

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C07D 491/06 (2006.01)

A61K 31/395 (2006.01)



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03807799. X

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100522967C

[22] 申请日 2003.2.3 [21] 申请号 03807799. X

[30] 优先权

[32] 2002. 2. 1 [33] US [31] 60/353,252

[32] 2002. 11. 15 [33] US [31] 60/426,928

[32] 2002. 11. 22 [33] US [31] 60/428,383

[32] 2002. 12. 17 [33] US [31] 60/433,930

[86] 国际申请 PCT/US2003/003030 2003. 2. 3

[87] 国际公布 WO2003/064383 英 2003. 8. 7

[85] 进入国家阶段日期 2004. 10. 8

[73] 专利权人 阿里亚德基因治疗公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 戴维·L·伯斯坦

切斯特·A·梅特卡夫第三

伦纳德·W·罗扎穆斯 王义汉

[56] 参考文献

US5391730A 1995. 2. 21

审查员 林琳

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 张平元 赵仁临

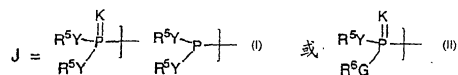
权利要求书 8 页 说明书 86 页

[54] 发明名称

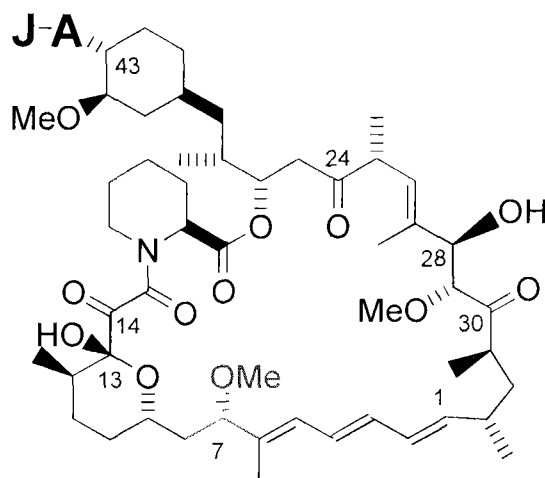
含磷化合物及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一系列新的含磷化合物，这些化合物包含 JQA - 部分，其中：A 不存在或是 -O-、-S- 或 -NR<sup>2</sup>-；Q 不存在或(如果 A 是 -O-、-S- 或 -NR<sup>2</sup>-)Q 可以是 -V-、-OV-、-SV- 或 -NR<sup>2</sup>V-，这里 V 是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分，这样 J 通过 A 或 VA、OVA、SVA 或 NR<sup>2</sup>VA 与环己烷环直接相连；J = (I) - 或 (II) -，K 是 O 或 S；各次出现的 Y 独立是 -O-、-S-、-NR<sup>2</sup>-，或是连接 R<sup>5</sup> 部分与 P 的化学键，其它取代基如说明书中定义。



1. 下述通式的化合物或其药学上可接受的盐，



其中

A 是 -O-;

J 是  $\begin{matrix} \text{K} \\ \parallel \\ \text{R}^5\text{Y}-\text{P} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}^5\text{Y} \quad \text{---} \end{matrix}$  ;

K 是 O;

各次出现的 Y 独立是 -O-、-NR<sup>2</sup>-，或是化学键；

各次出现的 R<sup>2</sup> 是 H 以及各次出现的 R<sup>5</sup> 独立是 H、脂肪族、杂脂肪族或芳基，只要 P-YR<sup>5</sup> 不是 P-H；

其中各脂肪族部分包含 1-8 个邻近的脂肪族碳原子；各杂脂肪族部分是指含有一个或多个替换碳原子的氧、硫、氮、磷或硅原子的脂肪族部分；并且各芳基部分是指五元至十四元芳香环基团；并且脂肪族部分为烷基；

其中前述的各脂肪族以及杂脂肪族独立地为直链的或者支链的，或者环状的或者多环的，以及未被取代的或者被一个或者多个选自下述基团中的取代基取代：卤素、烷氧基或羟基；以及

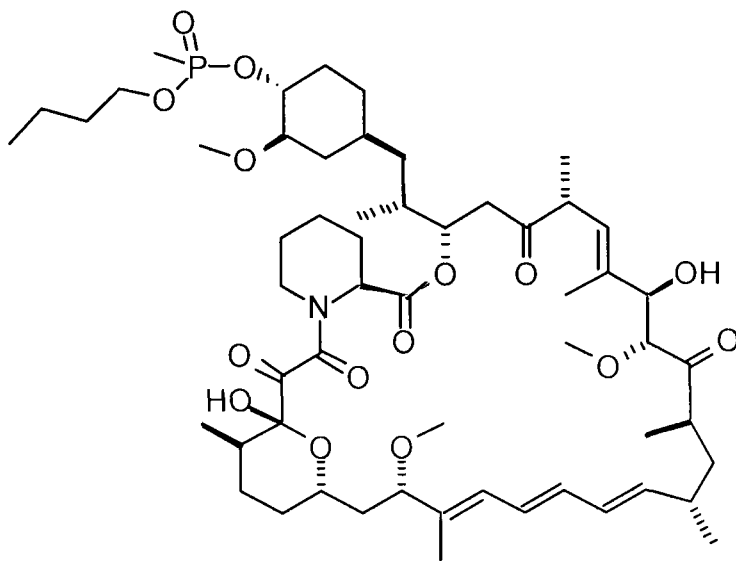
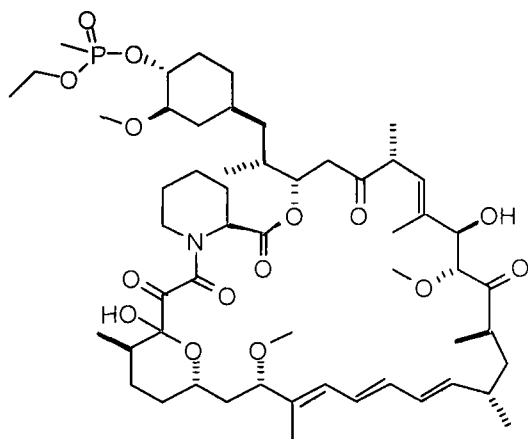
各芳基部分独立地未被取代或者被一个或多个选自下述基团中的取代基取代：卤素、烷氧基或羟基；

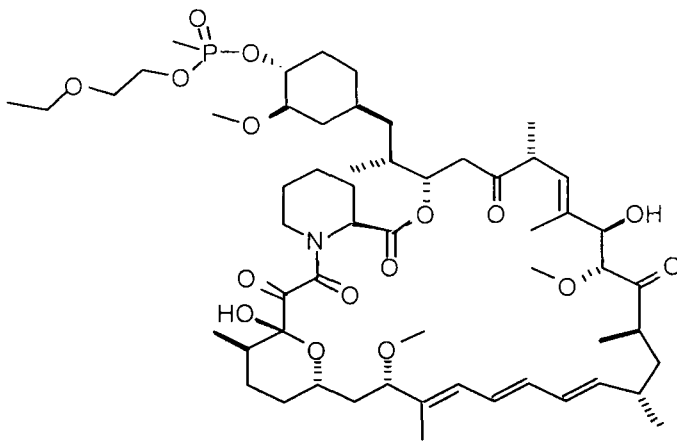
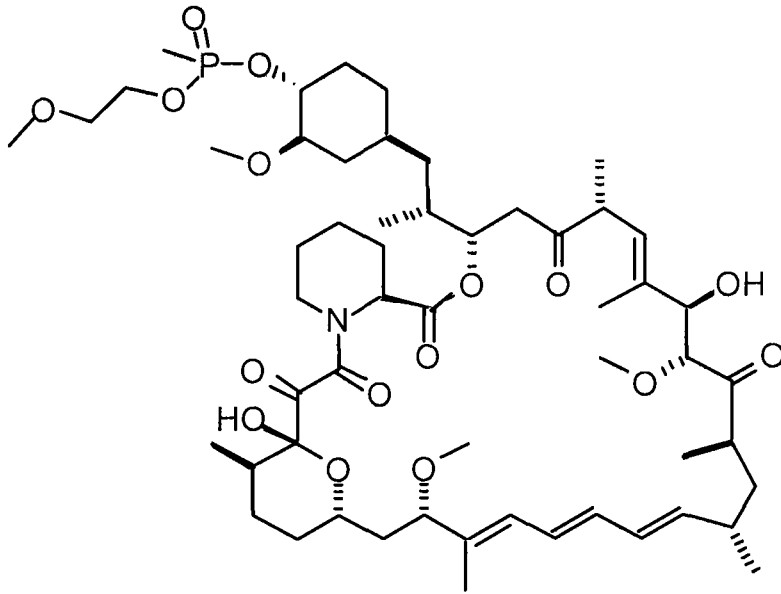
其中烷基或者烷氧基包含 1-8 个邻近的脂肪族碳原子；

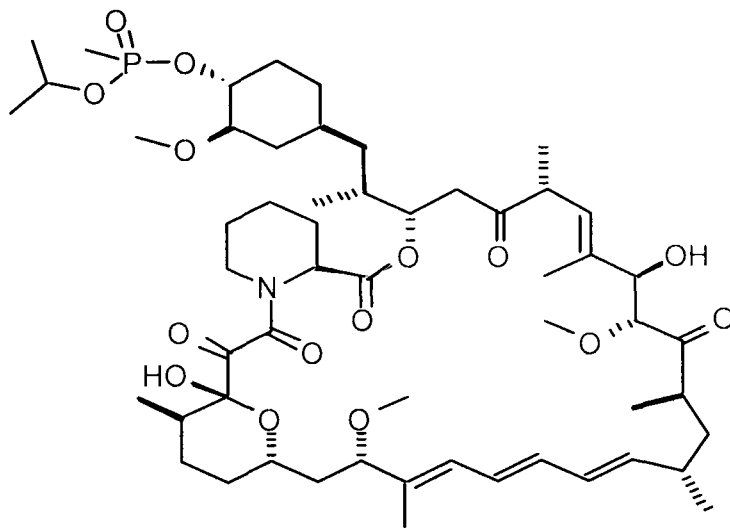
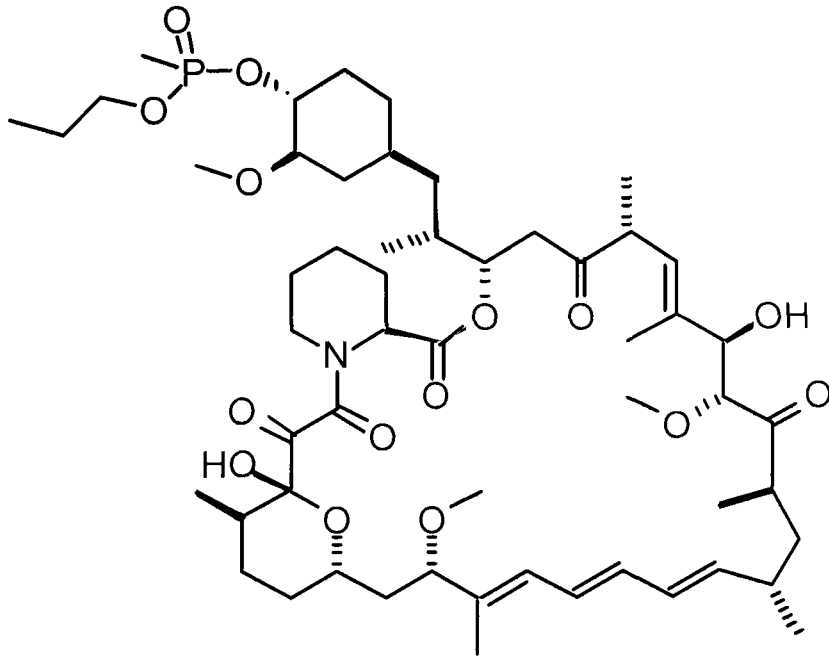
条件是 (a) J-A- 不是 (HO)<sub>2</sub>(P=O)O- 或 (MeO)<sub>2</sub>(P=O)O-；和 (b) 如果 JA- 是 (R<sup>2</sup>Y)(Me)(P=O)O-，那么 (R<sup>2</sup>Y) 不是免疫原性载体物质、检测器载体物质或固体基质。

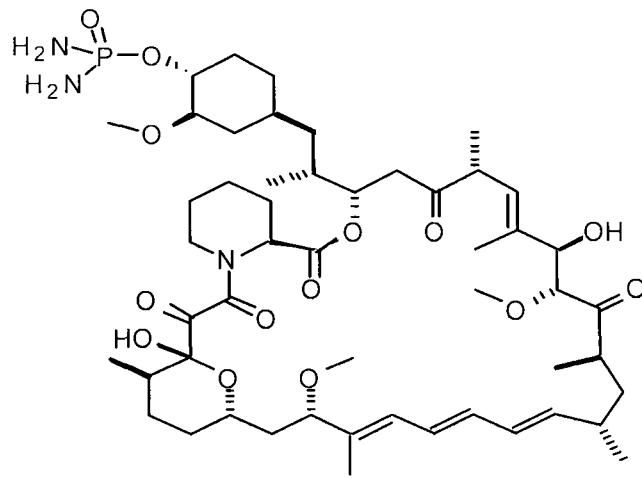
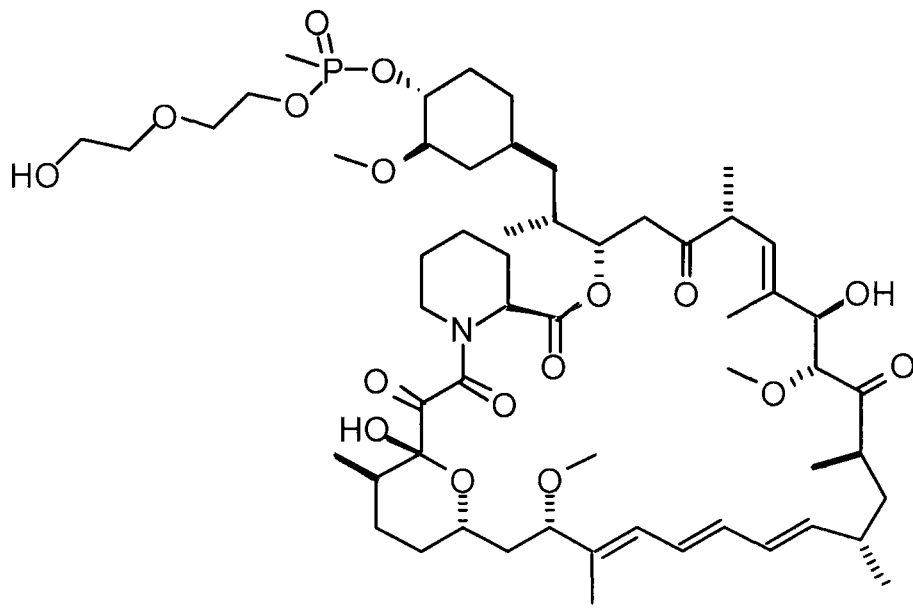
2. 权利要求1的化合物，其中各次出现的  $R^5$  独立选自任选被一个或者多个卤素、烷氧基或者羟基取代的 C1-C6 烷基；其中作为取代基的烷氧基包含 1-8 个邻近的脂肪族碳原子。

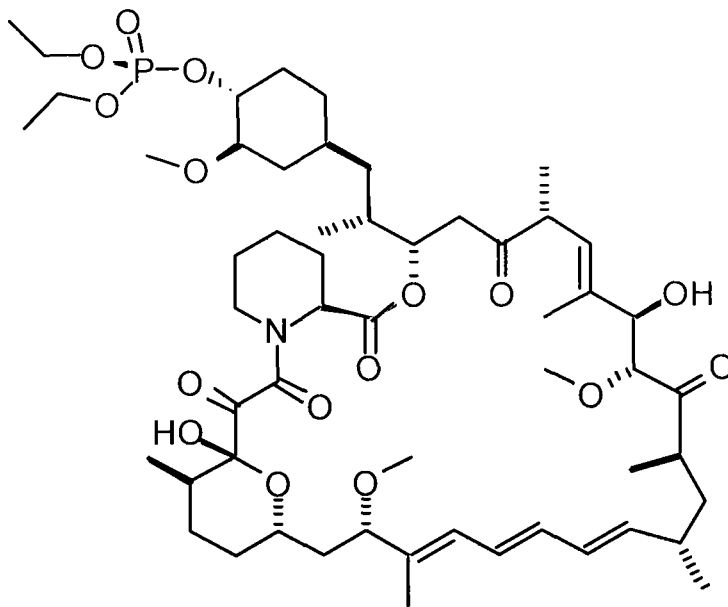
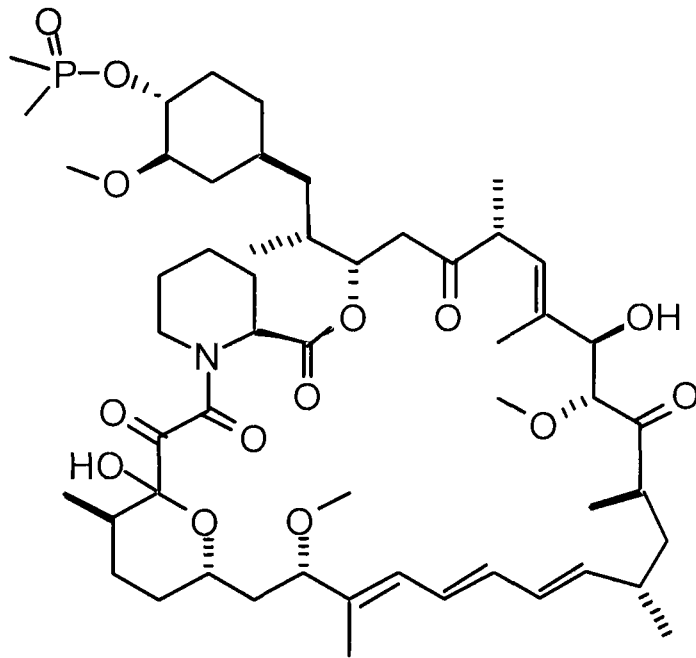
3. 权利要求1的化合物，所述的化合物选自下述化合物：

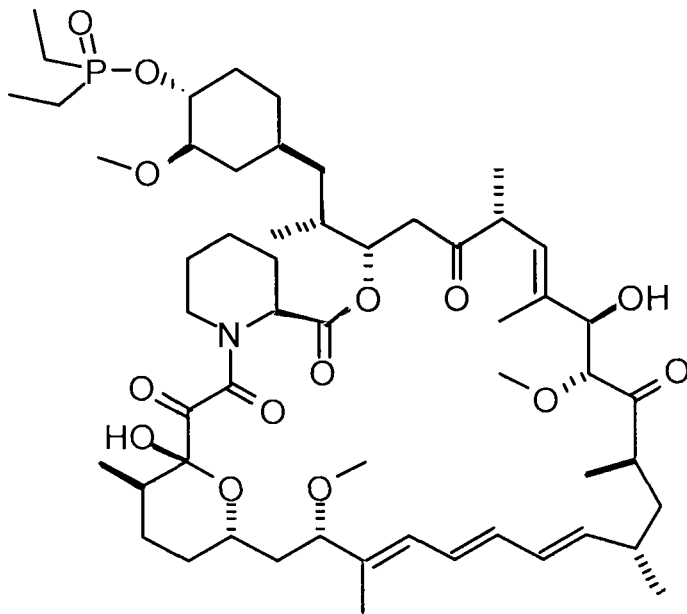
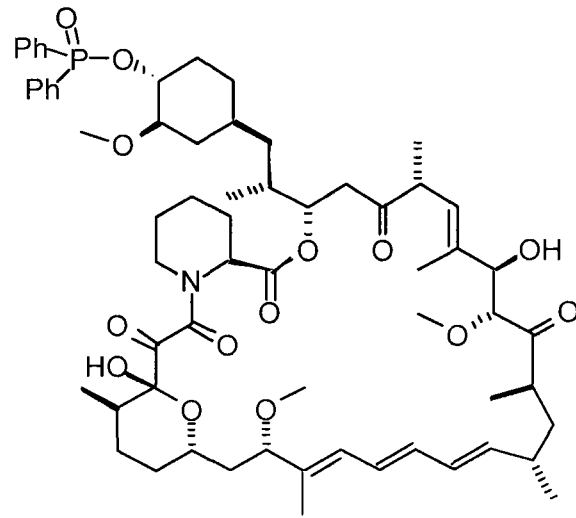






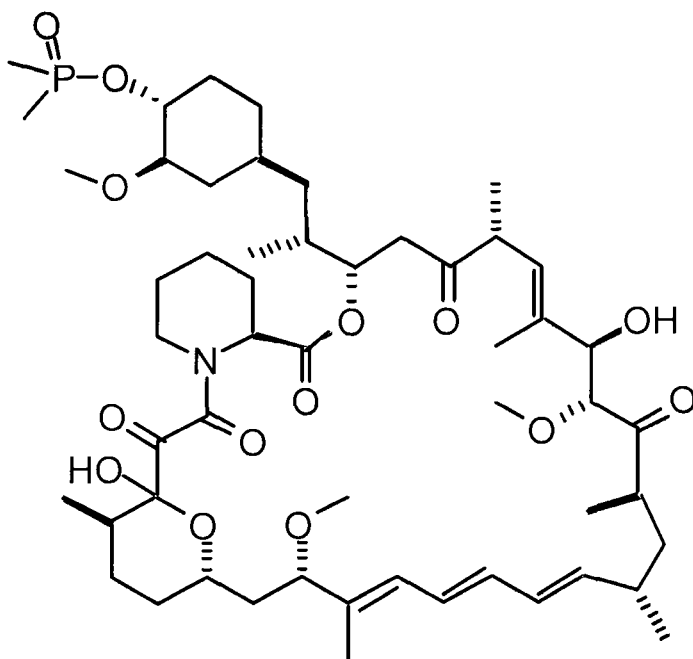








4. 权利要求1的化合物，所述的化合物为下式化合物：



5. 一种组合物，包含(a)权利要求1~4中任一项的化合物，和(b)药学上可接受的载体，任选地包含(c)一种或多种药学上可接受的赋形剂。

6. 权利要求5的组合物，适于口服给予哺乳动物。

7. 权利要求5的组合物，适于胃肠外给予哺乳动物。

8. 权利要求1~4中任一项的化合物在制备用于治疗胶质母细胞瘤、肉瘤、白血病、乳癌、胰癌、肺癌或结肠癌的药物中的用途。

## 含磷化合物及其应用

## 发明背景

雷帕霉素(rapamycin)是由吸水性链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)产生的大环内酯抗生素。其与FK506结合蛋白,FKBP12以高亲和力结合形成雷帕霉素:FKBP复合物。据报道它们相互作用的Kd值低至200 pM。雷帕霉素:FKBP复合物与大细胞蛋白,FRAP,以高亲和力结合形成三聚体,[FKBP:雷帕霉素]:[FRAP]复合物。在此复合物中,雷帕霉素可被看作为连接FKB和FRAP的二聚因子或转接子。复合物的形成与雷帕霉素的多种生物活性有关。

雷帕霉素是一种有效的免疫抑制剂,在临床上用于防止移植器官的排斥反应。雷帕霉素和/或其类似物,CCI 799(Wyeth)和SDZ Rad("RAD001", Novartis)是有前景的药物,可用于治疗某些癌症,用于免疫抑制和/或用于帮助降低介入性心脏治疗后再狭窄的几率。雷帕霉素还显示了作为抗真菌剂的活性,在实验性变应性脑脊髓炎模型(多发性硬化模型)、在非特异性关节炎模型(风湿性关节炎)、在抑制IgE样抗体的形成中均有活性,还可用于治疗或预防红斑狼疮、肺炎、胰岛素依赖型糖尿病、成人T-细胞白血病/淋巴瘤。参见如公开的美国专利申请2001/0010920。

