药、胃肠外给药(包括静脉内、腹膜内和皮下注射)、直肠给药、鼻内给药、阴道给药、和经皮给药。对于本公开的目的而言，经皮给药应被理解为包括通过机体表面和包括上皮和粘膜组织在内的机体通道的内层进行的所有给药。该类给药可以用本发明的化合物或其可药用的盐以洗剂、乳膏、泡沫、贴剂、混悬液、溶液和栓剂(直肠栓和阴道栓)的形式来进行。

包含本发明活性化合物的口服制剂可包括任何常用的口服形式，包括片剂、胶囊、颊形式、锭剂、糖锭剂和口服液、混悬液或溶液。胶囊可包含活性化合物和惰性填充剂和/或稀释剂的混合物，如可药用淀粉(例如玉米、马铃薯或木薯淀粉)、糖、人工甜味剂、粉状纤维素如结晶和微晶纤维素、面粉、明胶、树胶等等。有用的片剂制剂可以通过常规的压缩、湿法制粒或干法制粒法来进行制备并可使用可药用的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面改性剂(包括表面活性剂)、悬浮剂或稳定剂，非限制性地包括硬脂酸镁、硬脂酸、滑石粉、月桂基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、海藻酸、阿拉伯胶、黄原胶、柠檬酸钠、复合硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石粉、干淀粉和粉状糖。优选的表面改性剂包括非离子和阴离子表面改性剂。表面改性剂有代表性的实例非限制性地包括泊洛沙姆 188、

烷基苄基二甲基氯化铵、硬脂酸钙、十六十八烷醇、cetomacrogol 乳化蜡、脱水山梨醇酯、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、硅酸镁铝、和三乙醇胺。更优选地用泊洛沙姆 188 作为表面改性剂。这里的口服制剂可以使用标准的延迟或时间释放制剂来改变活性化合物的吸收。在 US 5,559,121; 5,559,536,729; 5,989,591; 和 5,985,325 中公开了优选的雷帕霉素口服制剂，其在这里被引入作为参考。

在一些情况中，需要以气溶胶的形式将该化合物直接给药到呼吸道中。

本发明的化合物还可以通过胃肠外或腹膜内给药。游离碱或可药用盐形式的这些活性化合物的溶液或混悬液可以在水中来进行制备，在水中可适宜地混有表面活性剂如羟丙基纤维素。还可以用甘油、液体聚乙二醇及其在油中的混合物来制备分散体。在普通的储存或应用条件下，这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

适用于注射应用的药物形式包括无菌的水溶液或分散体和用于无菌可注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。在所有的情况中，该形式必需是无菌的并且必需在一定程度上是易于通针的流体。其在制造和储存条件下必需稳定并且在对抗微生物如细菌和真菌的污染作用下被保存。该载体可以是溶剂或分散介质，所说的溶剂或分散介质包含例如，水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇）、其适宜的混合物、以及植物油。在 US 5,530,006; 5,516,770; 和 5,516,770 和 5,616,588 中公开了用于将雷帕霉素进行给药的优选的胃肠外制剂，这些专利在这里被引入作为参考。

栓剂制剂可以用常规物质来进行制备，所说的常规物质包括带有或不带有用于改变该栓剂熔点的蜡的可可脂、以及甘油。还可以使用水溶性栓剂基质如各种分子量的聚乙二醇。

当用雷帕霉素 29-烯醇来治疗或抑制过度增生性血管病症如再狭窄时，优选地用已经用雷帕霉素 29-烯醇进行了涂布或浸渍的血管斯滕特固定模或分流器来提供雷帕霉素二醛。

下面提供了制备本发明有代表性化合物的方法。

实施例 1 (方法 A)

雷帕霉素二醛

将雷帕霉素 (5.0 g, 5.5 mmole) 溶解于 100 mL 二噁烷和 35 mL 水

中。然后向其中加入 61 mg OsO_4 并使该反应在室温下进行。在搅拌 30 分钟后(溶液变成深绿色)。在 30 分钟内分批向其中加入偏高碘酸钠 (2.34 g, 10.9 mmole)。将该反应搅拌过夜。通过用 200 mL CH_2Cl_2 对该反应混合物进行萃取来终止反应并进行后处理, 得到 5.1 g 粗品 (WAY-18 1340 为总峰面积的 66%, 12% 未进行反应的雷帕霉素)。将粗品用使用 Prep Nova-pak HR C18 柱 (300 x 19 mm) 的制备 HPLC, 用梯度法来进行纯化, 在最初的 5 分钟使用 65% A 和 35% B, 然后在 30 分钟内从 65% A 和 35% B 变成 10% A 和 90% B。缓冲剂 A 是 90% 水和 10% 乙腈。缓冲剂 B 是 10% 水和 90% 乙腈。流速为 20 mL/min。收集 20-21 分钟的级分并用二氯甲烷对其进行萃取。将有机层用无水硫酸钠进行干燥。用旋转蒸发系统除去有机溶剂。将残余物溶解于 3 mL 二氯甲烷中并通过加入 15 mL 己烷来进行沉淀。在过滤后, 将白色固体在快速-真空干燥器 (speed-vac) 中干燥过夜。如果该产品纯度不够, 则将其用相同的柱用 51% B 和 49% A 进行纯化。收集 13 分钟的峰, 在如上所述的那样进行后处理。得到一种白色的固体。

