

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

A61K 31/44



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96123098.3

[43]公开日 1997年9月24日

[11] 公开号 CN 1159915A

[22]申请日 96.12.6

[30]优先权

[32]95.12.7 [33]US[31]008,337

[71]申请人 美国家用产品公司

地址 美国新泽西州

[72]发明人 S·S·-H·林

K·L·莫尔纳-金伯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 王其灏

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 神经保护剂

[57]摘要

本发明提供一种方法，该方法采用选自下组的化合物作为神经保护剂：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的 1, 3-Diels Alder 加合物、4-[[4-(二甲氨基)苯基]偶氮]苯磺酸的雷帕霉素 42-酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的 Diels Alder 加合物，或雷帕霉素-O-苄基-27-酯。

(BJ)第 1456 号

权 利 要 求 书

1. 一种抑制需治疗的哺乳动物的神经元细胞死亡的方法，它包括经口服、非胃肠、血管内、鼻内、支气管内、透皮或经直肠途径向所述哺乳动物施用有效量的选自下组的化合物：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1, 3 - Diels Alder 加合物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素4 2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的1, 3 - Diels Alder 加合物，以及雷帕霉素-O - 苄基-2 7 - 脞。

2. 权利要求1 的方法，其中的化合物是雷帕霉素。

3. 一种治疗哺乳动物所患有的中风、脑损伤、或神经变性疾病的方法，它包括经口服、非胃肠、血管内、鼻内、支气管内、透皮或经直肠途径向所述哺乳动物施用有效量的选自下组的化合物：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1, 3 - Diels Alder 加合物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素4 2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的1, 3 - Diels Alder 加合物，以及雷帕霉素-氧-苄基-2 7 - 脞。

4. 权利要求3 的方法，其中的化合物是雷帕霉素。

5. 权利要求3 的方法，其中的神经变性疾病是选自下组的疾病：早老性痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、癫痫、亨廷顿舞蹈病，和帕金森病。

6. 权利要求5 的方法，其中的化合物是雷帕霉素。

7. 一种采用选自下组的化合物作为神经保护剂的方法：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1, 3 - Diels Alder 加合物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素4 2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的Diels Alder 加合物，以及雷帕霉素-O - 苄基-2 7 - 脞，该方法包括经口服、非胃肠、血管内、鼻内、支气管内、透皮，或经直肠途径向所需治疗的哺乳动物施用有效量的该化合物。

8. 权利要求7 的方法，其中的化合物是雷帕霉素。

9. 权利要求1 的方法，它还包括将化合物与NMDA 或AMPA 拮抗剂

结合施用。

10. 权利要求1的方法, 它还包括将化合物与NMDA和AMPA拮抗剂共同结合施用。

11. 权利要求3的方法, 它还包括将化合物与NMDA或AMPA拮抗剂结合施用。

12. 权利要求3的方法, 它还包括将化合物与NMDA或AMPA拮抗剂结合施用。

13. 权利要求7的方法, 它还包括将化合物与NMDA或AMPA拮抗剂结合施用。

14. 权利要求7的方法, 它还包括将化合物与NMDA或AMPA拮抗剂共同结合施用。

说 明 书

神经保护剂

在局部缺血、中风和脑损伤过程中神经元细胞死亡的机理被认为是谷氨酸诱发毒性。[Simon RP. *Science* 226:850 (1984); Benveniste H, J. *Neurochem.* 43:1369 (1984)]。该机理也涉及其它神经病学疾病, 如老年性痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症、癫痫、亨廷顿舞蹈病和帕金森病。[Beal F, *Nature* 321:168 (1986); Maragos WF, *Trends Neurosci.* 10:65 (1987); Greenamyre JT, *Neurobiol. Aging* 10:593 (1989); Koh JY, *Brain Res.* 533:315 (1990); Mattson MP, *J. Neurosci.* 12:376 (1992); Rothstein, JD, *New England J. Med.* 326:1464 (1992); Choi, DW, *New England J. Med.* 326(22):1493-4 (1992)]。在正常情况下谷氨酸是作为脑中的兴奋性神经介质。它由突触前点释放出, 并激活突触后神经元受体。激活的受体可使钠离子和钙离子流入细胞从而产生兴奋反应。这些兴奋性氨基酸的作用是由某些特殊受体亚型介导, 其中被深入研究的是N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体。过度激活NMDA复合受体会造成病理性的神经元过度兴奋。在病理情况下, 在细胞间液中积累过量水平的谷氨酸会导致谷氨酸受体的过度兴奋。这样会引起钠和钙的大量流入, 造成细胞内高水平的钙含量, 从而引发未知的细胞死亡过程。