由于可作为FKBP与FRAP复合物的转接子,雷帕霉素还可与恰当设计的嵌合蛋白聚合,这些嵌合蛋白合并了分别来源于FKBP和FRAP的区域。由于此活性,雷帕霉素和其各种衍生物或类似物已被用作激活基于这些嵌合蛋白的生物学转化的多聚试剂(multimerizing agent)。参见如WO96/41865; WO 99/36553; WO 01/14387; Rivera等, Proc Natl Acad Sci U S A 96, 8657-8662; 和Ye, X.等(1999) Science 283, 88-91。

雷帕霉素可用于缓解如此多的严重疾病的潜能激发了对雷帕霉素类似物的研究,以期开发出治疗指数、药物动力学、制剂性能、生产的简易性或经济性等均得以改善的类似物。制药工业和学术研究者在过去几十年的研究中一直持续。这导致了对影响雷帕霉素化学转化的材料和方法的探究,包括还原酮基、脱甲基化、差向异构化、对羟基的各种酰基化或烷基化等。

现已报道了大量结构不同的雷帕霉素，典型地是以发酵产物替换物和/或经合成加工的形式出现。例如，已有大量的文献报导了与雷帕霉素结构相关的类似物、同系物、衍生物以及其它化合物(雷帕类似物，“rapalogs”)，尤其包括对雷帕霉素进行了一种或多种如下修饰的雷帕霉素派生物：去甲基化，去除或替换 C7、C42 和/或 C29 位甲氧基；去除、衍生或替换 C13、C43 和/或 C28 位羟基；还原、去除或衍生 C14、C24 和/或 C30 位酮基；使用 5 元脯氨酰环替换 6 元哌啶酯环；以及替换环己烷环上的取代基或以取代的环己烷环替换环己烷环。US5,525,610；5,310,903 和 5,362,718 的背景部分介绍了其它已有的信息。还可参见 US5,527,907。对 C-28 羟基的差向异构化具有显著效果和选择性的材料和方法已被开发出来(WO 01/14387)。

具有低的免疫抑制活性和/或有效的药物动力学或生物利用度性能的新雷帕类似物非常适于用作多聚试剂或抗真菌剂。

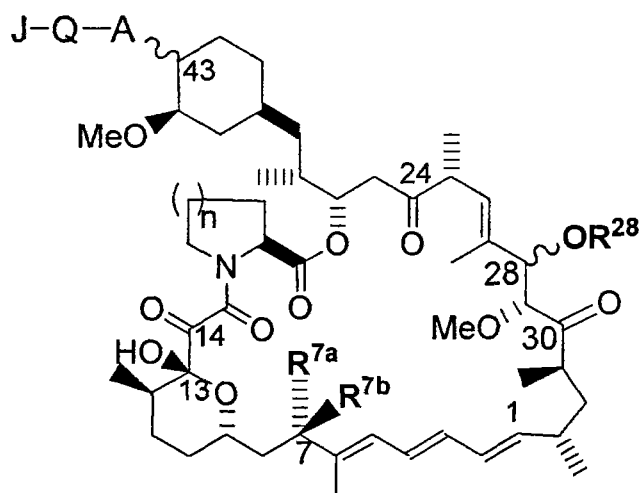
相对于雷帕霉素具有出色的理化或功能特性(如治疗指数、生物利用度、药物动力学、稳定性等方面)的新雷帕类似物也将具有如上所述的多种药用价值，尤其包括用作免疫抑制剂、抗癌剂和降低介入性心脏治疗(如，含药支架)后再狭窄的几率。

目前被认为可用作免疫抑制剂进入临床开发的雷帕类似物仅为那些经相当谨慎传统的结构修饰的化合物，即，在 C-43 位酰化或烷基化(分别如 CCI 779 和 SDZ RAD；参见如，Yu, K. 等，Endocrine-Related Cancer (2001) 8, 249-258；Geoerger, B. 等，Cancer Res. (2001) 61 1527-1532) 和 Dancey, Hematol Oncol Clin N Am 16 (2002): 1101 - 1114。

本发明下面的描述与传统的雷帕类似物的设计方法差别很大，本设计是基于结合含磷部分的新雷帕类似物。

#### 发明概述

本发明化合物包括一系列新的式(I)化合物：

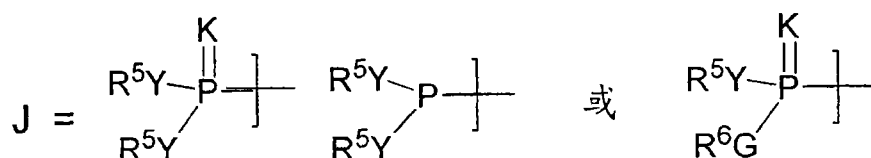


以及其药学上可接受的衍生物。还提供了含有这些化合物的组合物及其应用。

在本发明化合物中，

A 是 -O-、-S- 或  $-NR^2-$ ，或不存在(即，连接 JQ-与碳 43 的共价键)；

Q 不存在(即，连接 J 与 A 或碳 43 的共价键)或，如果 A 是 -O-、-S- 或  $-NR^2-$ ，Q 可以是 -V-、-OV-、-SV- 或  $-NR^2V-$ ，这里 V 是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分，这样 J 通过 A 或 VA、OVA、SVA 或  $NR^2VA$  与环己烷环直接相连；



K 是 O 或 S；

各次出现的 Y 独立是 -O-、-S-、 $-NR^2-$ ，或是连接  $R^5$  部分与 P 的化学键；

各次出现的  $R^2$  和  $R^5$  独立是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分，或是 H；各次出现的  $R^6$  独立是  $R^5$ 、 $-\text{PK}(\text{YR}^5)(\text{YR}^5)$ 、 $-\text{SO}_2(\text{YR}^5)$  或  $-\text{C}(\text{O})(\text{YR}^5)$ ；只要与 P 直接相连的任何  $R^2$ 、 $R^5$  或  $R^6$  部分不是 H(如， $-\text{PR}^2$ 、 $-\text{PR}^5$  和  $-\text{PR}^6$  不能是 -PH)；

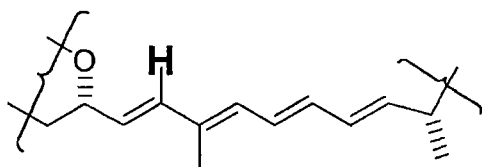
其中两个  $R^2$ 、 $R^5$  和/或  $R^6$  部分可通过化学键相互相连形成环；

各次出现的 G 独立是 -O-、-S-、 $-NR^2-$ 、 $(\text{M})_x$  或是连接  $R^6$  部分与 P 的化学键；

各次出现的 M 独立是取代或未取代的亚甲基部分，任何 M-M' 部分可以是饱和的或不饱和的；

各次出现的  $x$  独立是 0-6 的整数;

$R^{7a}$  和  $R^{7b}$  之一是 H 且另一个是 H、卤素、 $-R^A$ 、 $-OR^A$ 、 $-SR^A$ 、 $-OC(O)R^A$ 、 $-OC(O)NR^A R^B$ 、 $-NR^A R^B$ 、 $-NR^B C(O)R^A$ 、 $-NR^B C(O)OR^A$ 、 $-NR^B SO_2 R^A$  或  $-NR^B SO_2 NR^A R^B$ ; 或  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  一起构成四烯部分的 H:

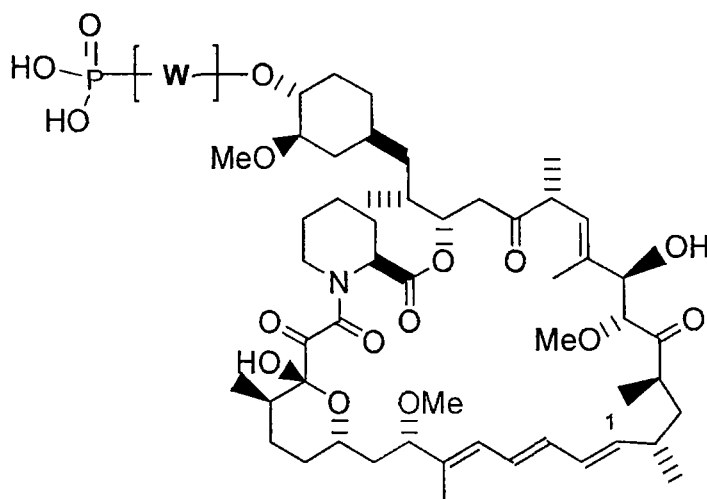


这里  $R^A$  是  $R^2$  且  $R^B$  是 OH 或  $R^2$ 。在一些情况下  $R^A$  和  $R^B$  之一或二者均是 H;

$R^{28}$  是氢; J; 或是脂肪族、杂脂肪族、芳基、杂芳基、酰基、芳酰基或杂芳酰基部分; 且  $n$  是 1 或 2;

其中前述的各脂肪族和杂脂肪族部分独立是直链或支链的、环形或非环形的、取代或未取代的、各芳基、杂芳基、酰基、芳酰基或杂芳酰基部分独立是取代或未取代的;

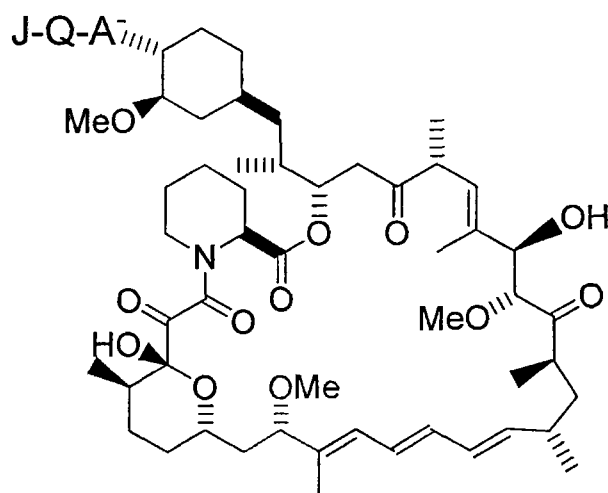
条件是(a)如果 JQA-是  $(R^2 Y)(Me)(P=O)O-$ , 那么  $(R^2 Y)$  (i)不是免疫原性载体物质、检测器载体物质或固体基质, 或(ii)  $R^2$  含有 15 个或更少的碳原子, 优选 10 个或更少); 和(b)化合物不是



或其去甲基或还原类似物, 或任何前述的盐, 其中 W 包含取代或未取代的杂环, 该杂环包含:

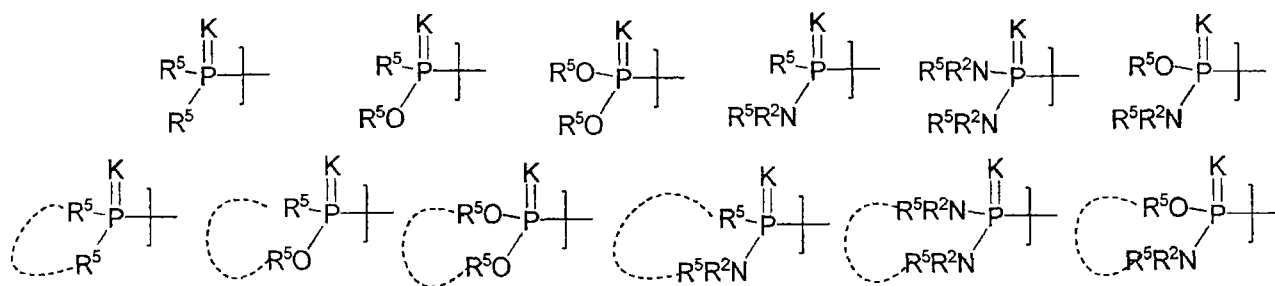


其独立存在或与六元芳环稠和，其中 U 是取代或未取代的氨基、O、S、SO 或 SO<sub>2</sub>；和(c)在下式的化合物中：

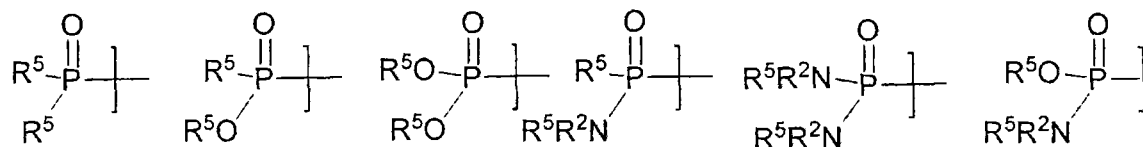


J-Q-A-不是(HO)<sub>2</sub>(PO)-O-或其二甲基磷酸酯(且优选不是其另一种二-低烷基酯)；

本发明具有特殊意义的具体方案中的 J 部分包括系列 1 所示的基团：



其中 K、R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup>和 R<sup>6</sup>的定义如上。通常具有特殊意义的 J 部分是那些 K 为氧的基团，如下图示的许多例示化合物，尤其包括任何下述基团：

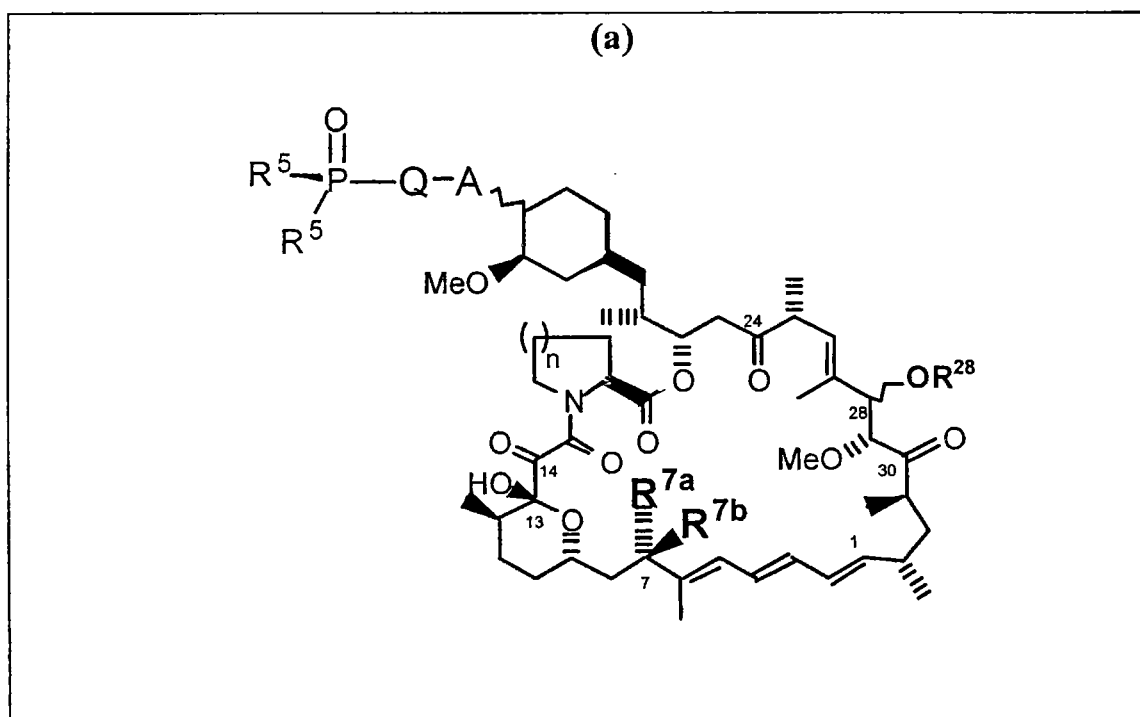


其中各次出现的 R<sup>5</sup> 独立选自低级脂肪族或芳基部分，其可被取代也可不被

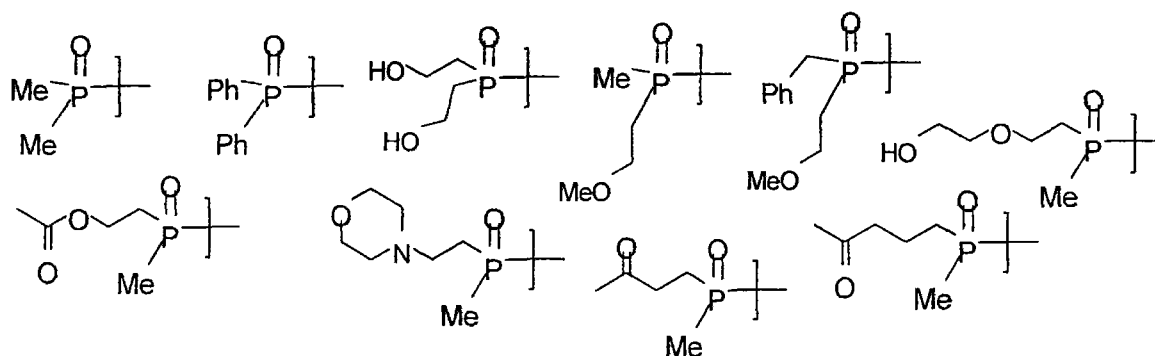
取代,或在 $-OR^5$ 部分的情况下还可是H。通常还具有特殊意义的是-Q-A-为O的实施方案,特别当J是一种上面刚提到的通常优选的部分时(尽管不优选 $-PO_3H_2$ )。还具有特殊意义的是任何前述JQA-为 $(R^2Y)(Me)(P=O)O-$ 的化合物,其中 $R^2Y$ 含有15个或更少的碳原子,优选10个或更少的碳原子,在一些实施方案中含有6个或更少的碳原子。

这一系列新化合物包括许多类具有特殊意义的化合物。

例如,式(a)中举例说明了这样一类化合物:

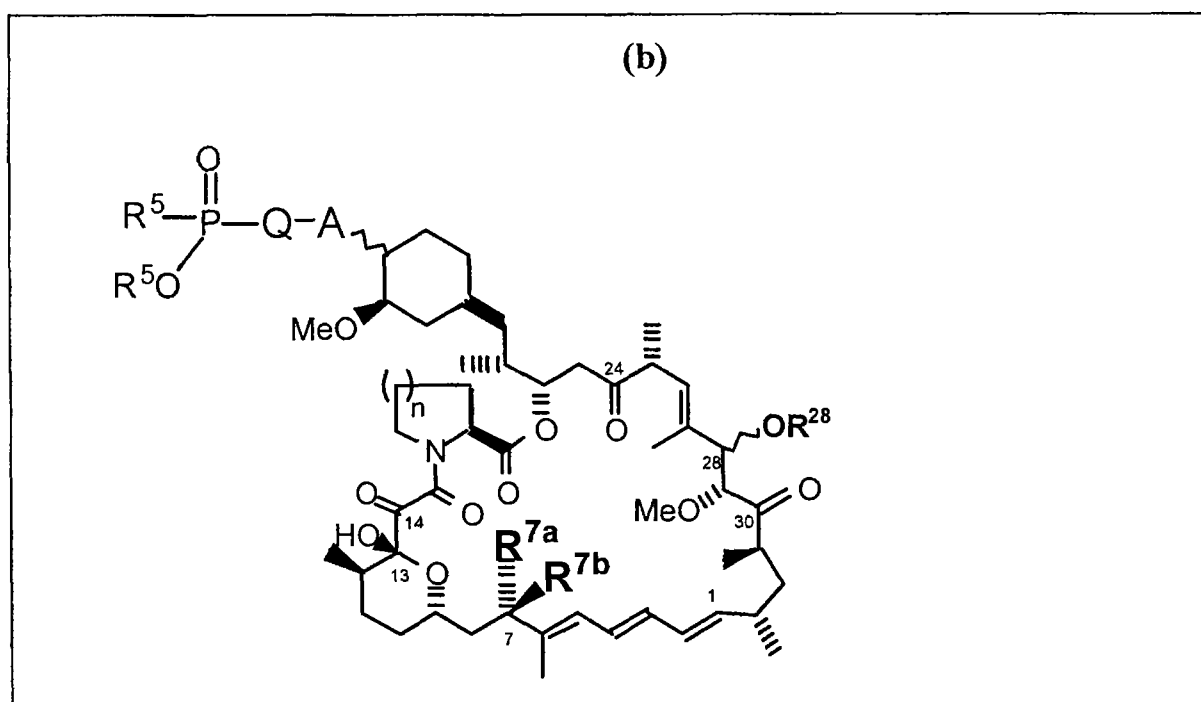


此类化合物中,各 $R^5$ 独立选自脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分(各部分可取代或未取代),尤其是低级(即自1至6个碳原子)脂肪族部分,如低级烷基,其任选被取代(如,被卤素、羟基、 $-O-$ 酰基(如,酰氧基)、烷氧基、卤代烷基、羟基烷氧基、芳基或杂芳基等)。在此类化合物的几个例子中,式(a)化合物包含选自如下基团的J部分:



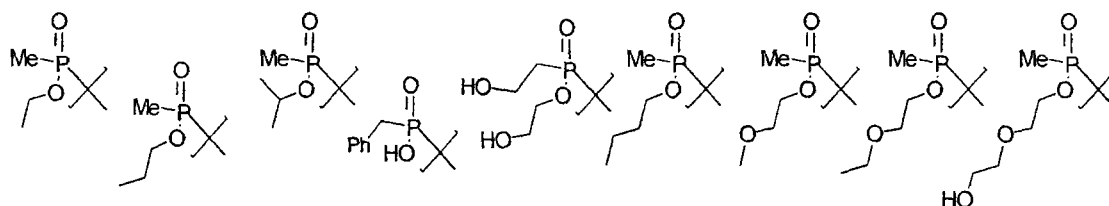
通过其中 J-Q-A-为 $(R^5)_2PO-O-$ 的亚类成员,在如下的合成实施例中进一步举例说明此类化合物。此外,应注意除非另有指定,此处公开或例示的与特定化合物、亚类化合物或一类化合物关联的 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 和 J 部分可同样应用于其它例子。因此,除非另有指明,一个例子中公开的 $R^2$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 和 J 部分被认为可外推至所有其它例子。

本发明的另一类有意义的化合物由式(b)图示:



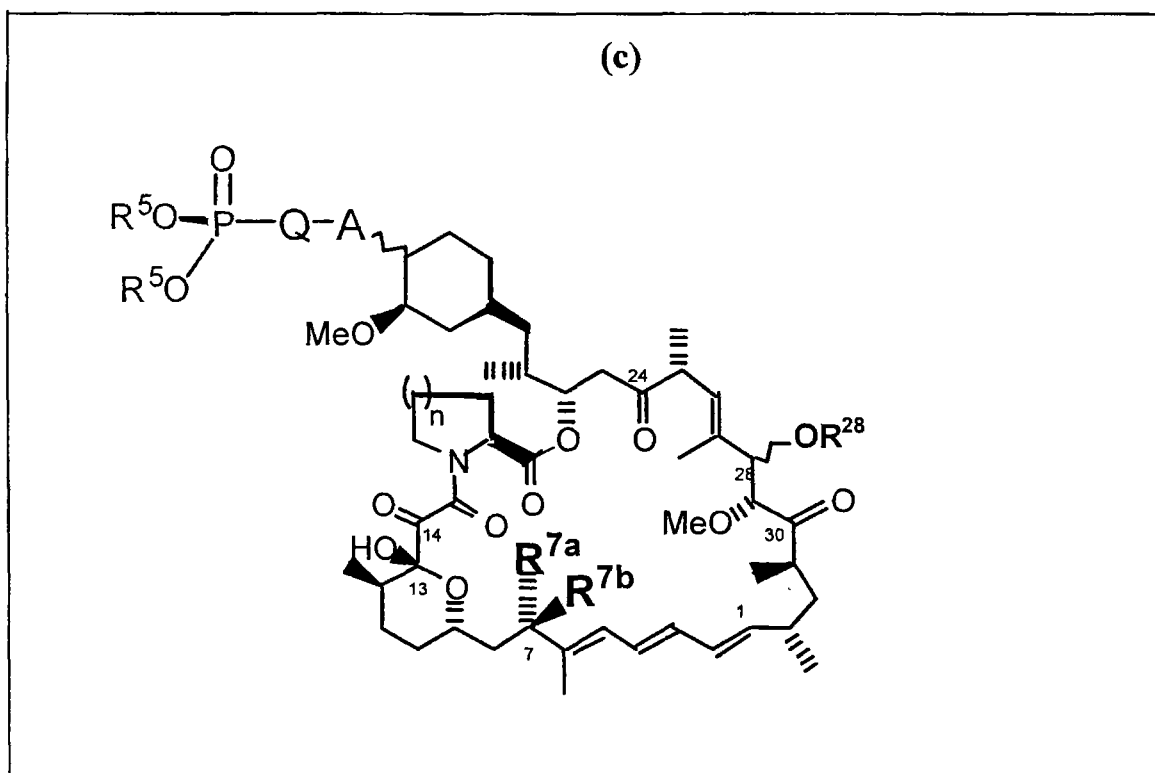
此类化合物中,各 $R^5$ 独立选自脂肪族、杂脂族、芳基或杂芳基部分(各部分可取代或未取代),尤其是低级脂肪族部分,如低级烷基,其任选地被取代(如被羟基、烷氧基、羟基烷氧基、芳基或杂芳基等)。对于 $-OR^5$ 而言, $R^5$ 还可为 H。包含式(b)的说明性例子的 J 选自如下基团:





通过其中 J-Q-A-为 $(R^5)(R^5O)PO-O-$ 的亚类成员，在如下的合成实施例中进一步举例说明此类化合物。

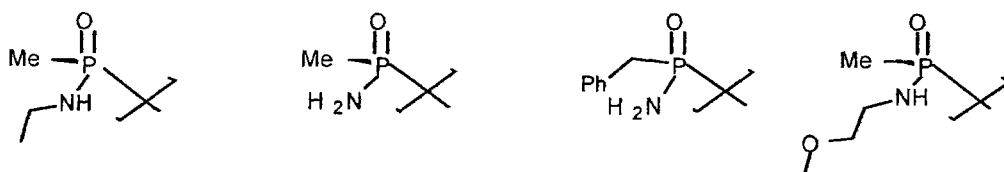
本发明的另一类有意义的化合物由式(c)图示，开始部分已说明了其条件



此类中，各 $R^5$ 独立选自 H、脂肪族、杂脂族、芳基或杂芳基部分(各部分可取代或未取代)，尤其是低级脂肪族部分，包括低级烷基，其任选地被取代(如被羟基、烷氧基、羟基烷氧基、酰氧基-、芳基或杂芳基部分等取代)。包括式(c)化合物的说明性例子的 J 选自如下：

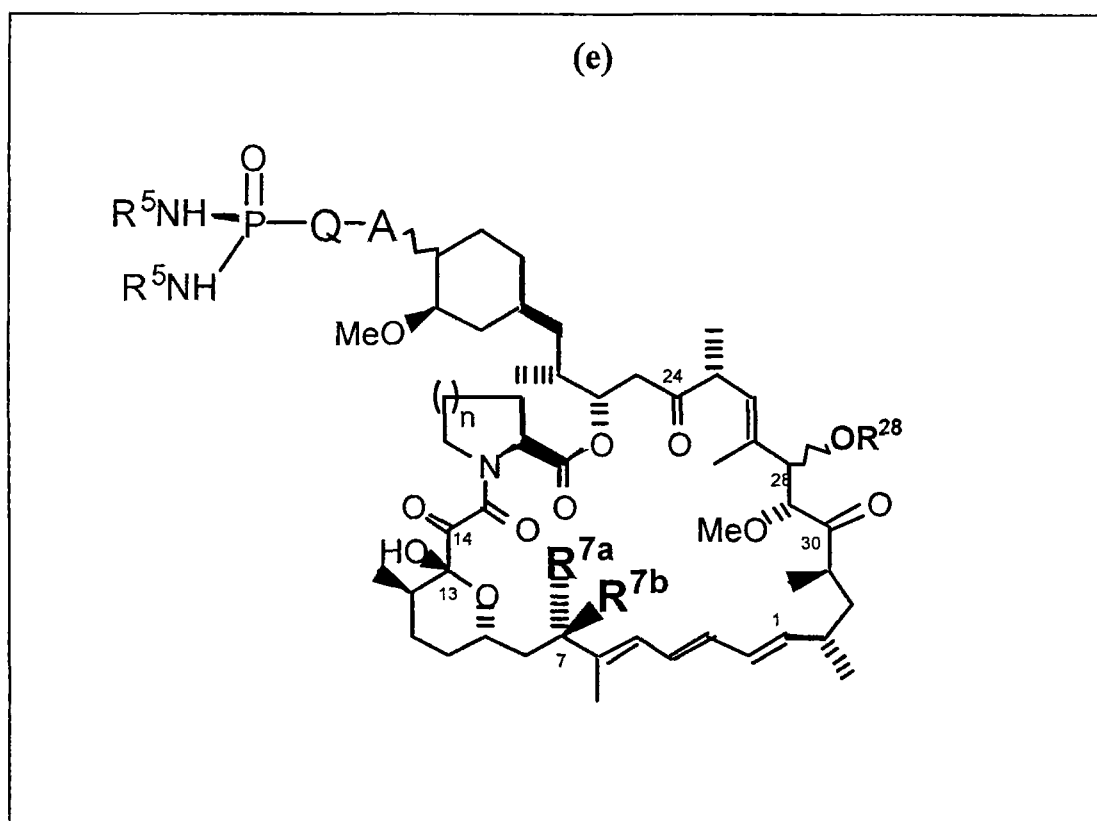


基或杂芳基部分等取代)。在一些实施方案中,  $-NHR^5$  为  $-NH_2$ 。包括式(d)化合物的说明性例子的J选自如下:

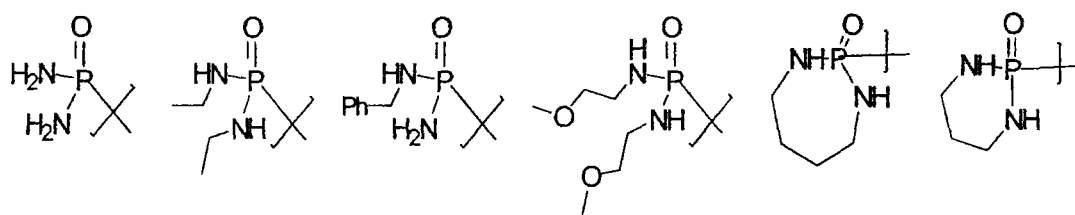


此类化合物由其中 J-Q-A-为  $(R^5O)(R^5O)PO-O-$  的亚类化合物进一步举例说明。

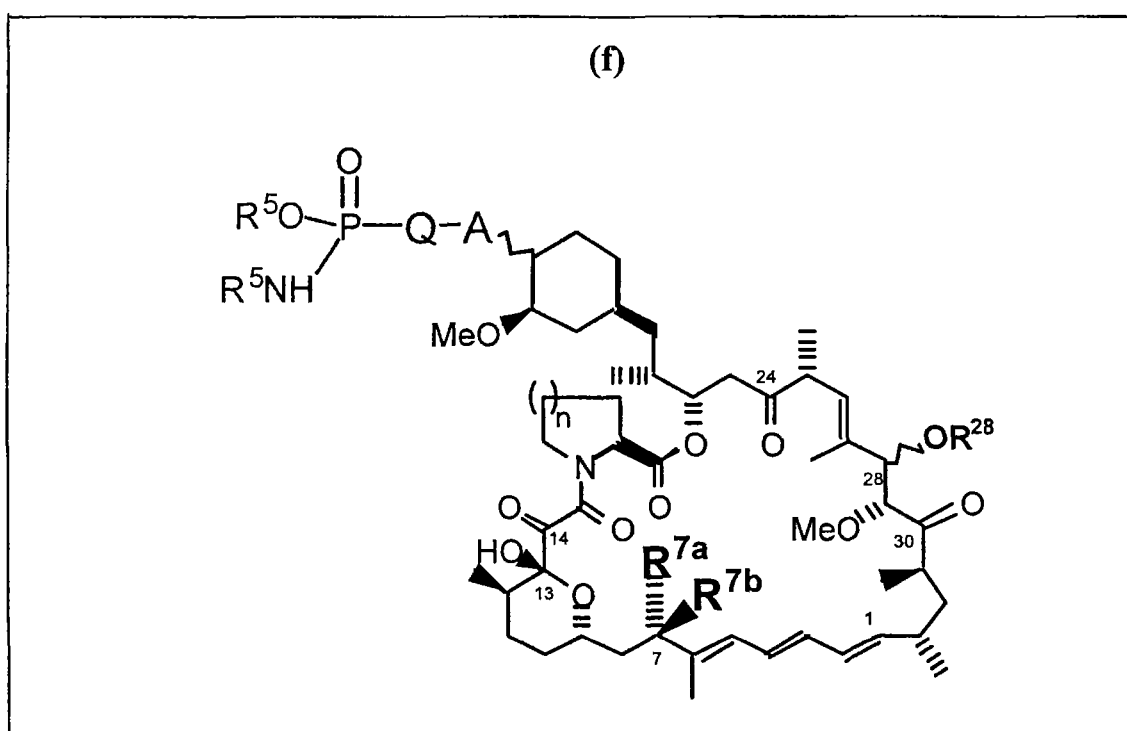
本发明的另一类有意义的化合物由式(e)图示:



此类中, 各  $R^5$  独立选自 H、脂肪族、杂脂族、芳基或杂芳基部分(各部分可取代或未取代), 尤其是低级(即自 1 至 6 个碳原子)脂肪族部分, 包括低级烷基, 其任选地被取代(如被羟基、烷氧基、羟基烷氧基、酰氧基、芳基或杂芳基部分等取代)。说明性例子包括 J 选自如下基团的式(e)化合物:

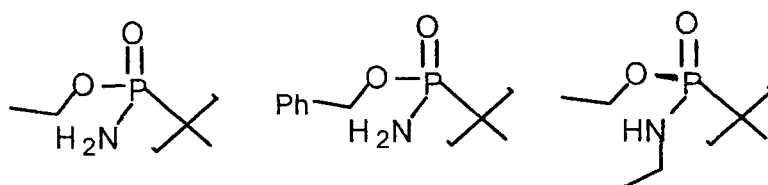


通过 J-Q-A-是(R<sup>5</sup>O)(R<sup>5</sup>O)PO-O-的亚类成员，在下面的合成实施例中进一步举例说明此类化合物。



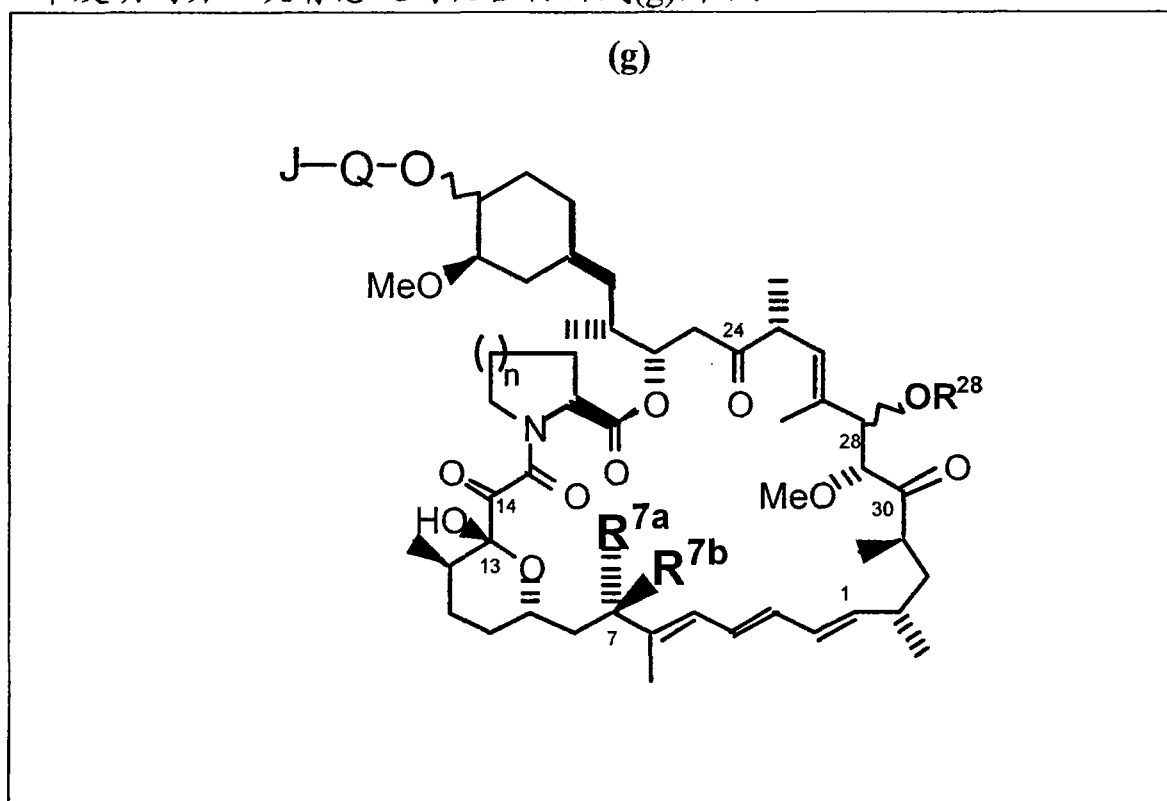
本发明的另一类有意义的化合物由式(f)图示：

此类中，各 R<sup>5</sup> 独立选自 H，脂肪族、杂脂族、芳基或杂芳基部分(各部分可取代或未取代)，尤其是低级(即自 1 至 6 个碳原子)脂肪族部分，包括低级烷基，其任选地被取代(如被羟基、烷氧基、羟基烷氧基、酰氧基-、芳基或杂芳基部分等取代)。说明性例子包括 J 选自如下基团的式(f)化合物：

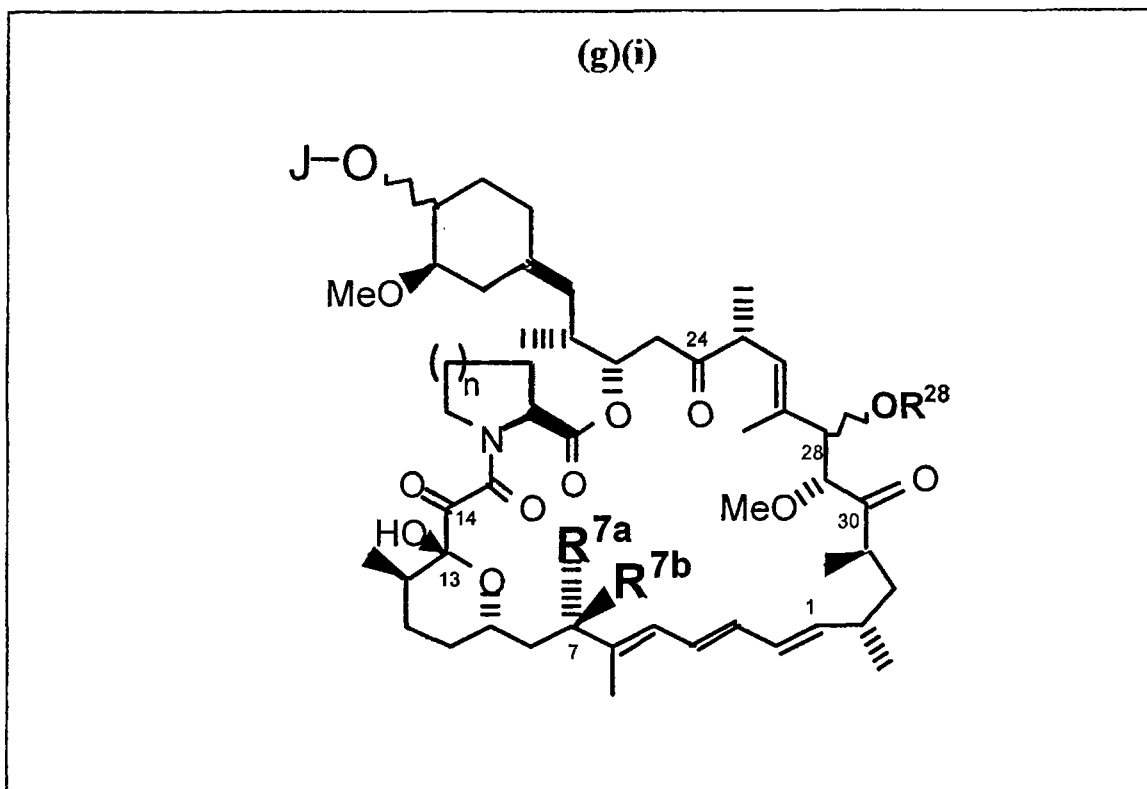


在(d)、(e)和(f)中，“QA”优选是-O-或-OVO-。

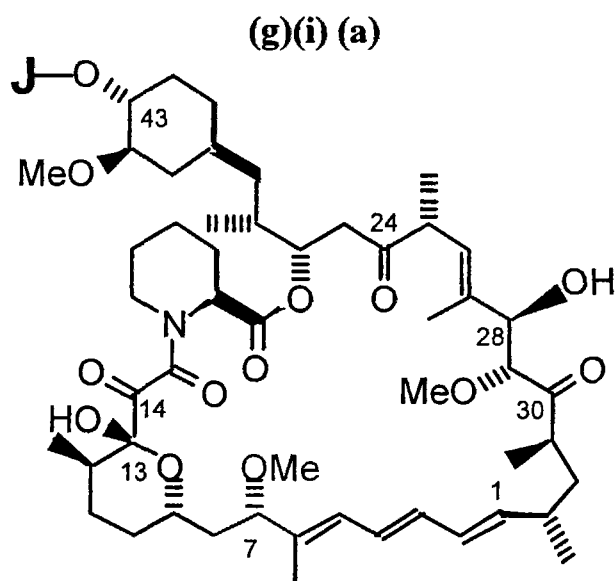
本发明的另一类有意义的化合物由式(g)图示：



其中 J、Q、n 以及不同的 R 基团如前定义，且条件如前。此类包含一些有意义的亚类，包括如下：



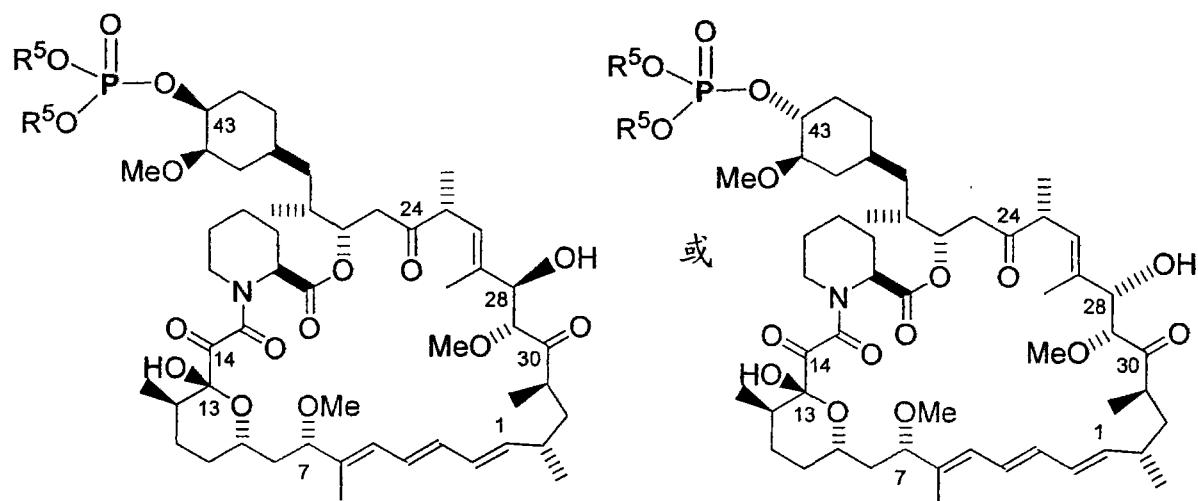
其中Q不存在,即其中J通过氧原子与环己烷相连(即共价键连接)。此亚类(排除O-磷酸化雷帕霉素本身和其盐或其甲基磷酸二酯)包括含有如前定义的任何J部分的化合物,包括本文其它地方举例说明的所有类型的J部分,包括示于各化合物、各类型化合物和此处公开的说明性J部分,尤其包括如下说明性例子:



其中 J 选自:

-P(O)Me<sub>2</sub>、-P(O)Ph<sub>2</sub>、-P(O)(OMe)(Me)、-P(O)(OnPr)(Me)、-P(O)(OiPr)(Me)、  
 -P(O)(OnBu)(Me)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt)、  
 -P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)、-P(O)(OMe)(Et)、-P(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、  
 -P(O)(OEt)<sub>2</sub>、-P(O)(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,

示于“(g)(i)(a)”结构的化合物中，J 不是-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>，其盐或-PO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>。只有与一种或多种相对于雷帕霉素的其它结构变化联合，才允许取代基 J 的这些选择，这些结构变化例如改变一个或多个包括 C43 或 C28 位的立体化学性质，更改 C7 位的取代基或立体化学性质，还原一个或多个酮基官能团，在一个或多个位点脱甲基等。因此下述化合物尤其具有意义：