化合物 I 的测定, DMSO-d₆, 400 MHz (¹³C: 100 MHz)

C#	$\delta^{13}\text{C}$ major	$\delta^{13}\text{C}$ minor	$\delta^1\text{H}$ major	$\delta^1\text{H}$ minor	¹ H Correltn	HMBC
1	163.34		6.91		2,36	3,35,36,50
2	131.37		6.12		1,3	3,36
3	194.38		9.52		2	2
4	192.08	191.92	10.02		5	5
5	127.54	128.07	6.06	6.00	4	4,7,45
6	160.98	161.23				
7	81.78	81.87	3.78	3.76	8	5
8	39.41	39.08	1.62;1.62			
9	65.97		3.74			
10	32.81		1.76 (eq) 1.15 (ax)			
11	26.33		1.50			
12	34.68	34.49	2.00			
14	99.27	99.98				
14 (OH)			6.44	6.53		12,13,15
15	198.98	199.45				
16	166.06	166.89				
18	43.42	37.94	3.51 (eq) 3.10 (ax)	4.22 (eq) 2.56 (ax)		
19	24.30		1.63 (eq) 1.27 (ax)			
20	20.70		1.75			
21	26.87		2.14 (eq) 1.64 (ax)			
22	50.92	54.78	4.96	4.46		
23	169.47	168.77				

C#	$\delta^{13}\text{C}$ major	$\delta^{13}\text{C}$ minor	$\delta^1\text{H}$ major	$\delta^1\text{H}$ minor	^1H Correltn	HMBC
25	74.10		5.17		26,37	
26	39.95		2.72 2.67			
27	208.15	208.37				
28	45.51		3.45			
29	126.06		5.21		28,48(w)	
30	138.00					
31	75.95		4.01		31-OH, 32	
31 (OH)			5.26		31	30,32
32	86.04		3.78			
33	212.53					
34	40.05		2.80			
35	37.63		2.56;1.22			
36	33.85		2.55			
37	32.55		1.83			
38	38.08		1.16;1.02			
39	32.42		1.32			
40	35.24	35.20	1.94 (eq) 0.62 (ax)			
41	83.77		2.83			
42	73.06		3.19			
42 (OH)			4.53			
43	32.81		1.74 (eq) 1.22 (ax)			
44	30.92		1.59 (eq) 0.88 (ax)			
45	11.82		2.06			
46	15.61		0.69			
47	15.70		1.00			
48	11.38		1.70			
49	15.29		0.95			
50	19.76		1.06			
51	15.06		0.80			
52	55.93		3.11			
53	57.55		3.19			
54	56.57		3.30			

用阴性和阳性电喷雾方式分别在 m/z 944 处观测到假-分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子和在 m/z 963 处观测到假-分子离子 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 。

实施例 1 (方法 B)

雷帕霉素 42-二醛

将雷帕霉素 (1.0 g, 1.09 mmol) 溶解于 250 mL CH_2Cl_2 中。将圆底烧瓶放置在干冰浴中。向溶液中通入臭氧鼓泡 6 分钟 (6 L/min, 控制旋钮设置在输出 7 上)。然后将该反应混合物搅拌 1 小时。向其中加入二甲硫 (100 μl) 并将该反应再搅拌 1 小时。通过向该反应混合物中加入 200 mL 水来终止反应。在进行后处理后得到约 0.97 g 粗品 (乳白色固

体, WAY-181340 为总峰面积的 44%)。LC/MS 结果证明主要的峰是 WAY-181340。

实施例 2 和 3

雷帕霉素 29-烯醇(实施例 2)和(2E, 4S, 6R)-6-[(5S, 6R)-5-羟基-6-甲氧基-4-甲基-2, 3, 7-三氧杂二环[2.2.1]庚-1-基]-4-甲基庚-2-烯醛(实施例 3)

用与实施例 1B 相同的方法来对雷帕霉素 (1.3 g, 1.40 mmol) 进行处理, 只是用臭氧气体鼓泡 50 分钟。在进行后处理后得到约 1.1 g 粗品(乳白色固体, 实施例 2 的二醛为总峰面积的 44%)。用制备 HPLC 将两个主峰(9.5 分钟和 14 分钟)分离出来。获得白色固体形式的实施例 2(14 分钟)和澄清的油状物形式的实施例 3(9.5 分钟)。

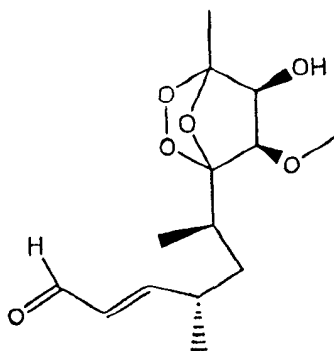
30°C 下, 实施例 2 在 DMSO-d₆, 400 MHz 的测定 (¹³C: 100 MHz)