目前研制的谷氨酸受体拮抗剂可防止中风或脑损伤后的神经元细胞死亡。[Hirose K, *Neurochem. Res.* 18:479 (1993); Dugan LL, *Annals of Neurology*, 35卷增补本S17-19 (1994)]大量的研究表明NMDA亚型受体的阻断可在模拟多种神经病理情况的动物模型中所发生的神经元的损伤和丧失明显减少。这些观察充分说明NMDA拮抗剂可在某些临床情况中提供神经保护。但许多

这类药物仅在损害或损伤后六小时内给药才会有效。这是因为通过电位差引起的钙通道钙进入细胞中，因而细胞内的钙水平也会增高。另外，由于正常的突触传导和脑活性需要激活谷氨酸受体，因此，很难采用谷氨酸受体阻断剂延长治疗。这样就限制了它们在慢性神经变性疾病中用作神经保护剂的作用。因此那些可防止细胞内钙增长后发生的神经细胞死亡的药物适用于延长对中风和脑损伤的治疗以及对神经变性疾病的慢性治疗。

有几种假设来说明细胞内高钙水平会导致细胞死亡。其一是假设激活了与钙有关的蛋白酶如钙蛋白酶。另一种假设是激活了与神经钙蛋白、钙/钙调节蛋白有关的磷酸酶，从而使氮氧化物合酶 (NOS) 脱磷酸化。NOS 的脱磷酸化可产生氮氧化物，它对细胞有毒。第三种假设是细胞内较高的钙水平引起了编程性细胞死亡或细胞程序死亡。这些不同的假设相互并不排斥，似乎这些假设以及其它未知的情况均由细胞内较高水平的钙会引起并造成细胞死亡。

在编程性细胞死亡中，细胞分裂所需的基因会被激活，似乎细胞就要分裂。[Heintz N, Trends -Biochem -Sci. 18:157 (1993)]。许多高度分化的细胞如神经元丧失了分裂能力并在分裂失败后死去。因此，某些可抑制细胞分裂的药物也可用来防止细胞进行编程性细胞死亡。

本发明提供一种方法，该方法采用选自下组的化合物用作神经保护剂：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1,3-Diels Alder 加成物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素4,2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的Diels Alder 加成物、以及雷帕霉素 - 氧 - 苄基 - 2,7 - 肟 (共同称作本发明的化合物)，该方法包括经口服、非胃肠、血管内、鼻内、支气管内、透皮、或经直肠等途径向所需治疗的哺乳动物施用该化合物。本发明特别提供一种治疗哺乳动物所患有的中风、脑损伤和神经变性疾病如早老性痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、癫痫、亨廷顿舞蹈病或帕金森病的方法，该方法包括经口服、非胃肠、血管内、鼻内、支气管内、透皮、或经直肠等途径向所需治疗的哺乳动物施用有效量的、选自下组的化合物：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1,3-Diels Alder 加成物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉

素4 2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的Diels Alder 加成物以及雷帕霉素-氧-苄基-2 7 - 脞。本发明的化合物也可用于抑制与上述病症有关的神经细胞死亡。