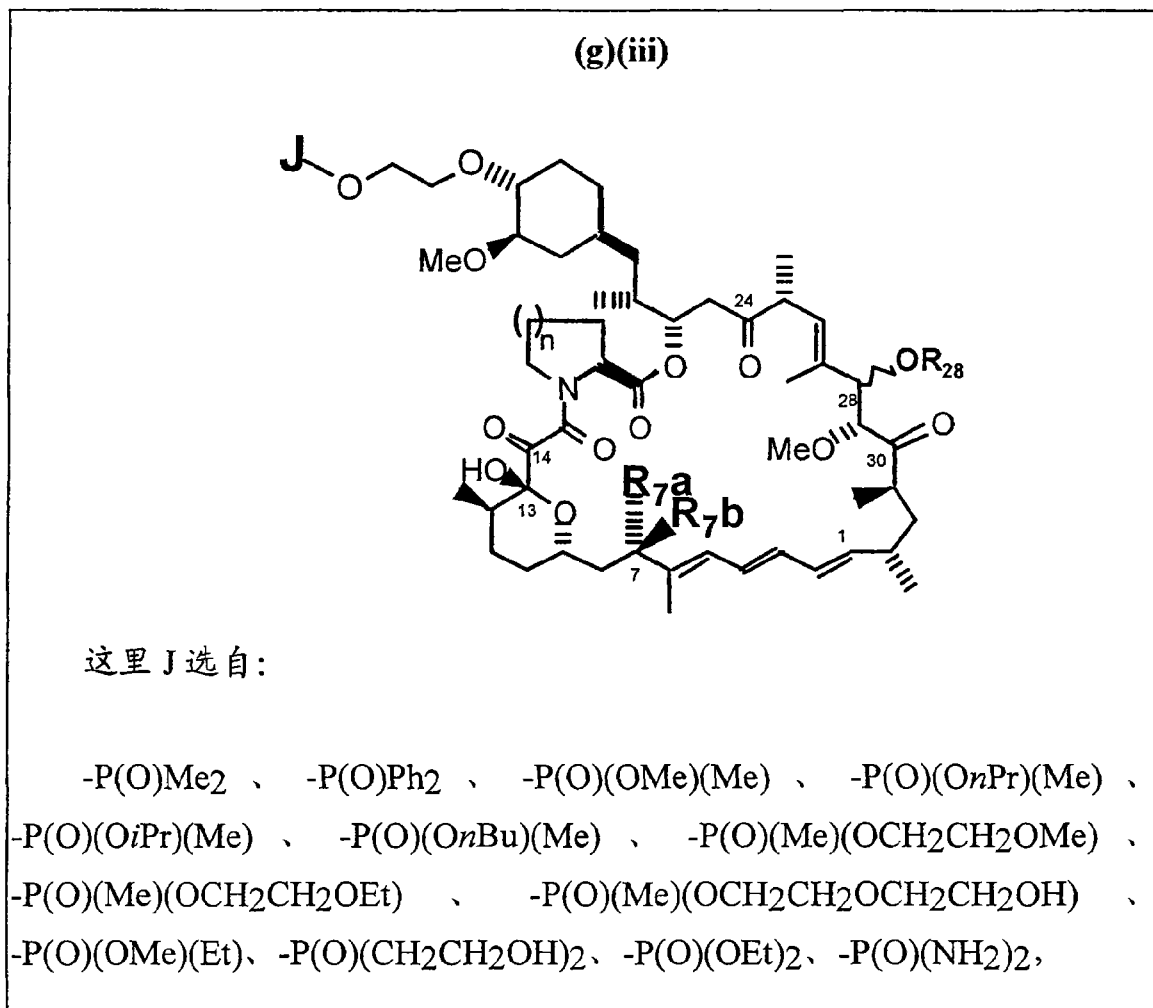


其中  $R^5$  是 H 或低级烷基，尤其包括甲基。

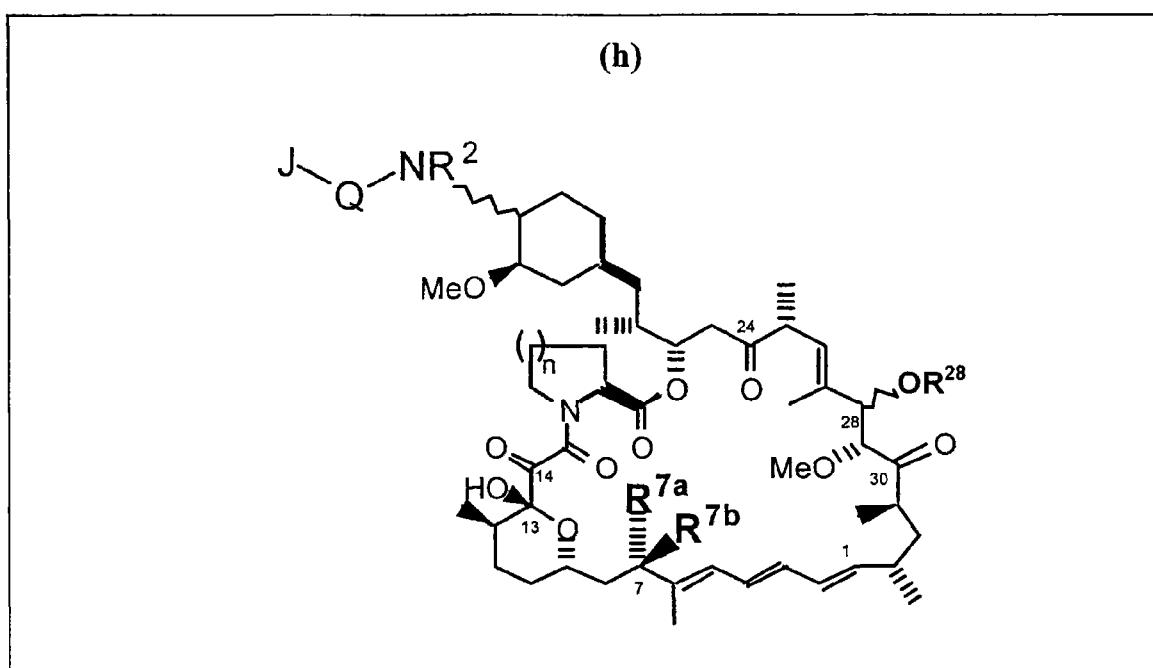
还具有特别意义的亚类化合物为(g)(ii)，其与亚类(g)(i)(a)在下面一或更多方面不同：(a)28位的取代基差向异构化(相对于雷帕霉素的 C28 -OH 的方向)，(b)24 和 30 位的一个或两个酮基被还原为羟基，(c)7 位甲氧基被 H 或别处列出的各种 C7 取代基替换，以及(d)43 位 J-O-取代基在差向异构方向(相对于雷帕霉素的 C43 -OH 方向)。再者，J 是如前所述的任一含磷部分。

另一有意义的亚类描述在下面的(g)(iii)中，以说明含 Q 的 J 部分由 O 相连的化合物。此亚类说明了 Q 是 -OV- 且 V 为脂肪族部分的例子。

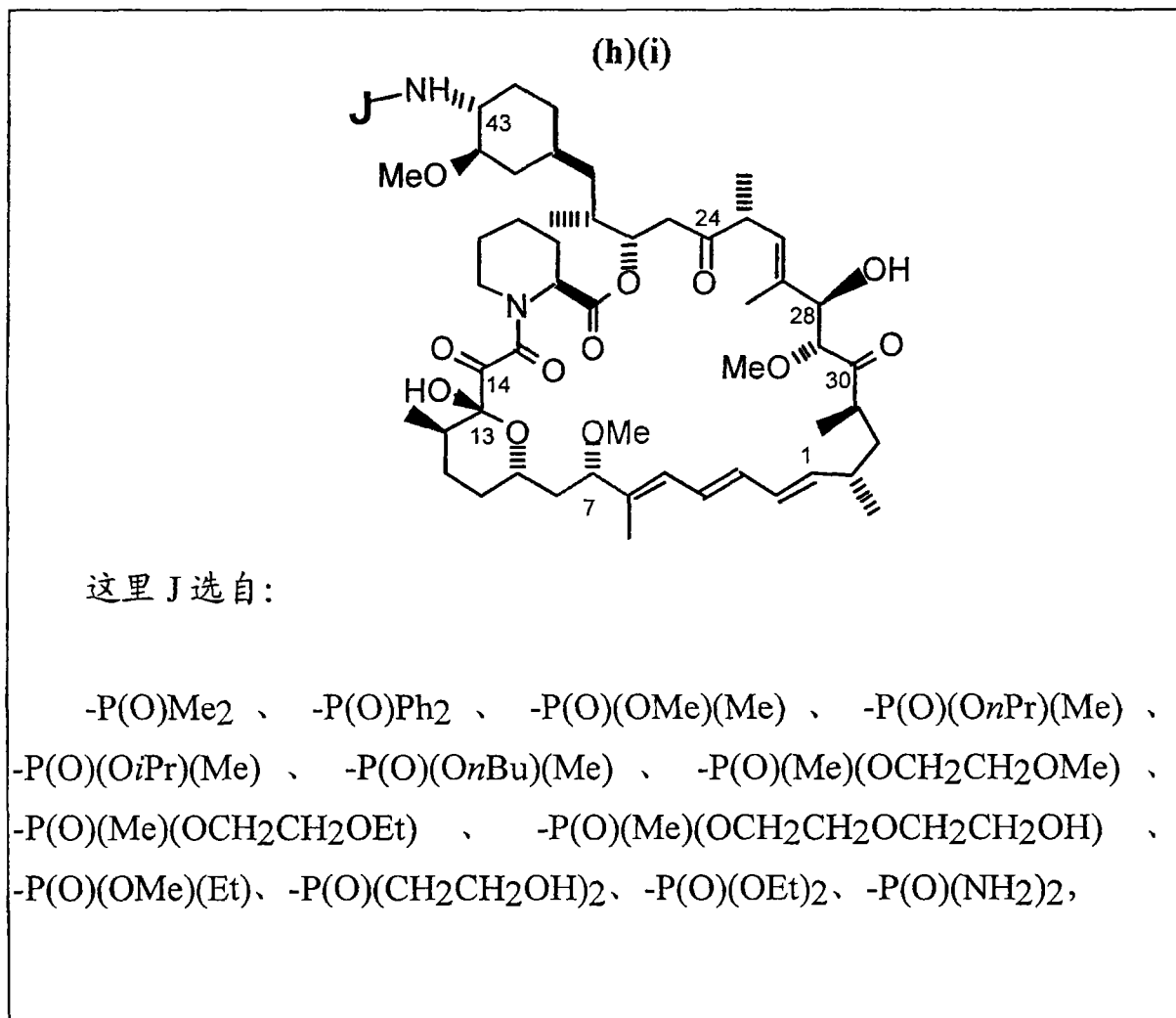




本发明的另一类有意义的化合物由式(h)中 A 为 -NR<sup>2</sup>- 的化合物图示说明:

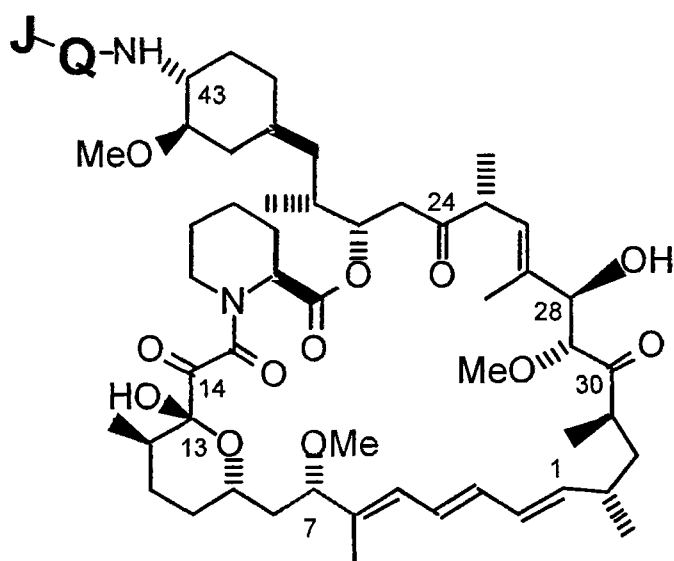


此类包括 Q 不存在的亚类，即 J 通过氮原子直接与环己烷环相连(即共价键连接)，如下图示：



(h)类中另一类有意义的亚类由如下的雷帕霉素衍生物图示，其中 Q 存在且含有脂肪族或杂脂肪族部分，V 可被取代也可不被取代，这里各可变部分的定义如前或如此处例示：

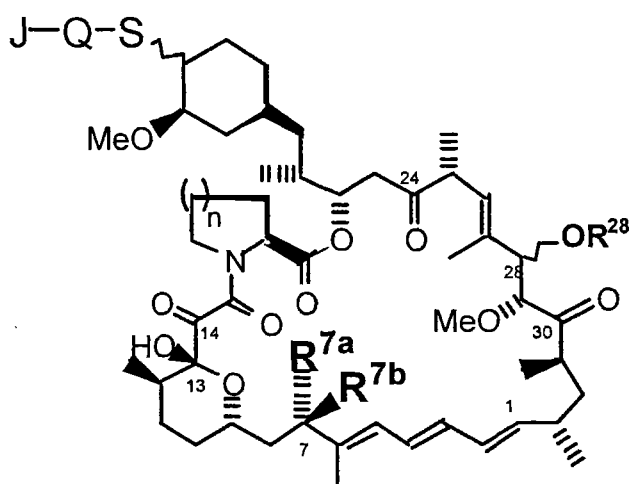
(h)(ii)



这里 JQ-是 J-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-、J-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-、  
J-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-或 J-OCH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>NH-，

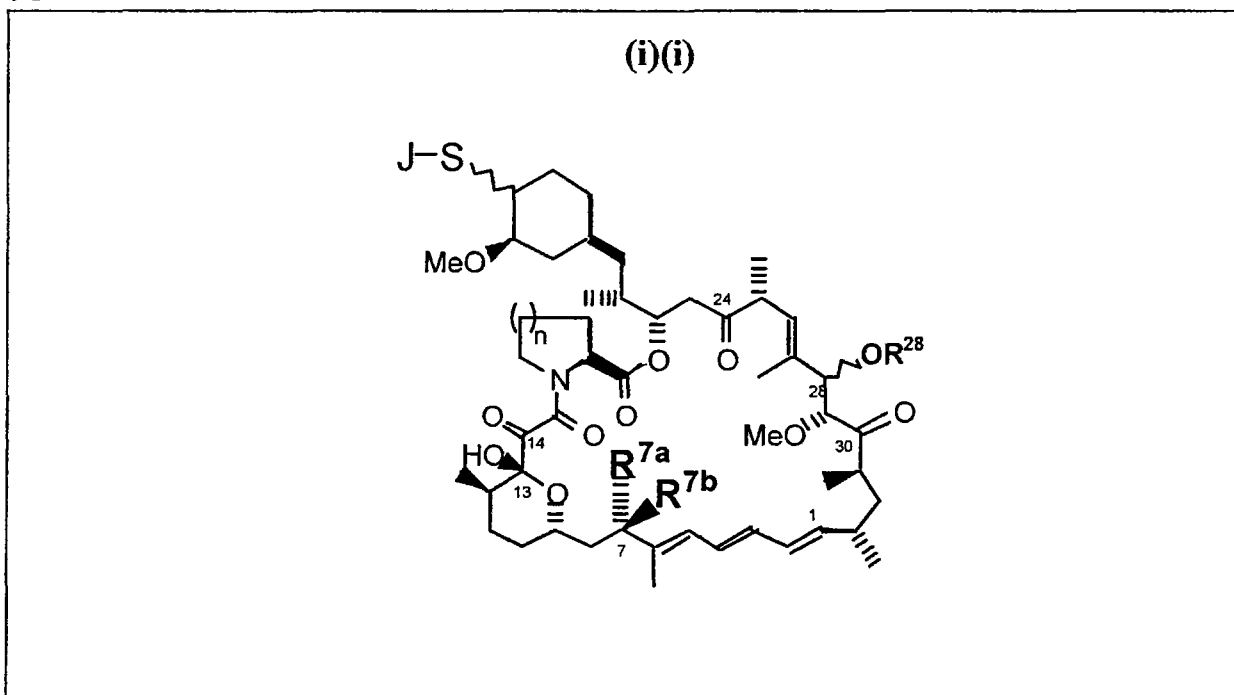
本发明中另一类有意义的化合物由式(i)图示：

(i)



其中 J、Q、n 和各种 R 基团的定义如前。此类包含如下一些有意义的亚

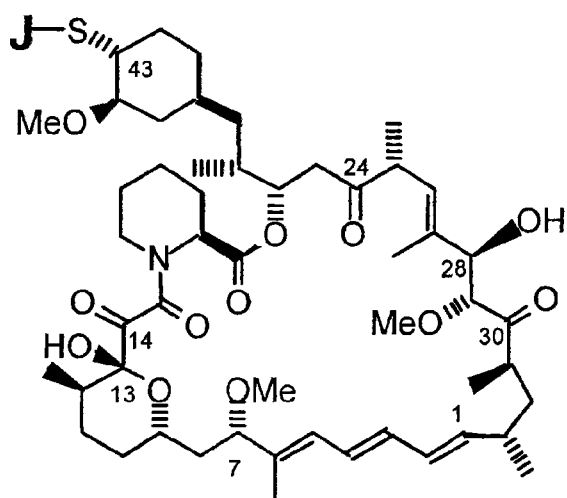
类:



其中 Q 不存在, 即 J 通过硫原子直接与环己烷环相连(即共价键连接)。此亚类包括含有任一如前定义的 J 部分的化合物, 包括如下例示化合物:

另一有意义的亚类描述在下面的(i)(ii)中, 说明了含 Q 的 J 部分由 O 相连的化合物。此亚类说明了 Q 是  $-SV-$  且 V 为脂肪族部分的例子。

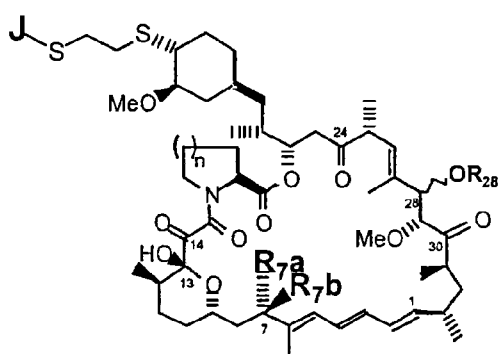
## (i)(i)(例子)



这里 J 选自:

-P(O)Me<sub>2</sub>、-P(O)Ph<sub>2</sub>、-P(O)(OMe)(Me)、-P(O)(OnPr)(Me)、-P(O)(OiPr)(Me)、  
-P(O)(OnBu)(Me)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt)、  
-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)、-P(O)(OMe)(Et)、-P(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、  
-P(O)(OEt)<sub>2</sub>、-P(O)(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,

## (i)(ii)



其中 J 选自:

-P(O)Me<sub>2</sub>、-P(O)Ph<sub>2</sub>、-P(O)(OMe)(Me)、-P(O)(OnPr)(Me)、-P(O)(OiPr)(Me)、  
-P(O)(OnBu)(Me)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe)、-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OEt)、  
-P(O)(Me)(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)、-P(O)(OMe)(Et)、-P(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)<sub>2</sub>、  
-P(O)(OEt)<sub>2</sub>、-P(O)(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>,

本发明其它类有意义的化合物表示如下:

(j)图 1 的化合物, 其中 JQA-替换雷帕霉素的 C-43 羟基, 相对于雷帕霉素 C43 立体化学转化, 这里 JQA 的定义如上, 且条件如开始所述。这些化合物经下面详细描述的方法由雷帕霉素制备。

(k)如(j)类的化合物, 但还有其它一个或多个相对于雷帕霉素的结构修饰。文献已知以及本文别处也间接提到了许多这样的修饰, 包括对 C7 位 OMe 取代基进行替换或改变其立体化学, 对 C28 和 C43 之一或全部进行差向异构化; 还原一个或多个酮基如环 24 和 30 位之一或全部; 去除一个或多个甲基; 还原 C1 至 C6 的一个或多个双键; 和/或使用脯氨酸(prolyl)环替换哌啶酯环(pipicolate)。本发明化合物以适当的雷帕霉素类似物替代雷帕霉素自身作为起始物进行制备。

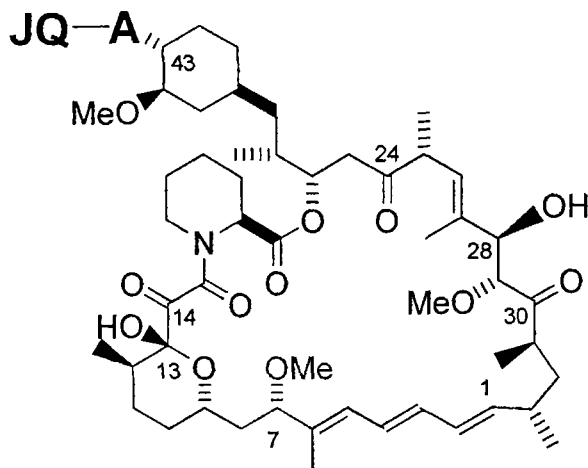
(i)本发明的化合物, 其中 J 不是  $-PO_3H_2$ , 其盐或二烷基磷酸酯(如  $-PO_3Me_2$ )。

(m)本发明的化合物, 分子量低于 1700, 优选低于 1400, 更优选低于 1200 质量单位(没有将化合物为盐形式时的相反离子计算在内)

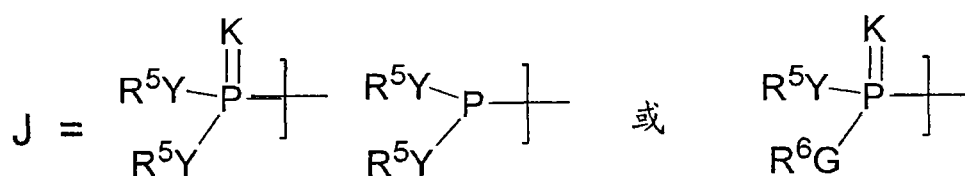
(n)本发明的化合物, 其与聚乙二醇部分或其它提高溶解度的基团化学相连。例子包括本发明雷帕类似物游离-OH 的氨基乙酸酯(或其它氨基甲酸酯)或 PEGylated 酯(参见如 WO 02/24706, 其内容在此引用作为参考)。

(o)本发明化合物, 在 T 细胞增殖试验中保留的效力至少是雷帕霉素的 0.01 倍, 优选 0.1 倍和更优选至少 0.5 倍。

(p)下式的化合物:

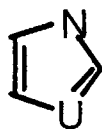


和其药学上可接受的衍生物, 其中 A 是 -O-、-S- 或 -NR<sup>2</sup>- 或不存在(即, 或连接 JQ 与 C-43 的共价键), Q 不存在(即, 为共价键)或(如果 A 是 -O-、-S- 或 -NR<sup>2</sup>-)Q 可以是 -V-、-OV-、-SV-, 或 -NR<sup>2</sup>V-, 其中 V 是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分, 这样 J 通过 A 或通过 VA、OVA、SVA 或 -NR<sup>2</sup>V- 与环己烷直接相连; k 是 O 或 S;



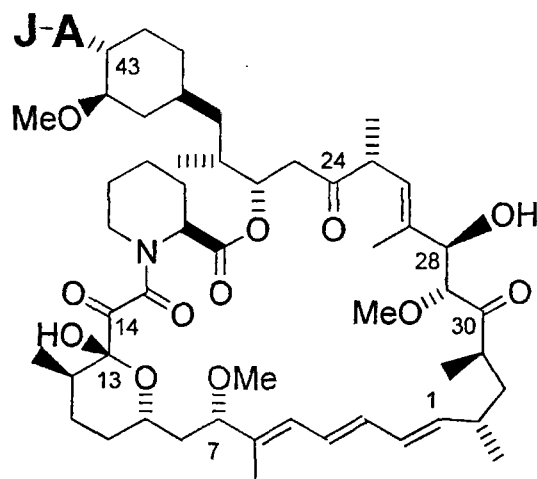
各次出现的 Y 独立是 -O-、-S-、-NR<sup>2</sup>-, 或连接 R<sup>5</sup> 部分与 P 的键; 各次出现的 R<sup>2</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立是脂肪族基团、杂脂肪族基团、芳基或杂芳基部分, 或 H; 以及各次出现的 R<sup>6</sup> 独立是 R<sup>5</sup>、-PK(YR<sup>5</sup>)(YR<sup>5</sup>)、-SO<sub>2</sub>(YR<sup>5</sup>) 或 -C(O)(YR<sup>5</sup>); 只要与 P 直接相连的 R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup> 或 R<sup>6</sup> 任一部分不是 H; 其中两个 R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup> 和/或 R<sup>6</sup> 部分可相互化学连接环; 各次出现的 G 独立是 -O-、-S-、-NR<sup>2</sup>-, (M)<sub>x</sub>, 或是连接 R<sup>6</sup> 与 P 的化学键; 各次出现的 M 独立是取代或未取代的亚甲基部分, 以及任何 M-M' 部分可是饱和或不饱和的; 各次出现的 x 独立是 0-6 整数; 其中前述各脂肪族或杂脂肪族部分独立是直链的或支链的, 环的或非环的, 以及取代的或未取代的, 各芳基、杂芳基、酰基、芳氧基或杂芳氧基独立是取代或未取代的;

条件是: J-Q-A 不是 (HO)<sub>2</sub>(P=O)O- 或 (MeO)<sub>2</sub>(P=O)O- 或 (HO)<sub>2</sub>(P=O)-W-O-(或这些含 (HO)<sub>2</sub>(P=O)-W-O- 的雷帕霉素衍生物的去甲基或还原类似物, 这里 W 含有取代或未取代的杂环, 该杂环含:



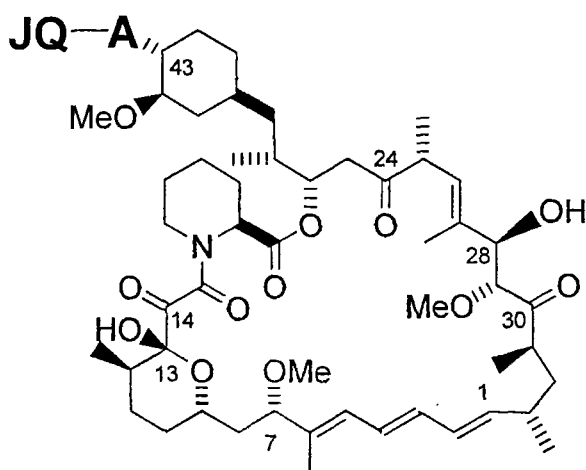
其单独存在或与六元芳环稠和, 其中 U 是取代的或未取代的氨基、O、S、SO 或 SO<sub>2</sub>; 或任一前述的盐; 以及如果 J-Q-A 是 (R<sup>2</sup>Y)(Me)(P=O)O-, 那么 (R<sup>2</sup>Y) 不是免疫原性载体物质、检测载体物质或固体基质或其盐(如, 实施方案中 R<sup>2</sup>Y 中的 R<sup>2</sup> 具有 15 个或更少, 优选 10 个或更少, 任选的 6 个或更少的碳原子)。