C#	$\delta^{13}\text{C}$ major	$\delta^{13}\text{C}$ minor	$\delta^1\text{H}$ major	$\delta^1\text{H}$ minor
4	192.24	192.07	10.02	10.01
5	128.29	127.57	6.07	5.99
6	161.10	161.46		
7	81.94	81.79	3.76	3.77
8	39.22	39.04	1.60; 1.60	1.74; 1.74
9	65.97	65.97	3.73	3.73
10	30.85	30.93*	1.27	1.27
11	227.23	27.23	1.45	1.50
12	34.82	34.66	2.09	2.01
14	99.34	99.04		
14(OH)			6.56	6.48
15	199.18	199.59		
16	166.12	166.85		
18	43.54	37.90	3.44 (eq) 3.13 (ax)	4.16 (eq) 2.60 (ax)
19	24.17	24.51	1.55 (eq) 1.34 (ax)	1.59 (eq) 1.21 (ax)
20				
21	26.49	26.32	2.12 (eq) 1.58 (ax)	2.08 (eq) 1.56 (ax)
22	51.00	55.93	4.92	4.44

C#	$\delta^{13}\text{C}$ major	$\delta^{13}\text{C}$ minor	$\delta^1\text{H}$ major	$\delta^1\text{H}$ minor
23	169.61	168.82		
25	75.56	75.33	5.29	5.22
26	35.94	36.74	2.87 2.66	2.76 2.76
27	196.03	196.03		
28	115.12	114.96		
29	157.38	157.16	7.83	7.78
29-OH			10.76	10.76
37	32.77	33.15	1.86	1.81
38	38.39	38.49	1.24 1.07	1.21 1.02
39	31.04	30.93*	1.33	1.30
40	35.49	34.49	1.96 (eq) 0.64 (ax)	1.94 (eq) 0.61 (ax)
41	83.87	83.87	2.83	2.81
42	75.56	75.33	3.18	3.12
42 (OH)			4.60	4.44
43	32.99	32.99	1.76 (eq) 1.17 (ax)	1.55 (eq) 1.34 (ax)
44	30.63	30.52	1.60 (eq) 0.88 (ax)	1.60 (eq) 0.88 (ax)
45	11.51	12.04	2.05	2.06
46	15.40	15.50	0.68	0.73
47	7.73	7.76	1.55	1.55
51	15.03	15.36	0.90	0.85
52	55.99	56.11	3.10	3.11
54	56.59	56.62	3.31	3.31

在 m/z 706 处观测到化合物 II 的假-分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子和碎片离子 424。

对于实施例 3 而言, ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 9.5(1H, -CHO), 6.8 (1H, C=CH), 6.1 (1H, C=CH), 5.07 (1H, OH), 3.88, 3.76, 3.3 (3H, -OCH₃), 2.6, 2.2, 1.7, 1.5, 1.4, 1.10. ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 194.7, 163.5, 131.6, 112.0, 110.4, 81.1, 73.9, 59.0, 35.6, 28.0, 20.3, 14.0. 用阴性和阳性电喷雾方式分别在 m/z 301 处观测到假-分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子和在 m/z 320 处的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 离子。



实施例 3, (2E, 4S, 6R)-6-[(5S, 6R)-5-羟基-6-甲氧基-4-甲基-2, 3, 7-三氧杂二环[2. 2. 1]庚-1-基]-4-甲基庚-2-烯醛的化学结构

实施例 4 和 5

42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素二醛(实施例 4)和42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素 29-烯醇(实施例 5)

将 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素(10 mg, 0. 01 mmole)溶解于 10 mL CH_2Cl_2 中。将圆底烧瓶放置在干冰浴中。用臭氧气体向溶液中鼓泡 1 分钟(2 L/min, 控制旋钮设置在输出 7 上)。然后将该反应混合物搅拌 1 小时。向其中加入二甲硫(5 μl), 将该反应混合物再搅拌 0. 5 小时。在后处理后得到约 9 mg 粗品。在用制备 HPLC 进行处理后, 获得 0. 5 mg 实施例 4 的物质和 0. 24 mg 实施例 5 的物质。

实施例 4 的阴离子方式在 m/z 988. 6 处表现出 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 离子。用雷帕霉素和 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素作为内标物, 元素组成为 $\text{C}_{53}\text{H}_{82}\text{NO}_{16}$ 的未知离子的准确测量质量为 988. 5612 Da(理论质量=988. 5634, $\Delta = 2. 2$ mDa)。与 42-0-(2-羟基)乙基雷帕霉素相比, 实施例 4 的化合物多包含两个氧。用阳性电喷雾方式对分子量进行了进一步确证, 其在 m/z 1007. 6 处表现出强 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 离子。

实施例 5 在 m/z 769. 4 处表现出假-分子离子 ($[\text{M}+\text{NH}_4]^+$)。测得的 769. 4487Da 的准确质量与 $\text{C}_{39}\text{H}_{65}\text{N}_2\text{O}_{13}$ 的元素组成相一致(理论质量=769. 4487, $\Delta = 0. 0$ mDa)。