本发明还提供一种方法，该方法是将NMDA 和/ 或AMPA 拮抗剂与选自下组的化合物相结合用作神经保护剂：雷帕霉素、雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1, 3 -Diels Alder 加合物、4 - [[4 - (二甲氨基) 苄基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素4 2 - 酯、雷帕霉素的甲基三唑啉二酮的Diels Alder 加合物、以及雷帕霉素-氧-苄基-2 7 - 脞，以及提供治疗中风、脑损伤和神经变性疾病如老年性痴呆症、肌萎缩性侧索硬化症 (ALS)、癫痫、亨廷顿舞蹈病，或帕金森病的方法。本发明的化合物也可与NMDA 和/ 或AMPA 拮抗剂相结合用于抑制与上述疾病有关的神经细胞死亡。

当将本发明的化合物与NMDA 和/ 或AMPA 拮抗剂结合使用时，可将合剂同时施用或者先后施用，次序不限。

优选的NMDA 拮抗剂包括 [2 - (8, 9 - 二氧-2, 6 - 二氮杂双环 [5. 2. 0] - 壬-1 (7) - 烯-2 - 基) 乙基] 膦酸 (美国专利 5 1 6 8 1 0 3 已公开，在此作为参考)，D 氨基-5 - 膦酰基戊酸酯 (D - AP 5)，4 - 膦酰甲基-2 - 哌啶羧酸 (CGS 1 9 7 5 5)，D, L - (E) - 2 - 氨基-4 - 甲基膦酰基-3 - 戊酸 (CGP 3 7 8 4 9)，5, 7 - 二氮犬尿喹啉酸酯、反式-2 - 羧基-5, 7 - 二氮-4 - 苄基氨基羧基-1, 2, 3, 4 - 四氢喹啉 (L 6 8 9 5 6 0)，以及5, 7 - 二硝基喹啉-2, 3 - 二酮 (MNQX)；优选的AMPA 拮抗剂包括6 - (1 H - 咪唑-1 - 基) - 7 - 硝基-2, 3 (1 H, 4 H) - 喹啉二酮的盐酸化物 (YM9 0 K) (J. Med. Chem. 3 7: 6 4 7 (1 9 9 4))，盐酸化1 - (4 - 氨基苄基) - 4 - 甲基-7, 8 - 亚甲基二氧-5 H - 2, 3 - 苯并二氮杂萘 (GYKI 5 2 4 6 6)，以及6 - 硝基-7 - 氮磺酰苯并 (f) 喹啉-2, 3 - 二酮 (NBQX)，6 - 氨基-7 - 硝基喹啉-2, 3 - 二酮 (CNQX)，以及，6, 7 - 二硝基喹啉-2, 3 - 二酮 (DNQX)。

治疗包括对正发作病症进行治疗、对病症发展的抑制、对病症的改善，以

及对病症的缓解。

通过以下模拟哺乳动物神经毒性的体外标准药理试验来说明本发明的化合物可用作神经保护剂。

第一步标准药理试验说明本发明的化合物可以抑制由谷氨酸诱发的毒性造成的神经细胞死亡。简单地说，是通过对Furshpan和Potter法进行了某些改善后的方法来制备鼠的海马和神经皮质培养物。[Neuron 3: 199 (1989)]。从经过注射0.1 ml 20%水合氯醛麻醉的Long Evans小狗中取下脑。解剖其海马，并将其从其余的皮质中分离下来。在37°C下经轻轻摇动使该两组织在5 ml含有20 μ/ml木瓜蛋白酶、1 mM L-半胱氨酸和0.5 mM EDTA的Earle's平衡盐溶液(EBS)中酶化解离30分钟。然后用EBS清洗海马和神经皮质组织一次，通过在37°C下用3-5 ml抑制剂溶液培养30分钟停止解离，该抑制剂溶液是含有1 mg/ml卵类粘蛋白和1 mg/ml白蛋白的EBS溶液。

将经解离的海马和神经皮质组织用含有4.5 g/L右旋葡萄糖而不含L-谷氨酰胺的DME清洗两次，然后用2 ml添加有5%胎牛血清、5%鼠血清、50 μ/ml青霉素、0.05 mg/ml链霉素和MITO+血清增量剂[由Collaborative Biomedical Products出品的一种培养基添加剂](10%DME)的DME研磨。经50次研磨，使未解离的组织沉降，分离出解离细胞的悬浮液。将2 ml新鲜的10%DME加入剩余的组织中并继续研磨。将两份细胞悬浮液混合，并用血细胞计数器测定细胞浓度。