(q)下式化合物:



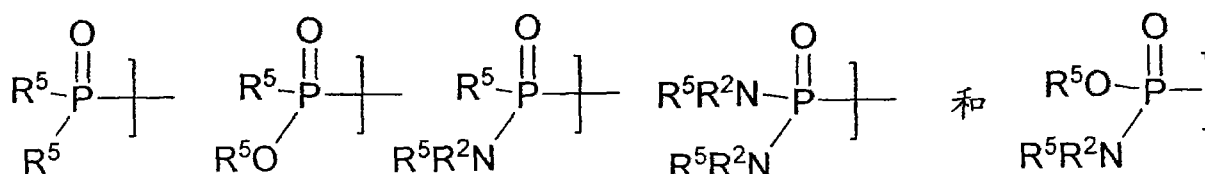
以及其药学上可接受的衍生物, 其中 A、J、K 及其它如(p)中所定义的各种基团, 除了在这些化合物中, 条件是 (a)J-A- 不是  $(\text{HO})_2(\text{P}=\text{O})\text{O}-$  或  $(\text{MeO})_2(\text{P}=\text{O})\text{O}-$ , 以及 (b)如果 JA-是  $(\text{R}^2\text{Y})_2(\text{P}=\text{O})-\text{W}-\text{O}-$ , 那么  $(\text{R}^2\text{Y})$ 不是免疫原性载体物质、检测载体物质或固体基质或其盐(如, 实施方案中  $\text{R}^2\text{Y}$  的  $\text{R}^2$  具有 15 个或更少, 优选 10 个或更少, 任选的 6 个或更少的碳原子)(替代(p)化合物中的条件)。

(r)下式的化合物:



的化合物和其药学上可接受的衍生物, 其中 J 选自:

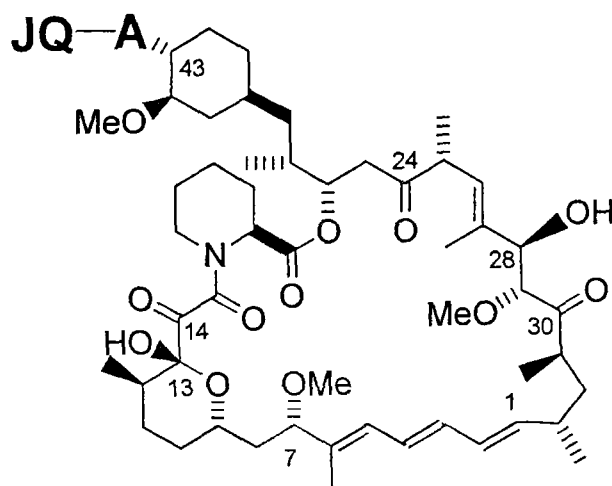




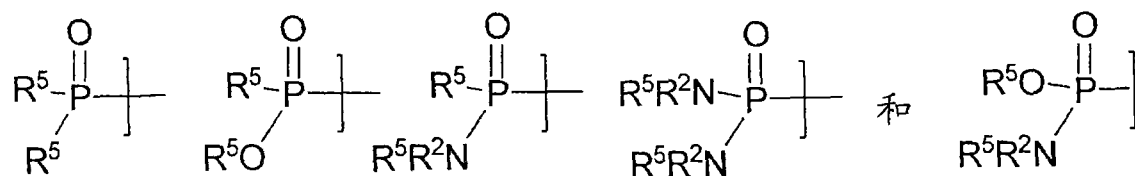
除了各次出现的  $\text{R}^2$  和  $\text{R}^5$  独立选自低级脂肪族基团或芳基部分, 其可被取代或未取代(另外排除  $-\text{OR}^5$  和  $-\text{NR}^2\text{R}^5$  的情况可为  $-\text{OH}$  和  $\text{NHR}^5$ ), 其余各可变基团如上在(p)和(q)中的定义;

以及条件为如果  $\text{J-Q-A}$  是  $(\text{R}^2\text{Y})_2(\text{P}=\text{O})-\text{W-O}-$ , 那么  $(\text{R}^2\text{Y})$  不是免疫原性载体物质、检测载体物质或固体基质或其盐。

(s)下式的化合物:



和其药学上可接受的衍生物, 其中 J 选自:



A 不存在或是  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{NR}^2-$ , Q 不存在或(如果 A 是  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$  或  $-\text{NR}^2-$ )Q 可以是  $-\text{V}-$ 、 $-\text{OV}-$ 、 $-\text{SV}-$  或  $-\text{NR}^2\text{V}-$ , 其中 V 是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分, 这样 J 通过 A 或通过 VA, OVA, SVA 或  $-\text{NR}^2\text{V}-$  与环己烷直接相连;

k 是 O 或 S; 各次出现的 Y 独立是  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^2-$ , 或连接  $\text{R}^5$  部分与 P 的化学键; 各次出现的  $\text{R}^2$  和  $\text{R}^5$  独立是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分

分或 H; 以及各次出现的  $R^6$  独立是  $R^5$ 、 $-\text{PK}(\text{YR}^5)(\text{YR}^5)$ 、 $-\text{SO}_2(\text{YR}^5)$  或  $-\text{C}(\text{O})(\text{YR}^5)$ ; 只要直接与 P 相连的  $R^2$ 、 $R^5$  或  $R^6$  部分不是 H;

其中两个  $R^2$ 、 $R^5$  和/或  $R^6$  部分可相互化学连接成环; 各次出现的 G 独立是  $-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{NR}^2-$ 、 $(\text{M})_x$ ，或是连接  $R^6$  与 P 的化学键; 各次出现的 M 独立是取代或未取代的亚甲基部分，以及任何 M-M' 部分可是饱和或不饱和的; 各次出现的 x 独立是 0-6 整数;

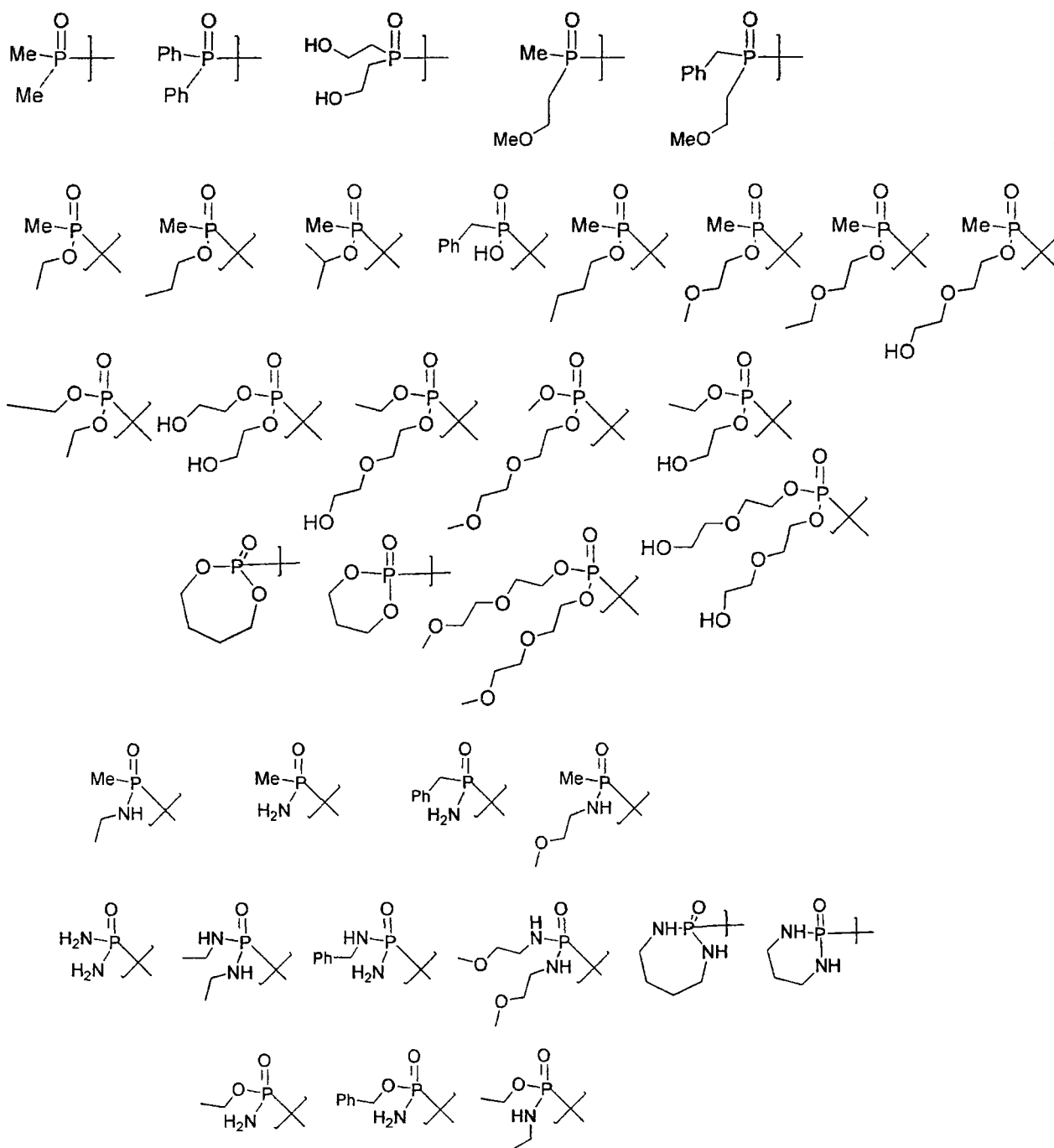
其中前述各脂肪族或杂脂肪族部分独立是线性的或支链的或环的或非环的、以及取代的或未取代的，各芳基、杂芳基、酰基、芳氧基或杂芳氧基独立是取代或未取代的;

其中  $R^2$  和  $R^5$  独立选自低级脂肪族或芳基部分，其可被取代或未取代，另外排除  $-\text{OR}^5$  和  $-\text{NR}^2\text{R}^5$  可为  $-\text{OH}$  和  $-\text{NHR}^5$  的情况; 条件是如果 J-Q-A 是  $(\text{R}^2\text{Y})(\text{Me})(\text{P}=\text{O})\text{O}-$ ，那么  $(\text{R}^2\text{Y})$  含 15 个或更少的碳原子。

(t) (p)至(s)的各类化合物，其中各次出现的  $R^2$  和  $R^5$  独立选自 C1-C6 烷基，任选含有一个或多个卤素、 $-\text{OH}$ 、烷氧基-、烷氧基烷氧基-、卤代烷基-、羟基烷氧基-、酰基-、酰氧基-、杂环基、芳基或杂芳基取代基，另外排除  $-\text{OR}^5$  和  $-\text{NR}^2\text{R}^5$  可为  $-\text{OH}$  和  $\text{NHR}^5$  的情况。

(u) (t)类型化合物，其中各次出现的  $R^2$  和  $R^5$  独立选自甲基、乙基、n-丙基、-丙基、正丁基、2-丁基、t-丁基、苯基或杂芳基，各基团任选含有一个或多个卤素、 $-\text{OH}$ 、烷氧基-、烷氧基烷氧基-、卤代烷基-、羟基烷氧基-、酰基-、酰氧基-、杂环基、芳基或杂芳基取代基，另外  $-\text{OR}^5$  和  $-\text{NR}^2\text{R}^5$  可为  $-\text{OH}$  和  $\text{NHR}^5$ 。

(v) (p)至(u)类型化合物，其中 J 的  $R^2$  和  $R^5$  部分是任选地被取代的高达 8 个碳原子的脂肪族基团，如下面图示的 J 基团:

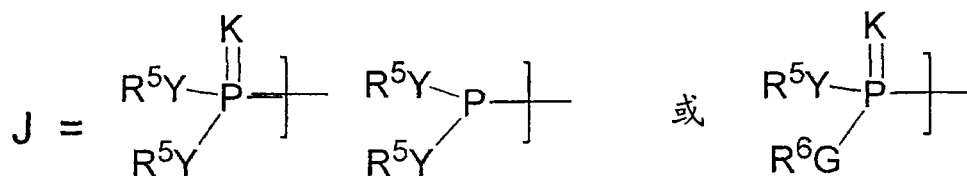


(w) (p) (s) (t) (u)或(v)类型化合物, 其中 QA 是-O-、-OVO-、-NH-、-OVNH-、-S-或-SVS-, 其中 V 是低级脂肪族部分。

(x) 前述各类化合物, 其中 JQA-或 JA-含有 $(R^2Y)(Me)(P=O)O-$ , 其中  $R^2Y$ -含有 15 个或更少, 优选 10 个或更少, 更优选 8 个或更少的碳原子。

(y) 包括雷帕霉素或 43-表-雷帕霉素衍生物的化合物, 其中 43 位羟基被 JQA 替换, 其中

A 是-O-、-S-或-NR<sup>2</sup>-或不存在, Q 不存在或(如果 A 是-O-, -S-或-NR<sup>2</sup>-)Q 可以是-V-、-OV-、-SV-或-NR<sup>2</sup>V-, 这里 V 是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分, 这样 J 通过 A 或通过 VA、OVA、SVA 或-NR<sup>2</sup>V-与环己烷直接相连; k 是 O 或 S;



各次出现的 Y 独立是-O-、-S-、-NR<sup>2</sup>-，或连接 R<sup>5</sup> 部分与 P 的键;

各次出现的 R<sup>2</sup> 和 R<sup>5</sup> 独立是脂肪族、杂脂肪族、芳基或杂芳基部分, 或 H; 以及各次出现的 R<sup>6</sup> 独立是 R<sup>5</sup>、-PK(YR<sup>5</sup>)(YR<sup>5</sup>)、-SO<sub>2</sub>(YR<sup>5</sup>)或-C(O)(YR<sup>5</sup>); 只要直接与 P 相连的 R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup> 或 R<sup>6</sup> 部分不是 H; 其中两个 R<sup>2</sup>、R<sup>5</sup> 和/或 R<sup>6</sup> 部分可相互化学连接成环;

各次出现的 G 独立是-O-、-S-、-NR<sup>2</sup>-，(M)<sub>x</sub>, 或是连接 R<sup>6</sup> 与 P 的化学键; 各次出现的 M 独立是取代或未取代的亚甲基部分, 以及任何 M-M' 部分可是饱和或不饱和的;

各次出现的 x 独立是 0-6 整数;

其中前述各脂肪族或杂脂肪族部分独立是直链的或支链的或环的或非环的、以及取代的或未取代的, 各芳基、杂芳基、酰基、芳氧基或杂芳氧基独立是取代或未取代的;

还有一种或多种如下其它特征:

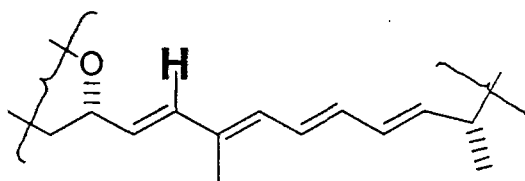
(1) 28 位差向异构化, 或以卤素、-OR<sup>2</sup> 或-OC(=O)AR<sup>2</sup> 替换 28 位羟基(在任一立体化学的方向)

(2) 以取代或未取代的肟或羟基及式-OR<sup>2</sup> 或-OC(=O)AR<sup>2</sup> 的衍生物替换 24 位的酮;

(3) 以取代或未取代的肟或羟基及式-OR<sup>2</sup> 或-OC(=O)AR<sup>2</sup> 的衍生物替换 24 位的酮;

(4) 7 位-OMe 差向异构化和/或以选自如下的部分替换-OMe: H、卤素、-RA、-ORA、-SRA、-OC(O)RA、-OC(O)NRAR<sup>B</sup>、-NRAR<sup>B</sup>、-NR<sup>B</sup>C(O)RA、-NR<sup>B</sup>C(O)ORA、-NR<sup>B</sup>SO<sub>2</sub>RA 或-NR<sup>B</sup>SO<sub>2</sub>NRAR<sup>B</sup>; 其中 RA 是 R<sup>2</sup> 以及其中 R<sup>B</sup> 是 OH 或 R<sup>2</sup>; 以及

(5) 去除 7 位-OMe 以形成四烯部分:



(z) (y)类型化合物, 其中各次出现的  $R^2$  和  $R^5$  独立选自 C1-C6 烷基, 任选由一个或多个卤素、-OH、烷氧基-、烷氧基烷氧基-、卤代烷基-、羟基烷氧基-、酰基-、酰氧基-、杂环基、芳基或杂芳基取代基, 另外排除-OR<sup>5</sup> 和-NR<sup>2</sup>R<sup>5</sup> 可为-OH 和 NHR<sup>5</sup>。例如一些情况下, 各次出现的  $R^2$  和  $R^5$  独立选自甲基、乙基、n-丙基、-丙基、正丁基、2-丁基、t-丁基、苯基或杂芳基, 各基团任选地含有一个或多个前述各类取代基或此处公开的其它取代基。

(aa) (y)或(z)类型化合物, 其中 QA 为-OVO-、-OVNH-或-SVS-, 其中 V 是低级脂肪部分。

(ab) (y)或(z)类型化合物, 包含如(v)类型化合物中所述的的 J 部分。

不在本发明范围的一类化合物为 43 位氧原子的取代基包含-P(O)(Me)(Z) 的缀合物(conjugates)或雷帕霉素或其衍生物, 这里 Z 是免疫原性载体物质、检测载体物质或固体基质, 或其盐, 经羰基、-NH-、-S-、-O-或如 US 2001/00109020 A1 所公开的一些脂肪族基团与 P 相连。此文献公开了雷帕霉素与这些载体或材料的缀合物, 用于产生或检测抗体, 用于测量雷帕霉素水平并且分离雷帕霉素结合蛋白。如那篇文献所公开的, 免疫原性载体物质可选自任何常规已知免疫原性载体物质, 通常是蛋白或多肽、多糖, 在一些情况下可为足够大以及免疫原性的糖类、脂多糖, 或核酸; 免疫原性蛋白和多肽的分子量在 5,000 至 10,000,000 之间, 优选高于 15,000, 并且更通常高于 40,000; 例子包括白蛋白、球蛋白、酶、血蓝蛋白、谷蛋白或具有足够非蛋白质的成分的蛋白, 如, 糖蛋白; 检测载体物质可以是酶如辣根过氧化物酶, 碱性磷酸酯, 荧光素酶, 荧光部分如荧光素, Texas 红, 或罗丹明, 化学发光部分等; 固体基质载体物质可以是通常用于放射性免疫测定的树脂珠、ELISA 板、玻璃珠、塑料珠, 或典型地用于浸渍片型分析的固体基质材料。

本发明的一些其它方面包括:

-含有本发明化合物的组合物, 包括任何上面指明的各类型化合物, 和

药学上可接受的载体以及任选地包含一种或多种药学上可接受的赋形剂。组合物可以是适于口服或胃肠外给予受试者，如包含人类患者的哺乳动物。可使用常规材料制备组合物，这样它们适于使用本文中提到的任一给药途径给药。

-本发明的化合物在制备用于各种医学或本文中指出的其它应用的组合物中的用途。

-通过给予受试者免疫抑制量(即，包括周期性给予免疫抑制剂量的免疫抑制的治疗过程)的一种前述组合物抑制受试者免疫反应的方法，例如一种治疗或抑制移植组织接受者排斥反应的方法。

-一种通过给予受试者有效治疗量的含本发明化合物的组合物治疗其所需治疗的如下疾病的方法：移植对抗宿主疾病、狼疮、类风湿性关节炎、糖尿病、重症肌无力、多发性硬化症、牛皮癣、皮肤炎、湿疹、皮脂溢、炎性肠病、肺炎、眼色素层炎、成人 T-细胞白血病/淋巴瘤、真菌感染、过度增生性再狭窄、移植血管的动脉粥样硬化、脑血管疾病、冠状动脉疾病、脑血管疾病、动脉硬化、动脉粥样硬化、非动脉粥样化动脉硬化或因细胞事件引导的免疫介导的血管损伤而导致的血管壁损伤，中风或多发性硬化性痴呆。

-一种治疗需要的受试者中如下疾病的方法：冠状动脉疾病，脑血管疾病，动脉硬化，动脉粥样硬化，非动脉粥样化动脉硬化，或因细胞事件引导的免疫介导的血管损伤而导致的血管壁损伤，中风或多发性硬化性痴呆，所述方法包括给予受试者含本发明化合物的组合物，单独或与一种或多种此处或别处指明的治疗试剂合用，尤其包括 ACE 抑制剂(如喹那普利、培哚普利、雷米普利、卡托普利、群多普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利和依托普利)；血管紧张素 II 受体拮抗剂(如坎地沙坦、依贝沙坦、洛沙坦、缬沙坦和替米沙坦)；纤维酸衍生物(fibric acid derivative) (如氯贝特和吉非贝齐)；HMG Co-A 还原酶抑制剂(如西立伐他汀、氟伐他汀、阿伐他汀、洛伐他汀、普伐他汀、或辛伐他汀)； $\beta$  肾上腺素能阻滞剂(如索他洛尔、噻吗洛尔、艾司洛尔、卡替洛尔、普萘洛尔、倍他洛尔、喷布洛尔、纳多洛尔、醋丁洛尔、阿替洛尔、美托洛尔和比索洛尔)；钙通道阻滞剂(如硝苯地平、维拉帕米、尼卡地平、硫氮卓酮、尼莫地平、氟氯地平、非洛地平、尼索地平和苜普地尔)；抗氧化剂；抗凝剂(如华法林、dalteparin、肝素、依诺肝素和达那肝素)；或在激素代替疗法中有用的含雌激素的试剂(如妊马雌酮、妊马雌酮、17- $\beta$ -

雌二醇, 雌二醇、和硫酸雌酮哌嗪)。本例子和其它例子中的其它试剂可在服用本发明化合物之前或之后或同时使用。

- 一种治疗需要治疗的受试者癌症的方法, 包括给予受试者有效治疗量含本发明化合物的组合物。此处或别处指出了可这样治疗的各种癌症。此治疗方法可与一种或多种其它治疗癌症方法合用, 例如与一种或多种如下试剂合用给予受试者: 抗癌烷化剂或嵌入剂; 抗雌激素; 激酶抑制剂(如, Src、BRC/Abl、kdr、aurora-2、糖原合酶 3("GSK-3")); 癌症中涉及的受体或激素的抗体(如 EGFR、PDGFR、IGF-R 和 IL-2); 可溶性受体或此受体的其它受体拮抗剂; 蛋白酶体抑制剂或其它 NF-kB 抑制剂; 或辐射。此处或别处指出的其它治疗试剂的例子尤其包括, 别嘌醇、alemtuzmab、六甲嘧胺、氮磷汀、nastrozole、抗前列腺特定膜抗原抗体(如 MLN-591、MLN591RL 和 MLN2704)、三氧化砷、Avastin®(或其它抗-VEGF 抗体)、贝沙罗汀、博来霉素、白消安、卡培他滨、卡铂、Gliadel Wafer、塞来考昔、苯丁酸氮芥、顺铂、顺铂-肾上腺素胶、克拉屈滨、阿糖胞苷脂质体、柔红比星脂质体、柔红比星、柔红霉素、地拉佐生、紫杉醇、阿霉素、Elliott's B 溶液、表阿霉素、雌莫司汀、依托泊甙磷酸酯、依托泊甙、依西美坦、氟达拉滨、5-FU、氟维司群、吉西他滨、gemtuzumab-ozogamicin、戈舍瑞林乙酸酯、羟基脲、伊达比星、伊达比星、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸 imatinib、依立替康(或其它拓扑异构酶抑制剂, 包括如 MLN576(XR11576)抗体)、来曲唑、甲酰四氢叶酸、甲酰四氢叶酸左旋咪唑、柔红霉素脂质体、美法仑、L-PAM、美司钠、氮甲蝶呤、甲氧沙林、甲氧沙林 C、米托蒽醌 MLN518 或 MLN608(或 flt-3 受体酪氨酸激酶的其它抑制剂、PDFG-R 或 c-试剂盒)、itoxantrone、紫杉醇、培加酶、喷司他丁、吡菲尔钠、利妥昔单抗(RITUXAN®)、滑石、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊甙、VM-26、拓扑替康、托瑞米芬、曲妥单抗(Herceptin®, 或其它-Her2 抗体)、2C4(或干涉 HER2-介导信号的其它抗体)、维 A 酸、ATRA、戊柔比星、长春瑞宾或帕米膦酸钠、zoledronate 另一种二膦酸盐。