96孔板的每一孔中加有150 μL的30000个海马细胞，并在37°C、5%CO₂条件下培养。将神经皮质细胞置于24孔板中，浓度为每孔500000个细胞。当神经胶质细胞融聚时(约3天后)，在每孔中加入4-10 μM胞嘧啶β-D-阿拉伯呋喃糖苷以防止细胞进一步增生。静置一周后，除去培养基，并换成添加有2.5%胎牛血清、2.5%鼠血清、50 μ/ml青霉素、0.05 mg/ml链霉素和MITO+ 1 mM犬尿喹啉酸酯和10 mM MgCl₂ (5%DME+KM)的DME补充剂。犬尿喹啉酸酯是非特异的谷氨酸受体的阻断剂，镁水平的增高可阻断NMDA受体通

道中钙和钠的流入。加入KM可防止由血清中的谷氨酸产生的神经毒性，并使神经元在培养过程中保持几个月不变。细胞需经每周加液，即除去一半培养基，更换新鲜的5%DME+KM。

将被测化合物溶于DMSO中制成1.0mM原液，并分成等份在-80℃下保藏。在每一试验步骤实施前，需将各等份的原液解冻，并在DME中或者Hank's平衡盐溶液(HBSS)中稀释，以达到1nM至10μM的被测浓度，Hank's平衡盐溶液(HBSS)中含有4.4mM碳酸氢钠、1.0mM葡萄糖，以及30μM谷氨酸。

经4-12周培养后，将海马细胞清洗三次，并加入溶于HBSS的被测化合物，或者加入不含DME(SF DME)的血清以及30-150μM的谷氨酸。在每一试验步骤中，每种不同药物浓度处理至少三孔的细胞。30μM谷氨酸可杀死初期培养物中70-80%的神经元，并可杀死后期培养物中更多的神经元。由30μM谷氨酸诱发的毒性可被1mM犬尿喹啉酸酯+1.0mM MgCl₂ (KM) 阻断。

经37℃下培养过夜，测定每孔中以下5个区域中存活的海马神经元的数目：北、南、东和西端及中央部份。采用15x的目镜，通过10x物镜对每一区域进行目测，并且所测定的每个区域约为1.54mm²。每种情况一般重复三次。计算每一情况下每孔中神经元的平均数和标准误差。在作对比的30μM谷氨酸条件下仍存活的神经元平均数表示其对谷氨酸毒性不敏感。

下表所示的是由实施例1的化合物所得的结果。

化合物	浓度	存活的神经元数	S. D.
实施例1	10nM	114	5
实施例1	100nM	92	38
实施例1	1μM	46	10
实施例1	10μM	47	20
SF DME		28	4
犬尿喹啉酸酯	1mM	82	17

下表所示的是采用本发明的化合物所得的试验结果。

化合物	浓度	存活的神经元数	S . D .
实施例1	200nM	229	30
实施例1	20nM	71	3
实施例1	2nM	63	4
实施例2	200nM	127	38
实施例2	20nM	180	64
实施例2	2nM	110	36
实施例3	200nM	241	46
实施例3	20nM	285	40
实施例3	2nM	98	21
实施例4	200nM	157	56
实施例4	20nM	130	29
实施例4	2nM	117	32
实施例5	200nM	135	11
实施例5	20nM	96	12
实施例5	2nM	131	19
犬尿喹啉酸酯	1mM	202	40
H B S S		53	25

该标准药物试验的结果表明本发明的化合物可抑制谷氨酸诱发的毒性，因此可用作神经保护剂。如第一个表所示，证明实施例1的化合物在低浓度（10 n M和100 n M）时比实施例1的化合物在高浓度（1 μ M和10 μ M）时的效果好，可能是由于实施例1的化合物在该高浓度下会产生某种程度的细胞毒作用。评估结果表明，在模拟哺乳动物神经毒性时，浓度范围在2 - 200 n M的本发明的化合物对谷氨酸诱发的毒性具有神经保护活性。该化合物在谷氨酸浓度较高（75 μ M）时不能防止神经元细胞死亡。对于对谷氨酸毒性更为敏感的后期海马培养物（大于8周）中谷氨酸诱发的毒性，本发明化合物用作神经保护剂的效果减弱。

第二步体外标准药理试验表明，本发明的化合物可以增强已知的NMDA和AMPA抑制剂的神经保护作用。简单地说，按如前所述的方法将神经皮质

培养物在24孔板中培养8周。将神经皮质细胞用不含葡萄糖的DME清洗6次(该DEM是经向介质中鼓入95% N₂/5% CO₂脱氧至少10分钟制成的)以诱发局部缺血从而造成神经细胞死亡,可通过测定乳酸脱氢酶的水平,因为每孔中LDH活性量与死细胞数直接相关。在特定孔中分别加入100 μM [2-(8,9-二氧-2,6-二氮杂双环[5.2.0]壬-1(7)-烯-2-基)乙基]磷酸(美国专利5168103已公开,在此作为参考)和10 μM YM90K以阻断NMDA和AMPA谷氨酸受体。在待测孔中加入1 μM实施例1的化合物。用含有葡萄糖和100 μM [2-(8,9-二氧-2,6-二氮杂双环[5.2.0.]壬-1(7)-烯-2-基)乙基]磷酸的普通DME清洗作对比的孔。在发生局部缺血后的不同时刻分别从每孔中取5 μL试样,并通过向每一试样中加入250 μmL的2 mg NADH/25 mL磷酸盐缓冲剂来测定试样中的LDH活性。经20-30分钟培养后,加入10 μL 2.7 mM丙酮酸盐,在340 nm读取光密度(OD)。光密度随时间的变量(mOD/min)所反映的就是试样中LDH的量。较高的光密度变量意味着较多的LDH活性,即表示较多的细胞死亡。每种情况下从4-8孔中取样,并测定每一情况下的平均值和标准误差。所得的结果如下表所示。

LDH活性(±标准误差)				
时间(h)	对照组	Ischemia	AMPA/NMDA	AMPA/NMDA/实施例1
0	0.31 ± 0.41	0.27 ± 0.05	0.69 ± 0.70	0.67 ± 0.29
0.5	0.51 ± 0.14	0.57 ± 0.29	0.45 ± 0.25	0.80 ± 0.28
1	0.40 ± 0.07	0.56 ± 0.16	0.46 ± 0.23	0.90 ± 0.37
1.5	0.43 ± 0.15	0.84 ± 0.44	0.38 ± 0.30	1.03 ± 0.32
4	0.64 ± 0.01	9.11 ± 1.63	2.29 ± 0.50	2.09 ± 0.58
5	0.68 ± 0.20	31.65 ± 5.76	16.07 ± 2.9	4.21 ± 1.02
6	0.78 ± 0.22	40.52 ± 6.43	29.99 ± 9.11	9.11 ± 7.04
7	1.28 ± 0.41	50.30 ± 6.96	44.56 ± 7.73	15.77 ± 4.68
8	1.15 ± 0.28	60.05 ± 8.66	61.77 ± 13.96	24.43 ± 7.87

经模拟局部缺血神经毒性的标准试验步骤测试本发明的化合物，所采用的神经皮质培养物不包括经1周培养后的，因其对局部缺血引起的神经毒性不敏感。按如前所述的方法将被测化合物与NMDA和AMPA抑制剂一同施用。同时还测试环孢菌素以作为对照。