- 一种含有包含了本发明化合物的血管支架(vascular stent)的药物洗脱支架, 化合物分散在基质中或暴露在所述支架之中或之上的通道、槽或其它室。此处或别处指明了各种类型将药物负载于这些支架时所用的支架、方法和材料, 并作为参考在此引用。此处也指明了各种基质、聚合物和其它的材料, 并作为参考在此引用。例示性的支架包括: Angiomed (Bard), Cardiocoil

(In-Stent Medtronic), CORINTHIAN (BSC)、Radius (Scimed), Wallstent (Schneider), Act-one (ACT), Angiostent (angioynamics), be-Stent (In-Stent Medtronic), BiodivYsio (Biocompatibles), 考迪斯, Cross-flex (考迪斯), Crown (JJIS), Freedom (Global therapeutics), Gianturco-Roubin II (Cook), Jo-med, Jostent flex (Jomed), Microstent GFX (AVE), Multilink (Guidant-ACS), NIR (Medinol), NIR Royal (Medinol), NIRflex (Medinol), NIRSIDE flex (Medinol), Palmaz-Scatz (JJIS), STS (De Scheerder), Tensum (Biotronic), Wiktor-GX (Medtronic), Wiktor-I (Medtronic), X-Trode (Bard), Y-Flex (Devon), Tsunami (Terumo), Bx Velocity (J&J), SLK-View (Advanced Stent Technologies, Inc.) 以及 Duraflex (Avantec) 支架。支架可以是前述任一种, 或此处以及所引用的参考中指明的任一类型中的其它例子, 以及可包含别处指明的其它材料(如, 可降解或可侵蚀的聚合物, 也可以是不可降解不可侵蚀的聚合物)。

- 包含本发明化合物和适于将化合物应用于支架的稀释剂的组合物。

本发明提供一系列新的雷帕类似物, 此处公开了其许多例示性类型和具体例子。那些相对于雷帕霉素 43 位进行修饰的化合物, 还可相对于雷帕霉素进行进一步衍生, 如在 C7、C28、C13、C24、C30 以及别处进行一处或多处如 US 6,258,823、WO 96/41865、WO 98/02441、WO 99/36553 和 WO 01/14387 以及这些文献或本文中所引用的其它专利文献和科学参考所公开的化学变换。有意义的化合物尤其包括与人 FKBP12 结合或抑制旋转异构酶活性的化合物, 在这二者内, 更优在选任何常规的 FKBP 结合或旋转异构酶测定中的获得的结果与雷帕霉素在同一数量级内的化合物。

还包括前述化合物药学上可接受的衍生物, 其中短语“药学上可接受的衍生物”表示此化合物任何药学上可接受的盐、酯、氨基甲酸酯, 或这样的酯或氨基甲酸酯的盐, 或给予患者时, 可提供(直接地或间接地)如本文中描述的含 JQA 的雷帕类似物的任何加合物或衍生物, 或其具有生物学活性的代谢物或残留物。因此, 药学上可接受的衍生物尤其包括雷帕类似物的前药。前药是化合物的衍生物, 通常明显地降低了药学活性, 其所包含的其他部分在体内易于消除从而产生作为药学活性物的母体分子。前药的例子是酯, 可在体内断裂产生有意义的化合物。雷帕霉素及其它化合物的各种前药, 以及用于衍生母体化合物从而形成前药的物质和方法已为所知并适用于本发明。



本发明化合物可以基本纯的形式提供(相对于副产物、残留反应物或其它不需要的物质),例如至少 50%纯度,适宜地至少 60%纯度,有利地至少 75%纯度,优选地至少 85%纯度,更优选地至少 95%纯度,特别地至少 98%纯度,所有百分比是基于重量/重量计算的。本发明不纯或纯度不足形式的化合物在制备更纯形式的适于药用的相同化合物或相关化合物(例如相应的衍生物)时是有用的。

本发明化合物为了多种重要目的可用于细胞内(在体外或在体内,即在含有这些细胞的有机体内)嵌合蛋白的多聚化,如 WO 96/41865、WO 99/36553 和 WO 01/14387 中对雷帕霉素及其它雷帕类似物所作的详述。还可参见 Rivera VM, Ye X, Courage NL, Sachar J, Cerasoli F, Wilson JM 和 Gilman M. (1999) Long-term regulated expression of growth hormone in mice following intramuscular gene transfer. Proc Natl Acad Sci U S A 96, 8657-8662; 和 Ye X, Rivera VM, Zoltick P, Cerasoli F Jr, Schnell MA, Gao G-p, Hughes JV, Gilman M, 和 Wilson JM (1999) Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. Science 283, 88-91。适用于这些目的的材料和方法公开于 WO 01/14387 第 18 至 24 页,在此引用作为参考。例如,适用 WO 01/14387 中的公开时,以本发明的雷帕类似物替代那篇文献中的 28-表-雷帕类似物。

本发明化合物具有抗真菌活性,尤其包括那些使用取代基替换 C7 甲氧基的化合物,可用于预防和治疗动物真菌感染,尤其是哺乳动物,包括人类,特别是人和家养动物(包括农业动物)。例如,这些化合物可用于治疗由念珠菌属(如 *C. albicans*)、毛癣菌属(如须癣毛癣菌)、小孢子菌属(如石膏样小孢子菌)或表皮癣菌属引起的局部真菌感染,或由白色念珠菌(如鹅口疮或阴道念珠菌病)引起的粘膜感染。它们也可用于治疗由如白色念珠菌、新生隐球菌、烟曲霉、环孢子菌素、*Paracoccidioides*、组织胞浆菌属或芽生菌属 spp 引起的全身性真菌感染。它们也可用于治疗真菌性足菌肿,着色芽生菌病和藻菌病。本发明化合物可用于其它真菌感染,Holt 等在 US 6,258,823(公开于 2001 年 7 月 10 日)中公开了关于对化合物,制剂以及给予雷帕类似物治疗真菌感染进行比较性评价的测试方法的相当多的背景信息,在此引用作为参考。注意抗真菌的本发明雷帕类似物可保留 C7 位甲氧基取代基或可包含任一不同的替取代基,包括 H 和或大或小的取代基。例如,US 6,258,823 公

开的一系列 C7 替换取代基可用于图 1 化合物的设计，特别是在抗真菌或多聚化的应用中。

已发现本发明的某些化合物可抑制 T 细胞增殖，观察到的 EC50 值在较雷帕霉素强效的水平范围。在裸鼠移植模型中观察到能有效地抑制人类肿瘤。这些雷帕类似物典型地保留 C7 位甲氧取代基或替换以 H 或不大于甲氧基的取代基，大于甲氧基的取代基能过分地减少对 T 细胞增殖的抑制。这些雷帕类似物可用作免疫抑制剂、抗增殖、抗肿瘤和抗再狭窄的试剂，也可用作此处或科学及专利文献中描述的雷帕霉素和类似物(如 CCI 779 和 SDZ RAD (“RAD 001”))的其它用途，这些例子在此引用。C7 位相对于雷帕霉素未修饰的化合物，或包含替换的 C7 的且在 T 细胞抑制试验中不过分得减少效力的取代基(即，替换-OMe)的化合物在这些应用中有特殊意义。

更特定地，本发明的某些化合物具有免疫调节活性，意味着这些化合物可通过在体外或在体内抑制免疫细胞反应或增殖和/或有统计意义的显著的减少炎症反应从而引起免疫抑制，炎症反应的显著减少可在任何科学上可接受的细胞、组织或动物模型中确定。以有效治疗量和剂量方案服用这些化合物可治疗尤其如风湿性关节炎、骨关节炎、全身性红斑狼疮、多发性硬化病、急性移植/接枝排斥反应、重症肌无力、进行性系统性硬化病、结节性硬化病、多发性骨髓瘤、特应性皮炎、高免疫球蛋白 E、乙型肝炎抗原阴性的慢性活动性肝炎、桥本甲状腺炎、家族性地中海热、格雷夫斯病、自体免疫性溶血性贫血、原发性胆汁性肝硬变、炎性肠炎以及胰岛素依赖型糖尿病。

本发明化合物还具有治疗原发和/或转移癌症的活性。它们在降低肿瘤大小，抑制肿瘤生长或转移方面是有用的；可治疗各种白血病和/或延长患这些疾病的动物或患者的存活期。

据本发明提供了用于药物治疗的化合物，特别是用作抗真菌、抗癌症、免疫抑制或抗再狭窄药物，或用作治疗此处公开的其它疾病和情况的药物。

本发明进一步提供了使用有效治疗量雷帕类似物治疗患任一那些疾病或情况的人或非人动物的方法，进一步提供了包含本发明化合物与药学上可接受稀释剂或载体的药物组合物以及药物装置(如包含本发明化合物的载药支架)。

本发明化合物可如下面以及此处或别处公开的方法进行配制(或使用基于那些报道的雷帕霉素或雷帕霉素衍生物如 CCI-779 或 RAD001 的制剂)，

然后以有效治疗量给予需要其治疗的多种此处指明的疾病的患者。这些组合物可通过任何有用的方式给予以引导活性化合物到达接受者血液或作用位点，给药方式包括口服、胃肠外给药(包括静脉内、腹膜内和皮下注射以及注射入关节或其它组织)，经支架或其它植入物、直肠、鼻内、阴道和透皮等给药方式。为了此公开的目的，透皮给药被理解为包括通过身体表面或包括上皮或粘膜组织的身体通道内层的所有给药方式。可通过外用药水、乳膏、贴剂、悬浮液、溶液以及栓剂(直肠栓或阴道栓)给药方式给予本发明的化合物，或其药学上可接受的盐或前药。

对于胃肠外或腹膜内给药，本发明化合物或其药学上可接受的盐的溶液或悬浮液可在水中与表面活性剂羟丙基纤维素适度混合或适用雷帕霉素，CC1779 或 RAD001 的配方而制备得到。分散剂还可在乙二醇、液态聚乙二醇及其在油中的混合物中制备得到。在常规的贮存和使用条件下，在制备中可加入防腐剂防止微生物生长。

包含本发明化合物且适于注射用的组合物包括无菌水溶液或分散且无菌的粉末，该粉末可用于临时制备无菌注射溶液或分散剂。任何情况下，该用于注射的组合物均应是无菌的且具有足够的流动性可通过注射器传送。其在生产和贮存条件下应是稳定的，优选进行保护以防止微生物乳细菌和真菌的污染。作为溶剂或分散媒介的载体包括如水、乙醇、多醇(如，乙二醇、丙二醇和液态聚乙二醇)，其适宜的化合物以及植物油。适用于本发明雷帕类似物的胃肠外制剂公开于 US5,530,006; 5,516,770 和 5,616,588 中，在此引用作为参考。

制剂、给药途径以及剂量可选自或基于用于相同或相似适应症的雷帕霉素及其它雷帕霉素衍生物。治疗肿瘤时，优选首先确定患者肿瘤中 PTEN(或 PTEN 介导的过程)是否部分或完全缺陷，然后选择性治疗 PTEN 缺陷性肿瘤的患者(参见如上 Neshat 等, PNAS)。更通常地，可通过基因分型分析和/或体外培养以及肿瘤样本活检研究确定优选的方法，那些肿瘤中磷脂酰肌醇 3 激酶/ Akt-mTOR 信号通路对细胞生长特别重要的患者任选使用雷帕类似物。此类癌症非限定性的例子包括神经胶质瘤、淋巴瘤以及与异常生长因子(如 EGFR, PDGFR, IGF-R 和 IL-2)有关的肺、膀胱、卵巢、子宫内膜、前列腺或宫颈癌；卵巢瘤与 P13 激酶异常有关；黑素瘤和乳腺癌、前列腺癌或子宫内膜癌与 PTEN 异常有关；乳腺、胃肠、卵巢、胰腺以及前列腺癌与 Akt-m 异

常有关；淋巴瘤、乳腺或膀胱癌或头颈癌与 eIF-4E 异常有关；外套细胞淋巴瘤，乳腺癌以及头颈癌与周期细胞 D 异常有关；家族性黑素瘤和乙酰癌与 P16 异常有关。

对于此处所指明的所有适应症，在一些情况下将本发明化合物与一种或多种其它有效的治疗相关疾病的试剂合用可能对患者具有有益的治疗效果。组合可同时服用或分别服用(如，依次服用)。例如，使用本发明的抗癌化合物治疗的患者还可(这样治疗之前、之中或之后)使用一种或多种其它抗癌试剂进行治疗，如顺铂；抗雌激素(如雷洛昔芬、屈洛昔芬、idoxifine、萘福昔定、托瑞米芬、TAT-59、levomeioxifene、LY-353381、CP-3361656、MDL-103323、EM-800 和 ICI-182,780；参见如 WO 02/13802 可使用本发明)；激酶如 Src、BRC/Abl、kdr、aurora-2、糖原合酶 3(“GSK-3”)、表皮生长因子受体(“EGF-R”)或血小板衍生生长因子受体(“PDGF-R”)抑制剂，这些抑制剂包括例如 Gleevec、Iressa、CP-358774 (Tarceva)、ZD-1839、SU-5416 或 NSC-649890；癌症中涉及的受体或激素(如 VEGF)的抗体(如 Herceptin)或可溶性受体或这样受体的其它受体拮抗剂，蛋白酶样抑制剂如 Velcade；IKK 抑制剂或其它 NF-kb 抑制剂；或辐射。组合时的各成分可按照单独使用时的剂量给药，但考虑到不同药物的联合活性，一些情况下一种或多种组分减少剂量后也是可行或有益的。

本发明化合物还可用于防止在患者体内引入移植物、支架或其它装置后的再狭窄或其它并发症。参见如上的 Sousa 等，以及 Marx 和 Marks, 2001, Circulation 104: 852-855。因此，将本发明的雷帕类似物用于支架、移植物、瘘管或其它装置或支架(scaffolds)(包括心脏起搏器导管或导管头、心脏除颤器导管或导管头、心脏瓣膜、起搏器、矫形外科装置等)以提供移植至所需患者体内的药物流出装置。支架及此类装置典型地插入患者的脉管系统(如静脉、动脉、主动脉等，包括冠状动脉和周边动脉)以及用于许多其它器官，腺体、管体等。

支架是可张开的管，典型地是可张开的网孔管，该管足够小可以插入血管。它们典型地用于防止如血管成型术等方法后的血管闭合。不断出现的不同样式和类型的支架可供开业医生选用，包括使用镍(镍-钛合金)、铂芯上的钴合金、铂-金、不锈钢、镀金不锈钢、金刚砂、钛、涂钛层，以及其它金属或非金属，各种样式包括线编(wire braid)、螺旋线圈、槽缝管(之字形急

转设计、旋转连接的 S 字曲线型网孔、正弦曲线孔、蜂窝状网孔、旋转绞接等)、线网、正弦曲线单线圈、单螺旋线圈、鱼骨样支架、易曲线圈、连接的之字形急转线、复合环、多蜂窝支架等。插入支架后血管最常出现的并发症为再闭合(再狭窄)。再狭窄的一个主要原因被认为是支架处血管壁细胞的快速增殖(新内膜性增生(“neointimal hyperplasia”)), 最终阻塞血管。一种降低再狭窄发生几率的方法是使用雷帕霉素支架。雷帕霉素洗脱支架的其它益处文献中已经指明。

为了提供具有减少此类的再狭窄功能的支架(或其它可植入装置), 本发明化合物可暴露于此装置之上或之中, 替换雷帕霉素或其它药物, 从而化合物自植入受试者装置中释放(洗脱)。制备药物洗脱支架时通常是用包含药物的载体物质(典型地为聚合物)对至少部分支架进行涂层或用药物或包含药物的组合物对支架的一个或多个室或通道的内部或表面进行填充。可应用多层涂层, 其中的涂层可不含药物。有时, 在含药层或储藏库的顶端可提供另一其他涂层, 该其他涂层允许药物逐渐释放至受试者组织内。

许多种将药物应用于支架以及使用这种支架的方法和材料已用于实践, 且适于使用本发明化合物。例如 US 6,471,980; 6,096,070; 5,824,049; 5,624,411; 5,609,629; 5,569,463; 5,447,724; 5,464,650 和 WO 02066092 中描述的自可植入装置或其它装置中释放药物的方法和材料。使用 WO 01/01957 和 US 6,099,561; 6,071,305; 6,063,101; 5,997,468; 5,980,551; 5,980,566; 5,972,027; 5,968,092; 5,951,586; 5,893,840; 5,891,108; 5,851,231; 5,843,172; 5,837,008; 5,769,883; 5,735,811; 5,700,286; 5,679,400; 5,649,977; 5,637,113; 5,591,227; 5,551,954; 5,545,208; 5,500,013; 5,464,450; 5,419,760; 5,411,550; 5,342,348; 5,286,254; 和 5,163,952 中描述的脉管系统内释放药物的支架。US 6,051,276; 5,879,808; 5,876,452; 5,656,297; 5,543,158; 5,484,584; 5,176,907; 4,894,231; 4,897,268; 4,883,666; 4,832,686 和 3,976,071 中描述了可生物降解的材料。US 5,463,010 中描述了使用氢环硅氧烷作为限速屏障。US 5,356,433 中描述了支架的涂层方法。US 5,463,010; 5,112,457; 和 5,067,491 中描述了增强可植入装置生物相容性的涂层。US 6,031,375; 5,928,145; 5,735,811; 5,728,062; 5,725,494; 5,409,000; 5,368,557; 5,000,185; 和 4,936,281 中描述了基于能量的装置。US 5,427,767; 5,225,282; 5,206,159; 5,069,216; 4,904,479; 4,871,716; 4,501,726; 4,357,925; 4,345,588 和 4,335,094

中描述了在药物释放系统中已有部分应用的磁力方法。Shanley 等人的美国申请 US 2002/0082680 中描述了在一个或多个开口上或装置中含有一种或多种药物可张开的医疗装置,其使用各种可任选的涂层,屏障组合物以及形状。还可参见 US 6,471,979,其中公开了负载可应用本发明化合物的支架的方法和材料。此处公开的例示性涂层包括磷酸胆碱、聚氨基甲酸乙酯、链段聚氨基甲酸乙酯、聚-L-乳酸、纤维素酯、聚乙二醇和聚磷酸酯,以及天然存在的媒介物或载体如胶原、野芝麻花碱(laminens)、肝素、纤维素,以及其它天然存在的可吸附纤维素的物质。由于其允许化合物自装置中缓慢释放,因而使用这样的涂层是有利的。这延长了化合物对其作用的身体部位维持有效作用的时间。这些涂层与装置材料相互作用的方式以及涂层的固有结构提供了扩散屏障,从而控制了其中化合物的释放。因此,将化合物装载于支架或释放装置的基质或涂层可控制化合物缓慢或快速地释放。

在其它方法中,使用例如基于磷酸胆碱涂层如 Biocompatibles' (LO) PC 聚合物。这种涂层包含疏水性成分,可帮助聚合物在不锈钢支架物质上的起始粘连和成膜,同时其它基团允许聚合物间以及与支架表面交联以形成坚固的锚定。涂层也因此与支架坚固地相连,并可在气囊膨胀时完好无损。涂层可将许多种大小以及物理性质不同的分子吸附入 PC 涂层,并以受控的方式释放那些分子。PC 涂层可薄至  $\sim 0.1\mu\text{m}$ ,当然也可使用较厚的层。涂裹 LO 基质的支架可浸入化合物的有机溶液中仅几分钟。负载水平可由化合物溶液的浓度控制。从溶液中移出后,涂层可在使用前进行简单地干燥。参见如, WO 01/00109、01/01957、01/52915、02/55121 和 02/55122。

使用本发明的雷帕类似物与支架结合可通过如适用释放其它药物特别是雷帕霉素的方法和材料而获得,可使用如前述文献以及 US 5,516,781; 6,153,252; 5,665,728; 5,646,160; 5,563,146; 和 5,516,781,以及 WO 01/01957, 01/49338, 01/87263, 01/87342, 01/87372, 01/87373, 01/87374, 01/87375, 和 01/87376 中公开的这种装置。本发明的雷帕类似物适用于广泛的支架样式以及广泛用于涂层、存储、压条或其它将药物负载其中的方法和材料。将雷帕类似物装载于这些医疗装置,负载本发明雷帕类似物的医疗装置和负载这样雷帕类似物的这种装置在受试者血管内或其它管腔内的插入也均包含于本发明,还包括各种基质、聚合物、屏障和医师可得到的其它任选物。实际上,材料的选择(如溶剂、聚合物、屏障层、基质等)和精确的方法可通过常规试

验进行优化,这种优化依赖于所选的化合物。换言之,在给定的例子中使用常规试验可清楚地获得支架样式或组合物、溶剂、共溶剂、聚合物、共聚物、涂层、屏障、负载药物的方法、浓度或时间或温度的范围等所需的和最佳的选择。

下面提供了药学应用、制剂、剂量和给药的进一步的讨论。

### 发明详述

阅读此文时,除非另有指示,应用下述信息和定义。另外,除非另有指示,所有出现的官能团均独立地选择,因为在一些两次出现的官能团可相同和不同情况下,已使用斜线标记和原形清楚的表明以提醒读者(如, R 和 R')。

此处所用术语“脂肪族”包括饱和的和饱和的(但非芳香的)直链的(即不分支的)、支链的、环状的或多环的非芳香烃部分,其任选地被一个或多个官能团取代。除非另有指定,烷基、其它脂肪族、烷氧和酰基基团优选包含 1-8,许多情况下为 1-6 个邻近的脂肪族碳原子。例示的脂肪族基团因此包括,例如,甲基、乙基、n-丙基、异丙基、环丙基、-CH<sub>2</sub>-环丙基、烯丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、环丁基、-CH<sub>2</sub>-环丁基、正戊基、仲戊基、异戊基、叔戊基、环戊基、-CH<sub>2</sub>-环戊基、正己基、仲己基、环己基、-CH<sub>2</sub>-环己基部分等,其又可含一个或多个取代基。

术语“脂肪族”因此包括烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基和环炔基部分。

如此处所用的术语“烷基”包括直链的、支链的和环状的烷基基团。类似的惯例应用于其它通用术语如“烯基”、“炔基”等。此外,如此处所用的“烷基”、“烯基”、“炔基”等词包含取代的和未取代的基团。

术语“烷基”是指通常具有一至八个,优选一至六个碳原子的基团。例如,“烷基”可指甲基、乙基、正丙基、异丙基、环丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、环丁基、环丁基、正戊基、异戊基、叔戊基、环戊基、己基、异己基、环己基等。适宜的被取代的烷基包括,但不限于,氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2-氟乙基、3-氟丙基、羟甲基、2-羟乙基、3-羟丙基、苯甲基、取代苯甲基等。

术语“烯基”是指通常具有二至八个,优选二至六个碳原子的基团。例如,“烯基”可指 2-丙烯、2-丁烯、3-丁烯、2-甲基-2-丙烯、2-己烯、5-己烯、2,3-

二甲基-2-丁烯等。“炔基”也指具有二至八个，优选二至六个碳原子的基团，包括但不限于，2-丙炔、2-丁炔、3-丁炔、2-戊炔、3-甲基-4-戊炔、2-己炔、5-己炔等。

此处所用术语“环烷基”特别是指具有三至七个，优选三至十个碳原子。适宜的环烷基包括，但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基等，如在其它脂肪族的或杂脂族的或杂环族的部分的例子中一样，环烷基任选地被取代。

此处所用术语“杂脂族”是指含有一个或多个氧、硫、氮、磷或硅原子的脂肪族部分，如替换了碳原子。杂脂族部分可是分支的，未分支的或环状的以及包括杂环如吗啉基、吡咯烷基等。

此处所用术语“杂环”、“杂环基”，或“杂环的”是指五至十四元，优选五至十元非芳香环系，其中一个或多个环碳原子，优选一至四个分别被杂原子如 N, O 或 S 替换。杂环非限定性的例子包括 3-1H-苯并咪唑-2-酮、(1-取代的)-2-氧-苯并咪唑-3-基、2-四氢呋喃基、3-四氢呋喃基、2-四氢噻吩基、3-四氢噻吩基、2-吗啉基、3-吗啉基、4-吗啉基、2-硫代吗啉基、3-硫代吗啉基、4-硫代吗啉基、1-吡咯烷基、2-吡咯烷基、3-吡咯烷基、1-哌嗪、2-哌嗪、1-哌啶、2-哌啶、3-哌啶、4-哌啶、4-噻唑烷、diazolonyl、N-substituted diazolonyl、1-苯并吡咯酮基(1-phthalimidinyl)、苯并氧杂环己烷基、苯并吡咯烷基、苯并哌啶基、苯并氧杂环戊烷基、苯并硫杂环戊烷基和苯并硫杂环己烷基。如此处所用的术语“杂环基”或“杂环的”范围内还包括，其中含杂原子的非芳香环与一个或多个芳香环或非芳香环稠和的基团，如二氢吲哚基、苯并二氢吡喃、菲啶基，其中游离基或连接点在含杂原子的非芳香环上。术语“杂环”、“杂环基”，或“杂环的”可为饱和的或部分不饱和的，还可指任选地被取代的环。

单独使用或作为较大部分如“芳烷基”、“芳烷氧基”，或“芳氧烷基”中一部分的术语“芳基”是指五元至十四元的芳香环基团，如苯基、1-萘基、2-萘基、1-蒎基和 2-蒎基。术语“芳基”还指任选性被取代的环。术语“芳基”可与术语“芳环”交换使用。“芳基”还包括芳环与一个或多个环稠和的多环芳香环系。非限定性的芳香环基团的有用例子包括苯基、卤苯基、烷氧基苯基、二烷氧基苯基、三烷氧基苯基、1-萘基、2-萘基、1-蒎基和 2-蒎基。此处所用的术语“芳基”还包括芳环与一个或多个非芳环稠和的基团，如 2,3-二氢化茚、菲啶基或四氢喹啉基，其中游离基或连接点在芳环上。



此处所用术语“杂芳基”是指含有 3-14 通常含有 5-14 碳原子的稳定的杂环的和多杂环的芳香部分，此部分可被取代或未取代且可含有一个或多个环。取代基包括任一前述取代基。典型的杂芳环的例子包括 5 元单环基团如噻吩、吡咯、咪唑、吡唑、呋喃、异噻唑、呋咱基、异噁唑、噻唑等；6 元单环基团如吡啶、吡嗪、嘧啶、哒嗪、三嗪等；多杂环基团如苯并[b]噻吩、萘并[2,3-b]噻吩、噻萸、异苯并呋喃、苯并二氢呋喃、口占吨基、酚噻吩基(phenoxathienyl)、中氮茛基(indolizinyI)、异吲哚基、吲哚基、吲唑基、嘌呤基、异喹啉基、喹啉基、2,3-二氮杂萘、1,5-二氮杂萘、喹喔啉基、苯并噻唑、喹唑啉基、苯并噻唑、苯并咪唑、四氢喹啉噌啉、蝶啶基、呋唑基、 $\beta$ -呋啉、菲啶基、吡啶基(acridinyl)、萘嵌间二氮杂萘基(perimidinyl)、菲咯啉基、吩嗪基、异噻唑基、吩噻嗪基、吩噁嗪基等(参见如 Katritzky, Handbook of Heterocyclic Chemistry)。杂芳环的其它特例包括 2-呋喃基、3-呋喃基、N-咪唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、5-咪唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噁二唑基、5-噁二唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、5-噁唑基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、3-哒嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、5-四氮唑基、2-三氮唑基、5-三氮唑基、2-噻吩基、3-噻吩基、呋唑基、苯并咪唑基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、吲哚基、喹啉基、苯并三氮唑基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、苯并咪唑基、异喹啉基、吲哚基、异吲哚基、吡啶基或苯并异噁唑基。杂芳基还包括杂芳环与一个或多个芳香或非芳香环稠和的基团，其中游离基或连接点在杂芳环上。例如四氢喹啉、四氢异喹啉和吡啶并[3,4-d]嘧啶。术语“杂芳基”还指任选性取代的环。术语“杂芳的”可与术语“杂芳环”和“杂芳香的”互相替换。

芳基(包括芳烷基、芳氧基或芳氧烷基等部分中的芳基部分)或杂芳基(包括杂芳烷基或杂芳氧基等部分中的杂芳基部分)可含有一个或多个取代基。芳基或杂芳基不饱和碳原子上适宜取代基的例子包括卤素、 $-YR^2$ (即, 包括  $-R^2$ 、 $-OR^2$ 、 $-SR^2$  和  $-NR^2R^5$ )、 $-Y-C(=O)R^2$ 、 $-Y-C(=O)OR^2$ 、 $-Y-C(=O)NR^2R^5$ 、 $-Y-C(=NR^2)NR^2R^5$ 、 $-COCOR^2$ 、 $-COMCOR^2$ )、J、 $-CN$ 、 $-S(=O)R^2$ 、 $-SO_2R^2$ 、 $-SO_2NR^2R^5$ 、 $-NO^2$ 、 $-NR^5SO_2R^2$  和  $-NR^5SO_2NR^2R^5$ 。进一步的, Y 是  $NR^2$  的取代基因此尤其包括  $-NR^2C(=O)R^5$ 、 $-NR^2C(=O)NR^5$ 、 $-NR^2C(=O)OR^5$  和  $-NR^2C(=NH)NR^5$ 。注意  $R^2$  和  $R^5$  本身可被取代和未取代(如非限定性的说明,

$R^5$  部分包括-烷卤如氯甲烷和三氯甲烷；-烷氧基烷基如甲氧基乙基-；单-，二-和三-烷氧基苯基；甲撑二氧苯基和乙撑二氧苯基；卤代苯基；和烷氨基)。其它的说明性例子包括 1,2-甲撑基-二氧、1,2-乙撑二氧、保护的 OH(如芳氧基)、苯基、取代苯基、-O-苯乙基(即- $CH_2CH_2C_6H_5$ )、-O-(取代)苯乙基、-C(O)CH<sub>2</sub>C(O)R<sup>2</sup>、-CO<sub>2</sub>R<sup>2</sup>、-C(=O)R<sup>2</sup>(即当 R<sup>2</sup> 是脂肪族时为酰基，当 R<sup>2</sup> 是芳基时为芳酰基，当 R<sup>2</sup> 是杂芳基时为杂芳酰基)、-C(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>5</sup>、-OC(=O)NR<sup>2</sup>R<sup>5</sup>、-C(=NH)NR<sup>2</sup>R<sup>5</sup> 和 -OC(=NH)NR<sup>2</sup>R<sup>5</sup>。取代基的其它例子包括氨基、烷氨基、二烷氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷氨基羰基、二烷氨基羰基、烷氨基羰氧基、二烷氨基羰氧基、烷氧基、硝基、腈基、羧基、烷氧羰基、烷羰基、羟基、卤烷氧基以及卤代烷基。

脂肪族的、杂脂族的或非芳香杂环可含有一个和多个取代基。这些基团适宜取代基的例子包括那些列于上面的芳基和杂芳基碳原子的取代基，此外包括下面饱和碳原子的取代基： $=O$ 、 $=S$ 、 $=NR^2$ 、 $=NNR^2R^5$ 、 $=NNHC(O)R^2$ 、 $=NNHCO_2R^2$  或  $=NNHSO_2R^2$ 。脂肪族的、杂脂族的或非芳香杂环上取代基的说明性例子包括氨基、烷氨基、二烷氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷氨基羰基、二烷氨基羰基、烷氨基羰氧基、二烷氨基羰氧基、烷氧基、硝基、腈基、羧基、烷氧羰基、烷羰基、羟基、卤烷氧基以及卤代烷基。

芳香或非芳香环上说明性的取代基包括  $-R^2$ 、 $-NR^2R^5$ 、 $-C(=O)R^2$ 、 $-C(=O)OR^2$ 、 $-C(=O)NR^2R^5$ 、 $-C(=NR^2)NR^2R^5$ 、 $-COCOR^2$ 、 $-COMCOR^2$ 、 $-CN$ 、 $-NR^5SO_2R^2$  和  $-NR^5SO_2NR^2R^5$ 。

脂肪基或苯环上取代基的例子包括氨基、烷氨基、二烷氨基、氨基羰基、卤素、烷基、烷氨基羰基、二烷氨基羰基、烷氨基羰氧基、二烷氨基羰氧基、烷氧基、硝基、腈基、羧基、烷氧羰基、烷羰基、羟基、卤烷氧基以及卤代烷基。

只有当所得化合物是稳定的或化学上可得到的时，才允许对取代基或变量进行组合。稳定的或化学上可得到的化合物是指在没有湿气或其它可引发化学反应的物质存在下，于 40°C 以内的温度下保存一周，基本上不变化的化合物。

本发明的一些化合物存在互变异构的形式，除非特别指出，本发明包括那些化合物的所有互变异构形式。

除非另有说明，此处描述的结构还包括其所有立体化学的形式，即各不

对称中心的 R 和 S 构型。因此，单独的立体化学异构体以及对映体的或非对映体的混合物均在本发明范围内。这样，本发明包含各非对映体或基本不含其它异构体的对映体(每摩尔中纯立体异构体的量>90%，优选>95%)以及各异构体的混合物。(本文化学结构中的波浪线，如式 I 中 43 和 28 位的波浪线表示或为 R 构型或为 S 构型。)

除非另有说明，此处描述的结构还包括含有一个或多个同位素富集的原子的化合物。例如，具有此结构的化合物包括用氘或氚替换氢原子，或者用  $^{13}\text{C}$  或  $^{14}\text{C}$ -富集原子替换碳原子等的化合物也包括在本发明的范围内。

相对于除 43 位外其它位置的 0、1、2、3、4、5、6、或 7(或更多)个取代部分或官能团，此处所述的包含 JQA-的雷帕类似物(即，包含 43-JQA 的雷帕类似物)可能与相应的包含 43-JQA 的雷帕霉素衍生物不同。本发明的一类雷帕类似物包括相对于雷帕霉素未经其它修饰的，即，除 43 位的 JQA 修饰外均未变化。另一类包含 JQA-的雷帕类似物在 C7、C13、C14、C24、C28 和 C30 的任 1、2、3、4、5 或全部的 6 个位置进行了其它修饰。许多先前已知的雷帕类似物进行了结构修饰(参见如 WO 99/36553, Table III 以及 Liberles 等, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94: 7825-7830 等)，可容易地适用于本发明。还可参见 WO 01/14387，已在此引用作为参考，尤其包括 24-30 页，提供了可用于设计含 JQA-的雷帕类似物的已知的对雷帕霉素的修饰或联合修饰。

对于实践本发明方法一特别有意义的亚类包含 JQA-的雷帕类似物是  $\text{R}^{\text{C}7\text{a}}$  为非 OMe 部分的化合物(或其药学上可接受的衍生物)。此亚类(“C7 包含 JQA-的雷帕类似物”)包括的化合物的  $\text{R}^{7\text{a}}$  和  $\text{R}^{7\text{b}}$  之一是 H，且另一个选自  $-\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{Z}-\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{Z}-(\text{CO})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{Z}-(\text{CO})\text{Z}\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{N}\text{R}^{\text{A}}\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$  和  $-\text{N}\text{SO}_2\text{R}^{\text{A}}$ ，其中各 Z 独立是 O、S 或  $\text{N}\text{R}^{\text{A}}$ 。说明性地，此亚类包含 JQA-的雷帕类似物的 C7 取代基选自如下基团：芳基；杂芳基；芳基；杂芳基或苄醚；以及  $-\text{NH}(\text{CO})\text{O}\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{NH}(\text{CO})\text{R}^{\text{A}}$ 、 $-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{R}^{\text{A}}$  或  $-\text{NH}(\text{SO}_2)\text{N}\text{H}\text{R}^{\text{A}}$ (其中  $\text{R}^{\text{A}}$  是取代或未取代的低级烷基，如甲基、乙基、异丙基、丁基、苄基等，或是取代或未取代的苯基(如对甲苯))；此亚类的一些具体方案中， $\text{R}^{7\text{a}}$  和  $\text{R}^{7\text{b}}$  独立选自如下基团：H；取代和未取代的二至八个碳原子的直链、支链和环状的烯基、烷氧基和烷硫基；以及取代或未取代芳基、杂芳基、芳氧基或杂芳氧基、芳硫基或杂芳硫基。此亚类化合物尤其包括的化合物的  $\text{R}^{7\text{a}}$  是 H；(与  $\text{R}^{7\text{b}}$  一起)=O；烷氧基；烷

硫基；氨基(一级、二级、三级或四级)；酰胺基；氨基甲酸基；芳基或取代芳基；苯基或取代苯基；取代或未取代杂芳基如取代或未取代苯硫基，呋喃基，吡啶基等；或苄氧基或取代苄氧基。其它可用于本发明方法实践的说明性的含 JQA-的雷帕类似物包括的化合物的  $R^{7a}$  和  $R^{7b}$  之一是 H，且另一个选自 -OEt、-O-丙基、-O-丁基、-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-OH、-O-苄基、-O-取代苄基(包括如 3-硝基、4-氯、3-碘-4-重氮基-、3,4-二甲氧基-和 2-甲氧基-)、-S-Me、-S-苯基、-O(CO)Me、-烯丙基、-CH<sub>2</sub>C(Me)=CH<sub>2</sub>、-OCH<sub>2</sub>-CCH、-OCH<sub>2</sub>-CC-Me、-OCH<sub>2</sub>-CC-Et、-OCH<sub>2</sub>-CC-CH<sub>2</sub>OH 或 -2,4-二甲氧基苯基、2,4,6-三甲氧基苯基、呋喃基、噻吩基、甲基噻吩基、吡咯基和吡啶基。具有特殊意义的 C7 修饰的包含 JQA-的雷帕类似物的 C7 位含有取代或未取代芳香醚，取代或未取代苄醚或氨基甲酸酯部分。在 C7 修饰的具体例子中，C43 位取代基可为任一立体化学方向(或是异构体的化合物)。C7 包含 JQA-的雷帕类似物可较相应的 C7 修饰的雷帕霉素在 1、2、3、4、5 或更多的其它位置进行变化。

包含 43 JQA-的雷帕类似物和 C7 JQA-的雷帕类似物具有特殊意义。

在本发明各种方法的实践中具有特殊意义的另一亚类包含 JQA-的雷帕类似物的 C24 和 C30 取代基均不为(=O)。具有特殊意义的 C24 和 C30 取代基公开于 WO 99/36553 中。此亚类尤其包括的化合物的所有  $R^{C30}$  和  $R^{C24}$  是 OH，且  $R^{C7a}$  和  $R^{C7b}$  包含此处指定的任一替换取代基，包括 WO 01/14387 中指出的任一 C7 取代基。具有特殊意义的化合物的  $R^{C7a}$  和  $R^{C7b}$  是环脂基、芳基、杂环基或杂芳基，任选性被取代。属于此亚类范围内的其它化合物包括 1、2、3、4 或 5 个羟基差向异构化、氟化、烷基化、酰化或经其它酯、氨基甲酸酯、碳酸酯或尿素形式进行修饰的那些化合物。一个说明性的包含 JQA-的雷帕类似物的例子中的 C28 和 C30 羟基烷基化，酰化或通过碳酸酯形式连接。

另一具有特殊意义的含 JQA-的雷帕类似物的亚类为包含单-和二氟-JQA 的雷帕类似物，其在 C13 和 C28 含有 F，公开于 WO 99/36553，包含 JQA-的雷帕类似物分子的其它位置可进行也可不进行其它改变。

另一亚类有意义的含 JQA-的雷帕类似物的  $R^{C24}$  不是=O，在其它位置进行或不进行一种或多种相对于雷帕霉素的修饰。

其它有意义的含 JQA-的雷帕类似物包括  $R^{C14}$  是 OH 的化合物。

此外，本发明包括的含 JQA-的雷帕类似物，其使得雷帕霉素的 1、2、

3、4 或 5、6 位碳-碳双键中的一个或多个饱和，或还同时修饰分子的其它地方，如修饰 C7、C13、C24、C28 和/或 C30 中的一个或多处。使用本领域已知的方法，使得此处公开的任一化合物的 C3、C4 双键环氧化；以-CH<sub>2</sub>OH 或-CH<sub>2</sub>OMe 替换 C6 甲基；使 C42 甲氧基部分去甲基化，均是有效的修饰手段。

### 合成指导

通过发酵以及全合成生产雷帕霉素是已知的。通过发酵生产雷帕类似物也是已知的。这些尤其包括对雷帕霉素特征性的环己烷环或哌啶酯环替换为其它替代性部分的雷帕类似物，也包括 C7-去甲基-雷帕霉素、C29-去甲基-雷帕霉素和 C29-去甲氧基雷帕霉素。

文献中已知影响雷帕霉素和结构相关的大环内酯物的各种化学转化的方法和材料。许多雷帕霉素和各种雷帕霉素类似物的这些化学转化在专利文献中公开了，这些可用于本发明主题实践的文献在 WO/014387 表 I 中进行了说明，以帮助阐明化学合成和产品回收、纯化以及配制方面的技术和知识的水平。为了说明，记录了几种可应用于生产所需雷帕类似物的有代表性的转化和/或参考：

修饰的 环位置	参考文献
C7	Luengo 等, J Org Chem 59, 6512 (1995); Chem & Biol 2(7), 471-481 (1995)
C14	Schubert 等, Angew Chemie Int Ed Engl 23, 167 (1984)
C20	Nelson, US Patent No. 5,387,680
C-24	US Patent Nos. 5,373,014 和 5,378,836; Lane 等, Synthesis 1975, p./136
C-30	Luengo 等, Tet Lett 35, 6469 (1994)

还可参见：US 5,100,883; 5,118,677; 5,118,678; 5,130,307; 5,177,203 和 5,194,447 中有关制备雷帕霉素的氟化酯、酰胺酯、氨基甲酸酯、氨基酯、磺酸酯和氨基磺酸酯以及磺酰氨基甲酸酯的材料和方法。

此外，可依照如 WO/014387 中的描述轻易地将雷帕霉素转化为 28-表雷帕霉素。此文献还说明了影响许多其它已知的雷帕霉素转化的材料和方法。还可参见那里引用的参考以及 US 2001-0010920。28-表雷帕霉素可在本发明

的实践中替换雷帕霉素以获得依照本发明在 43 位进行修饰的相应的 28-表雷帕霉素。

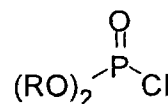
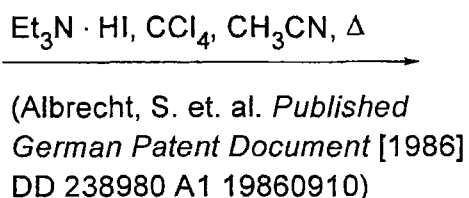
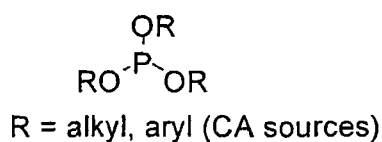
相似地，使用已知方法还原 24 和 30 位的一个或两个酮基是可行的，如将以前用于雷帕霉素自身的方法用于此处公开的 C-43 雷帕类似物，以获得依照本发明在 43 位进行修饰的相应的 24-羟基、30-羟基-或 24,30-四氢-雷帕类似物。

可以预期，用作生产 43-JQA-雷帕类似物中间体的雷帕类似物可由如 Katz 等在 WO 93/13663 和 Cane 等在 WO 9702358 中所描述的直接生物合成的方法制备。还可参见 Khaw 等 1998, *J. Bacteriology* **180** (4): 809-814 中的其它生物学方法。

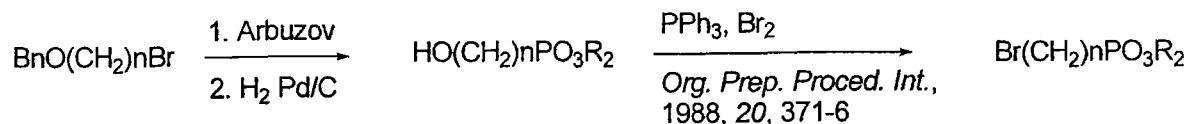
本发明的雷帕类似物可由掌握本领域常规技术的人员据如此处的公开中教导的本领域已知的方法和材料制备。例如，可适用上面引用文献中所阐明的或所参考的方法中的方法和材料，其全部内容在此公开并引用为参考。以说明和进一步指导的方式为执行者提供了其它的指导和例子。还应理解为，具有本领域常规技能的化学家可轻易地对前述方法进行修改，如在合成过程中给敏感基团填加适当的保护基，随后不需要或不想要时脱去保护基，以及可轻易地确定其它合成路线。

对于应用者可能有意义的一些其它的转化显示如下，包括生产所述的 C-43 含磷雷帕类似物的试剂的制备：

#### 二烷基/二芳基氯代磷酸酯的制备



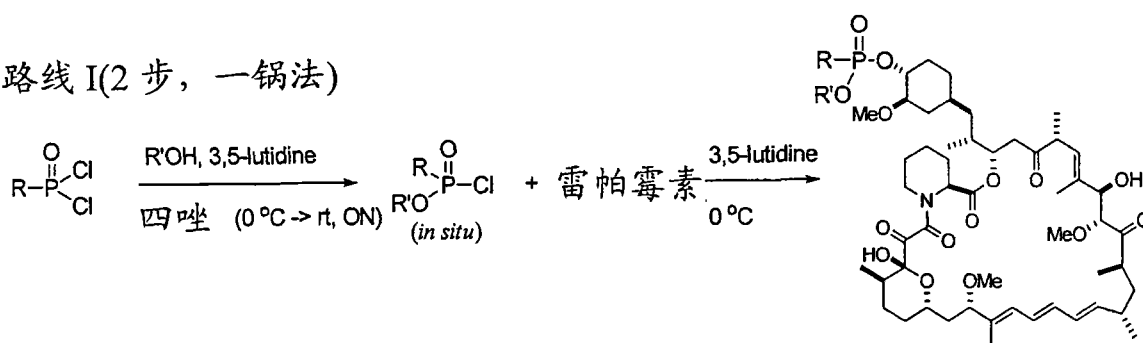
#### 烷基卤化物磷酸酯的制备



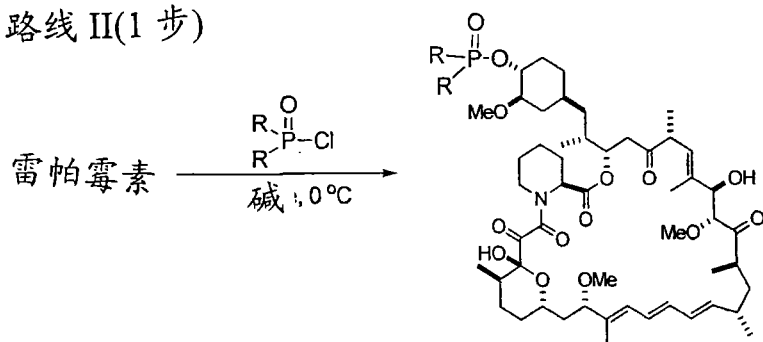
使用前述各类试剂制备某些本发明雷帕类似物的说明性路线表示如下:

路线 I(2 步, 一锅法)

路线 I(2 步, 一锅法)



路线 II(1 步)