<u>时间 (小时)</u>	<u>LDH 活性</u>	<u>标准误差</u>
<u>对照组</u>		
8	0 . 3 0	0 . 5 4
1 3	1 . 3 7	1 . 5 8
2 4	2 . 9 7	2 . 6 7
3 0	4 . 4 4	2 . 5 0
<u>局部缺血</u>		
8	0 . 4 9	0 . 3 6
1 3	6 . 1 7	1 . 1 0
2 4	1 6 . 4 0	4 . 2 9
3 0	2 1 . 4 9	3 . 3 5
<u>实施例1</u>		
8	1 . 0 4	0 . 2 0
1 3	3 . 0 8	0 . 7 1
2 4	9 . 0 0	1 . 6 4
3 0	1 4 . 0 2	2 . 4
<u>实施例2</u>		
8	1 . 0 8	0 . 3 4
1 3	2 . 3 1	1 . 4 1
2 4	7 . 6 9	3 . 1 3
3 0	1 2 . 4 3	3 . 8 5
<u>实施例3</u>		
8	0 . 8 4	0 . 2 0
1 3	2 . 3 6	1 . 4 1
2 4	7 . 0 3	3 . 2 4
3 0	1 1 . 2 5	2 . 6 2
<u>实施例4</u>		
8	0 . 9 1	0 . 3 4
1 3	2 . 5 4	1 . 0 2
2 4	8 . 2 1	4 . 1 4
3 0	1 3 . 3 1	3 . 4 1
<u>实施例5</u>		
8	0 . 7 4	0 . 3 8
1 3	1 . 6 5	0 . 8 1
2 4	4 . 8 2	1 . 4 2
3 0	8 . 8 3	2 . 4 1
<u>环孢菌素</u>		
8	1 . 5 4	0 . 6 3
1 3	3 . 3 1	1 . 3 7
2 4	8 . 4 5	1 . 9 4
3 0	1 3 . 5 9	2 . 3 4

该标准药物试验步骤的结果表明本发明的化合物可以增强NMDA和AMP A抑制剂抑制局部缺血诱发的神经毒性的神经保护作用。

本发明的化合物可单独地或与可药用的载体制成哺乳动物所需的制剂。该药物载体可为固体或液体。制备口服制剂时，发现采用0.01%溶于PHOSAL PG-50（含1,2-丙二醇的浓缩磷脂，A. Nattermann & Cie. GmbH）的Tween 80可得到适宜的口服制剂。

固体载体可包括一种或多种物质，它们也可用作调味剂、润滑剂、增溶剂、悬浮剂、填充剂、助流剂、压缩助剂、结合剂或片剂崩解剂；它也可以是胶囊包封材料。制备粉剂时，载体被分成粉状固体，并与分成粉状的活性成分混合。制备片剂时，按照适宜的比例将活性成分与具有所需压缩特性的载体相混合，压制成所需的形状和大小。该粉剂和片剂优选含有99%的活性成分。适用的固体载体包括，例如，磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、糖、乳糖、葡萄糖、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。

液体载体用于制备溶液剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、酏剂和加压组合物。活性成分可溶解或悬浮于可药用的液体载体中，如水、有机溶剂、两者的混合物或者可药用的油或脂肪。液体载体中可含有其它可药用的添加剂，如增溶剂、乳化剂、缓冲剂、防腐剂、甜味剂、调味剂、悬浮剂、增稠剂、着色剂、粘度调节剂、稳定剂或渗透压调节剂。适于口服或非胃肠施用的液体载体的实例包括水（可含有部分上述的添加剂，例如纤维素衍生物，优选羧甲基纤维素钠溶液）、醇（包括一元醇和多元醇，例如二醇类）及其衍生物、l e t h i c i n s、和油（例如分馏椰子油和花生油）。用于非胃肠给药时，载体可为油性酯类如油酸乙酯和十四烷酸异丙酯。无菌液体载体可用于经非胃肠给药的无菌液体组合物中。用于加压组合物的液体载体可以是卤代烃或其它可药用的助推剂。

液体药物组合物，即无菌溶液或混悬液可经例如肌内、腹膜内或皮下注射途径施用。无菌溶液也可经静脉内给药。本发明的化合物也可以液体或固体组合物形式经口服给药。

本发明的组合物也可以常规栓剂的形式经直肠给药。当经鼻内或支气管内

吸入或吹入给药时，可将雷帕霉素制成含水或部分含水的溶液，使其可以气雾剂形式施用。本发明的化合物也可经透皮给药，所采用的透皮贴剂对皮肤无毒，它含有活性化合物和对该活性化合物无毒的载体，并且它可以使药物经皮肤传入而被血流系统吸收。所采用的载体可以是多种形式，如膏霜、软膏、糊剂、凝胶，以及夹层装置。膏霜和软膏可以是水包油或油包水型的粘稠液体或者半固体的乳化体。由分散于石油或亲水石油中、并含有活性成分的吸收性粉末构成的糊剂也适用。可采用多种夹层装置以使活性成分释放入血液中，该夹层装置如被含活性成分且含或不含载体的储层覆盖的半透膜，或者含有活性成分的基层。其它夹层装置也是文献中已知的。

所需剂量根据所使用的特定组合物、给药途径、症状表现的严重程度和所治疗的特定对象而有所不同。根据标准药理试验步骤所得的结果，活性成分的静脉内每日具体剂量为 $0.1 \mu\text{g} / \text{kg} - 100 \text{mg} / \text{kg}$ ，优选 $0.001 - 25 \text{mg} / \text{kg}$ ，更优选 $0.01 - 5 \text{mg} / \text{kg}$ 。口服每日具体剂量为 $0.005 - 50 \text{mg} / \text{kg}$ ，优选 $0.01 - 25 \text{mg} / \text{kg}$ ，更优选 $0.05 - 10 \text{mg} / \text{kg}$ 。开始治疗时，一般采用低于最佳剂量的小剂量的化合物。然后剂量逐渐增加，直到达到在该情况下所能达到的最佳效果。口服、非胃肠、鼻内或支气管内给药的确切剂量由给药医师根据对所治疗的特定对象的经验而确定。药物组合物优选为单位剂型，例如片剂或胶囊。这种剂型中，组合物被再分为含有适量活性成分的单位剂量；单位剂型可以是小包装的组合物，例如小包装的粉剂、小瓶、安瓿、预充液注射器或含液扁囊。单位剂型可以是例如胶囊或片剂本身，或者也可以是适量的该小包装形式的组合物。

通过以下实施例说明本发明化合物的制备。

实施例1

雷帕霉素

在美国专利3 9 2 9 9 9 2 中描述了雷帕霉素的制备，在此作为参考。

实施例2

雷帕霉素的苯基三唑啉二酮的1, 3 Diels Alder 加成物

将雷帕霉素 (0.66 g, 7.21 mmol) 溶于二氯甲烷 (10 ml) 中, 并冷却至 0 °C。向其中滴加溶于二氯甲烷 (10 ml) 的苯基三唑啉二酮 (0.133 g, 7.58 mmol)。将该溶液搅拌过夜, TLC 显示反应未完成。再加入苯基三唑啉二酮 (0.025 g, 2.7 mmol)。该反应采用乙酸乙酯作洗脱剂, 经 HPLC (4.1 × 3.1 cm, SiO₂) 纯化得到固体的标题化合物。将该固体用 30 ml 己烷和 1 ml 乙酸乙酯研磨过滤, 风干得到粉状的标题化合物 (0.383 g)。

C₅₉H₈₄N₄O₁₅ 的分析计算值: C, 65.05; H, 7.77; N, 5.14。

实测值 C, 65.39; H, 7.98; N, 4.92

IR (KBr, cm⁻¹) 3450, 1715

NMR (DMSO) δ 7.50 (m, 3 H), 7.40 (m, 2 H), 3.11 (s, 3 H), 3.00 (s, 3 H), 2.95 (s, 3 H), 0.8 (q, 1 H)

MS (-FAB) 1088 (M⁻)

实施例3

4 - [4 - (二甲氨基) 苯基] 偶氮] 苯磺酸的雷帕霉素 4,2 - 酯

在美国专利 5 177 203 中公开了实施例3 的化合物的制备, 在此作为参考。

实施例4

雷帕霉素的甲基三唑啉二酮 1,3 - Diels Alder 加合物

按实施例2 所述的方法制备标题化合物。

实施例5

雷帕霉素 - O - 苄基 - 2,7 - 脞

在美国专利 5 023 265 中公开了实施例5 的化合物的制备, 在此作为参考。