本发明化合物的合成通常包括制备所需“J”部分的活化形式,如上所示的磷酰氯(如(R)(RO)P-Cl 或 RR'P(=O)-Cl 等),将此试剂与雷帕霉素(或适当的雷帕类似物)在可得到所需产物的条件下反应,该产物可从残留反应物或任何不需要的副产物中回收。可使用常规方法和材料选择、增加和脱去保护基。

本发明化合物的纯化

科学和专利文献中已报道了许多用于纯化雷帕霉素和各种雷帕类似物的材料和方法,这些材料和方法均适用于纯化本文公开的雷帕类似物。使用

BIOTAGE 预填充的筒系统进行快速层析特别有效。实施例公开的典型方案如下。

#### 本发明化合物的理化特性

雷帕类似物的鉴定、纯化和化学/物料性质可由已知的方法和材料包括 HPLC、质谱分析、X 射线晶体学和 NMR 波谱进行测定或确证。由于具有反向 HPLC 分析(分析柱, 粒径 3 微米, 孔径 120 埃, 温度恒定在 50°C, 流动相为 50%乙腈、5% 甲醇和 45% 水(均为体积比), 例如, 等度洗脱系统, 通过 UV 检测器于 280 纳米处检测洗脱的产物和杂质峰), 使用典型的弛豫为 3 秒的波谱仪获得的高分辨  $1D^1H$  和  $31P$  NMR 波谱被证明是有用的。也可使用正相 HPLC, 尤其是评价雷帕霉素或雷帕霉素副产物的残留水平。可使用传统方法估定存在的残留溶剂、重金属、湿气和 bioburden。

#### 本发明化合物的生物特性

雷帕类似物的生物特性可由已知的方法和材料测定, 包括如测量其与 FKBP12 结合的方法, 对 T 细胞增殖的抑制, 抗真菌活性, 在体外或体内的抗肿瘤活性(如在体外和/或体内对一种或多种肿瘤细胞系的抑制), 免疫抑制活性, 以及在基于包含 FKBP-和 FRAP-的融合蛋白的 3-杂交测试中的活性。Sorbera 等在 *Drugs of the Future* 2002, 27(1): 7 - 13 中在公开或参考了这些测定法的例子, 该文献在此引用作为参考。

#### 结合性质, 测定

已知雷帕霉素会与人类蛋白 FKBP12 结合从而形成与 hFKBP12 和 FRAP 的三聚体复合物, 此复合物是酵母蛋白 TOR1 和 TOR2 的人类对应物。可在与人 FKBP12 结合和/或与人 FKBP12 以及人 FRAP(或包含其 FRB 结构域的融合蛋白或片段)形成三聚复合物的能力方面对雷帕类似物和雷帕霉素进行比较并表征。参见 WO 96/41865(Clackson 等), 此申请公开了多种分别用于定量测定化合物与人 FKBP12 结合或与包含人 FKBP12 及人 FRAP 的 FRB 结构域的蛋白形成三聚复合物(即杂二聚)的能力。这些测定法包括测量结合的荧光偏振分析。其它有用的测定法包括基于细胞的转录测定, 该方法通过测量在化合物存在下哺乳动物的工程细胞中观测到所产生的报告基因产物的水平, 从而非直接地测定雷帕类似物形成三聚复合物的相关能力。相应的基于细胞的测定可用于工程酵母细胞。参见如 WO 95/33052(Berlin 等)。

通常优选的本发明的雷帕类似物是生理上可接受的(即, 对所作用的细



胞或有机体没有不适当的毒性), 可口服或可经胃肠外给予动物和/或需要特别应用时, 可穿过细胞膜和其它生物膜。

在某些情况下, 如在抗真菌中的应用或引发遗传工程的生物转变, 优选那些优先与突变体或真菌结合蛋白而非与人类相似结合蛋白相结合的雷帕类似物。突变体结合蛋白的一个非限定性的例子是其中 Phe36 被不同氨基酸, 优选具有较小侧链的氨基酸如缬氨酸或丙氨酸替换的人 FKBP。例如, 这样的化合物可以优先地与突变体 FKBP 结合, 至少超过它们与人 FKBP12 的结合能力一个数量级, 在某些情况下, 采用任何符合科学规律的或本领域可接受地测定方法进行测定, 这些化合物与突变体 FKBP 的结合超过它们与人 FKBP12 的结合 2 以至 3 或更多数量级。

本发明各种雷帕类似物对于人 FKBP12, 其变异体或其它亲免疫蛋白的结合亲和力可以通过适用已知的用于 FKBP 的方法测定。例如, 专业人员可以测量本发明化合物与已知配体对有意义蛋白竞争结合的能力。参见例如 Sierkierka 等 1989, Nature 341, 755-757(试验化合物与标记的 FK506 衍生物对 FKBP 的竞争结合)。

通过直接结合测量(例如荧光猝灭)、竞争结合测量(如与 FK506 比较)、FKBP 酶活性的抑制(旋转异构酶)或其它测定方法进行测量时, 本发明某些雷帕类似物与人 FKBP12, 与如上讨论地其突变体, 与包含这样的 FKBP 区域的融合蛋白的结合具有特殊意义, 其  $K_d$  值低于约 200nM, 更优选低于约 50nM, 甚至更优选低于约 10nM, 并且甚至更优选低于约 1nM。

WO99/36553 和 WO96/41865 中详细描述了竞争性结合 FP 测定法。此测定法可在体外测量给定化合物的  $IC_{50}$ , 其反应了化合物与标记的 FKBP 配体, 如 FK506, 对 FKBP 蛋白竞争结合的能力。

本发明一类有意义的化合物对于给定的 FKBP 区域和配体对, 如人 FKBP12 或其具有至多 10 个, 优选 1-5 个氨基酸替换的变异体在竞争性结合 FP 测定法(如, 使用荧光标记的 FK506 标准)中测得的  $IC_{50}$  值好于 1000, 优选好于 300nM, 更优选好于 100nM, 并且甚至好于 10nM。

在细胞水平测量中, 雷帕类似物与嵌合蛋白多聚化的能力可以通过测量这样的多聚化引发的事件的出现而测量。例如, 可使用包含并且能够表达编码第一嵌合蛋白的 DNA 以及编码第二嵌合蛋白的 DNA 的细胞, 其中, 第一嵌合蛋白包含一种或多种 FKBP 区域和一种或多种效应器区域, 第二嵌合

蛋白包含 FRB 区域和一种或多种能够在多聚化中启动生物反应的效应器区域。我们优选使用还包含报告基因的细胞,该报告基因受对嵌合蛋白多聚化起反应的调节元件(即启动子)的转录控制。WO 99/36553 和 WO 96/41865 和此节及上述部分中引用的其它国际专利申请中描述了说明性成分的设计和制备及其在这些工程细胞中的应用。(还可参见 WO99/10510 关于对有意义雷帕类似物起反应的细胞和动物中核酸的设计,装配和释放的附加指导以及应用这样的体系的附加指导。)该细胞在培养物中生长或维持。雷帕类似物加入培养基,经合适的孵化期后(允许基因表达和分泌,如几个小时或过夜)测量报告基因的存在。由于报告基因产物出现而观察到的阳性结果,即多聚化,与报告基因的转录相关。报告基因可是便于检测的蛋白(如,通过 ELISA)或可催化产生便于检测的产物(如有色的)。此节前面所引用的国际专利申请公开了产生用于这样测试的合适的细胞细的材料和方法。典型使用的靶基因包括,例如 SEAP、hGH、 $\beta$ -半乳糖、绿色荧光蛋白和荧光素酶,它们便于测定,且可商业购得。

这样的测定允许专业人员选择具有所需的 IC50 值和/或结合特性的雷帕类似物。竞争性结合 FP 测定允许专业人员选择具有所需的 IC50 值和/或相对于对照如 FK506 优先结合突变体 FKBP 或野生型 FKBP 的雷帕类似物。

## 应用

可如 WO94/18317、WO95/02684、WO96/20951、WO95/41865、WO99/36553 和 WO/01/14387 的描述使用本发明的雷帕类似物,如调节激活生长于培养物或有机体整体中工程细胞所需基因的转录、删除靶基因、启动细胞凋亡或引发其它生物学转变,包括基因治疗的应用。此外,本发明的一些化合物具有免疫抑制和/或抗癌和/或抗炎活性和/或抗增殖和/或抗真菌活性,和/或抑制体外胸腺细胞增殖,可使用常规的测定方法进行定量和比较。那些化合物因此在治疗或抑制器官或组织的移植排异;自身免疫疾病如狼疮,风湿性关节炎,糖尿病和多发性硬化症;真菌感染;炎症(如牛皮癣、eczema、皮炎、炎症肠病和肺炎如哮喘、慢性阻塞性肺疾病、emphysema、支气管炎等);过度增殖性血管病(如,引入血管支架后的再狭窄)(参见如 Sousa 等, *Circulation*, 2001, 103: 192-195);综合征如结节性硬化症(参见如 Kwiatkowski 等 *Human Molecular Genetics*, 2002, 11 卷, No.5, 525 - 534 页)

和某些癌症(如, 乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、胰癌、结肠癌、头颈癌、胶质母细胞瘤或其它脑癌、黑色素瘤和宫颈癌)特别是 PTEN-缺陷性肿瘤(参见如 Neshat 等, PNAS 98(18): 10314-10319; Podsypanina 等 PNAS 98(18): 01320-01325; Mills 等 PNAS 98(18): 10031-10033; Hidalgo 等, Oncogene (2000) 19, 6680-6688)。本发明的某些化合物是令人感兴趣的, 由于它们具有抑制破骨细胞的功能, 在治疗衰弱的骨病症如骨质疏松, 特别是近绝经期或绝经后伴随的骨质疏松可能是有用的。我们还在考虑将本发明化合物给予患者治疗其所患的或有患病危险的如下疾病: 佩吉特病、伴随骨瘤的高血钙和其它类型的骨质疏松症和相关疾病, 包括但不限于卷绕型骨质疏松(involutional osteoporosis)、I 型或绝经后骨质疏松症、II 型或老年骨质疏松症、幼年骨质疏松症、特发性骨质疏松症、内分泌异常、甲状腺功能亢进症、性腺功能减退症、卵巢发育不全或特纳综合征、肾上腺皮质功能亢进或库欣综合征、甲状旁腺功能亢进症、骨髓异常、多发性骨髓瘤和相关疾病、系统肥大细胞增生、散播性肿瘤、Gaucher's 病、结缔组织异常、成骨不全、高胱氨酸尿症、埃勒斯-当洛综合征、马方综合征、门克斯综合征、固定或失重、Sudeck's 萎缩、慢性梗阻性肺疾病、长期肝素给药和抗惊厥剂长期摄入。

下面进一步讨论其中的几种应用。

#### 1. 调节基因治疗。

在许多情况下, 随意开关治疗基因或调节其表达水平的能力对于疗效是重要的。本发明特别适用于实现人类基因治疗中治疗靶基因的调控表达。一个例子中使用了嵌合蛋白对(一个至少包含一个 FKBP: 蛋白的雷帕霉素结合域("FRB"区域), FRAP, 另一个包含至少一个 FKBP 区域), 能够二聚化嵌合蛋白的本发明雷帕类似物, 和靶基因构成物。一个嵌合蛋白包含 DNA 结合区域, 优选如 Pomerantz 等描述的磺胺甲氧嗪作为异源效应器区域的复合 DNA 结合区域。第二嵌合蛋白包含作为异源效应器的区域的转录激活区域。雷帕类似物能够与两个嵌合蛋白结合, 由此有效地与它们交联。编码且能指导这些嵌合蛋白表达 DNA 分子被引入进行基因工程的细胞中。连接有与 DNA 结合区域相结合的 DNA 序列的靶基因也被引入细胞中。用雷帕类似物接触工程细胞或其子代(通过向其动物或人给药)导致转录因子复合物的装配, 并由此表达靶基因。PCT/US93/01617 和 WO 96/47865(Clackson 等)中公开了类似成分的设计和使用。实践中, 靶基因的表达水平应该是嵌合蛋白转

录因子复合物的数目或浓度的函数，它也是雷帕类似物的函数。典型地观察到了(雷帕类似物的)剂量-反应的基因表达。

雷帕类似物可按照要求给予接受者以激活靶基因的转录。取决于雷帕类似物的亲和力、要求的反应、给药的方式、雷帕类似物和/或靶基因 mRNA 的生物半衰期、存在的工程细胞的数目，可使用各种方案。雷帕类似物可通过各种途径给药，包括胃肠外或口服。给药次数取决于上述因素。雷帕类似物可作为药丸、粉末或分散剂口服；口腔给药；舌下给药；吸入给药；或血管内、腹膜内、肌内、皮下或关节内注射。雷帕类似物(和单体拮抗剂化合物)可使用本领域所熟知的常规方法和原料制备用于各种给药途径的制剂。给药的精确剂量和特别的方法取决于上述因素，可由主治医师或人或动物的保健提供者测定。在很大程度上，给药方式凭经验决定。

雷帕类似物激活的转录被反转或终止时，终止雷帕类似物的给药。此外，如果需要，可给予与雷帕类似物竞争的单体化合物。因此，如果产生有害反应或需要终止疗效时，可以任何方便的方式给予二聚化的拮抗剂，如果需要迅速的反转特别应选血管内给药。或者，在配体结合区域提供钝化区域(或转录沉默基因)。

另一种方法中，经基因工程化的细胞表达如前所述的一对包含 FRB 和 FKBP 区域的嵌合蛋白，但其包含替换 DNA 结合区域或转录激活区域的细胞信号区域。已知这样的信号区域在其聚集或二聚化或寡聚化时引发细胞死亡、增殖或分化。此方法允许由雷帕类似物介导对遗传工程细胞或有机体内的细胞信号(即，细胞死亡、增殖或分化的信号)进行调节，如其它地方所述的方法适用于本发明的雷帕类似物。参见国际专利申请 PCT/US94/01617 和 PCT/US94/08008。

根据对用于治疗的剂量的监测方法可以确定雷帕类似物在任何应用中的特定剂量，需要维持较长时间的特定表达水平，例如，长于约两周，或者在较短时间内使用单独或重复剂量的雷帕类似物重复治疗时，需要延长的间隔，例如，两周或更多。预定范围内的雷帕类似物剂量被给定并且监控反应，以获得时间-表达水平的关系，以及观察治疗的反应。取决于周期水平和治疗反应，在反应后的下一次可提供较大或较小的剂量。重复该方法，指导获得治疗的范围内的剂量。雷帕类似物长期给药时，首先测定雷帕类似物的维持剂量，然后测定延长的间隔，以确定细胞系统正在发生合适的反应以及产

生的表达产物的水平。

应该意识到，本系统受到许多变量影响，如细胞对雷帕类似物的反应、表达的效率，以及视情况而定，分泌的水平、表达产物的活性、患者的特殊要求，这可随时间和情况而变，作为细胞或个体细胞表达活性损失的结果的细胞活性损失率，等等。

## 2. 重组体蛋白和病毒的产生

商业和研究目的的重组体治疗蛋白常常通过使用基因工程化的哺乳动物细胞系高水平表达蛋白而实现。使用哺乳动物细胞，而不用细菌或酵母，显示需要在转录后进行修饰的蛋白的适当功能一般不通过异源的细胞完成。使用此方法商业生产的蛋白的例子包括红细胞生成素、组织纤溶酶原激活物、凝血因子如因子 VII: c、抗体，等等。用这种方式生产蛋白的成本与基因工程化的细胞中实现的表达水平直接相关。生产这样的蛋白的另一个限制是对寄主细胞的毒性：蛋白表达可防止细胞生长成高密度，急剧地减少生产水平。因此，严格控制蛋白表达的能力，如所述的调节基因治疗，允许细胞在没有蛋白产生时生长成高密度。只有达到最佳的细胞密度后，才激活基因表达，并随后获得蛋白产物。

在生产用于商业(如，基因治疗)和实验的重组病毒时遭遇了相似的结构上和“包装线”的应用上的问题。这些细胞系经基因工程化后产生了病毒蛋白，这些病毒蛋白为装配包含有缺陷的重组体基因组的传染性的病毒颗粒所需要的蛋白。取决于包装线的病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒。在后面的情况下，从包装线中获得病毒原种的滴度与病毒性 rep 和 cap 蛋白的生产水平直接相关。但是这些蛋白对寄主细胞是高毒性的。因此，难以产生高-滴度重组体 AAV 病毒。本发明提供解决这些问题的方案，即允许在此处公开的可调节转录因子控制下放置 rep 和核心基因的包装线结构。包装细胞系可生长成高密度，用辅助病毒感染，然后转染入重组体病毒基因组。然后，加入二聚化试剂诱导包装细胞编码的病毒性蛋白的表达，生产高滴度的产物。

## 3. 生物学研究

本发明适用于各种各样的需要精确控制靶基因表达的生物学试验。其中包括：(1)用于生物学纯化的有意义的蛋白或 RNA 的表达；(2)用于评价其生物学功能的组织培养细胞中的(或体内，经基因工程化的细胞)蛋白或 RNA 的

调控表达；(3)用于评价其生物学功能的转基因动物中的有意义的蛋白或RNA的调控表达；(4)用于评价基因生物学功能的编码另一个作用于内源性基因的调节蛋白、核酶或反义分子的基因的表达调控。PCT/US95/10591中公开了本发明成分适用的转基因动物模型或其它应用。

本发明进一步可用于上述应用的试剂盒。这样的试剂盒包含编码且能够控制本发明嵌合蛋白表达的DNA构建体(且可以包含如上述的其他区域)以及,在涉及调节基因转录的具体方案中,靶基因结构中包含与一个或多个转录控制元件相连的靶基因,这些转录控制元件被嵌合蛋白的多聚化所激活。或者,此靶基因结构可包含供专业人员插入所需靶基因的克隆位点。所述的试剂盒还可包括二聚化试剂,所述的试剂能二聚两个重组蛋白并激活靶基因的转录。此试剂盒还可用于细胞或有机体的基因工程以允许使用本发明的雷帕类似物调节细胞信号(如,导致细胞增殖、分化或死亡)。

#### 4. 其它几种药学上的应用

测试本发明化合物抑制不同癌细胞系的活性中发现,它们能抑制癌细胞生长并因此可有用于抗肿瘤试剂。特别地,本发明化合物在治疗或抑制多种癌症生长时可单独使用或与其它药物和/或放疗合用,所述癌症包括白血病或实体瘤,包括肉瘤和癌症,如星细胞瘤、前列腺癌、乳癌、小细胞肺癌和卵巢癌。例如, Sorbera 等, “CCI-779” Drugs of the Future 2002, 27(1): 7-13; WO 02/4000 和 WO 02/13802 中公开了使用雷帕霉素或 CCI779 的类似物。可与本发明化合物联合(即,给予本发明化合物之前,之中或之后)用于治疗癌症患者的其它药物的例子尤其包括别嘌醇、alemtuzmab、六甲嘧胺、氨磷汀、nastrozole、抗前列腺-抗体膜抗原抗体(如 MLN-591, MLN591RL 和 MLN2704)、三氧化砷 Avastin®(或其它抗-VEGF 抗体)、贝沙罗汀、博来霉素、白消安、加西他滨、卡铂、Gliadel 膜、塞来考昔、苯丁酸氮芥、顺铂、顺铂-肾上腺素胶、克拉屈滨、阿糖胞苷脂质体、柔红比星脂质体、柔红比星、柔红霉素、地拉佐生、紫杉醇、阿霉素、Elliott's B 溶液、表阿霉素、雌莫司汀、依托泊甙磷酸酯、依托泊甙、VP-16、依西美坦、氟达拉滨、5-FU、氟维司群、吉西他滨、gemtuzumab-ozogamicin、戈舍瑞林乙酸酯、羟基脲、伊达比星、伊达比星、盐酸伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸 imatinib、依立替康(或其它拓扑异构酶抑制剂)包括抗体如 MLN576 (XR11576)、来曲唑、甲酰四氢叶酸、甲酰四氢叶酸左旋咪唑、柔红比星脂质体、美法仑、L-PAM、

美司钠、氨甲蝶呤、甲氧沙林、丝裂霉素 C、米托蒽醌、MLN518 和 MLN608(或其它 flr-3 受体酪氨酸激酶抑制剂 PDGF-R 或 c-kit)、itoxantrone、紫杉醇、培加酶、喷司他丁、托瑞米芬、曲妥单抗 (Herceptin®或其它抗-Her2 抗体)、2C4(或其它干涉 HER-2 介导的信号传导的抗体)、维 A 酸、ATRA、戊柔比星、或帕米膦酸钠、zoledronate 或另一个二膦酸酯。

本发明化合物还可用于治疗或抑制移植组织的排异反应,所述的组织包括如,肾、心、肺、骨髓、胰(小岛细胞)、角膜、小肠和皮肤同种移植,和心瓣异种移植物,用于治疗或抑制移植物对抗宿主疾病,用于治疗或抑制移植物自身免疫病如狼疮,类风湿性关节炎,糖尿病,重症肌无力,和多发性硬化症;和炎症疾病如牛皮癣,皮炎,湿疹,皮炎,炎性肠病,肺炎(包括哮喘,慢性梗阻性肺病,肺气肿,急性呼吸窘迫综合征,支气管炎,等等)和眼葡萄膜炎;成人 T-细胞白血病/淋巴瘤,真菌感染,过度增殖性血管疾病包括再狭窄;移植血管动脉粥样硬化;以及心血管疾病,脑血管疾病,和外周血管病,如冠状动脉硬化,脑血管疾病,动脉硬化,动脉粥样硬化,非动脉粥样硬化动脉硬化,或由细胞事件导致的免疫介导的血管损害引起的血管的壁损伤,和抑制中风或多梗塞性痴呆症。本发明雷帕类似物可适用在雷帕霉素、CCI779 或 RAD001 中的这样应用中的方法或材料。

当本发明的雷帕类似物用作免疫抑制剂或抗炎剂时,可与一种或多种其它免疫调节剂合用。这样的免疫调节剂包括,但不限于皮质甾类,如强的松和甲泼尼龙、环磷酰胺、雷帕霉素、环孢菌素、FK-506、OKT-3、mycophenolate、和 ATG。本发明化合物与这样的用于诱导免疫抑制或治疗炎症状况的药物合用时,实现所需的效果需要使用较少量的各种试剂。Stepkowski 建立起了这种合用的基础,其研究结果表明合用各自均在治疗剂量以下的雷帕霉素和环孢菌素 A 显著地延长了心脏同种移植的存活时间。[Transplantation Proc. 23: 507 (1991)]。本发明雷帕类似物可通过如 US5,496,832 中的适当方法和材料用于治疗心脏炎症疾病;可通过如 US5,387,589 中的适当方法和材料用于治疗眼炎;可通过如 US5,286,731 和 5,286,730 中的适当方法和材料用于治疗免疫炎性肠病和其它免疫炎性疾病。

本发明的雷帕类似物还可作为单一的活性成分用于治疗或抑制血管疾病(尤其包括,冠状动脉疾病、脑血管疾病、动脉硬化、动脉粥样硬化、非粥样动脉硬化、由细胞事件导致的免疫介导的血管损伤导致的血管壁损伤、

中风和多梗塞性痴呆)从而有益于心血管、脑或周边血管,还可与其它有益于心血管、脑或周边血管的试剂合用。此类试剂包括 ACE 抑制剂,如喹那普利、培哌普利、雷米普利、群多普利、福辛普利、赖诺普利、莫昔普利和依托普利;血管紧张素 II 受体拮抗剂,如坎地沙坦,依贝沙坦,洛沙坦,缬沙坦,和替米沙坦,纤维酸衍生物,如氯贝特,和吉非诺齐, HMG Co-A 还原酶抑制剂,如西立伐他汀,氟伐他汀,阿伐他汀,洛伐他汀,普伐他汀,新伐他汀,  $\beta$ -肾上腺素能阻滞剂,如索他洛尔,噻吗洛尔,艾司洛尔,卡替洛尔,普萘洛尔,倍他洛尔,喷布洛尔,纳多洛尔,醋丁洛尔,阿替洛尔,美托洛尔,和必索洛尔;钙通道阻滞剂,如硝苯地平,维拉帕米,尼卡地平,硫氮卓酮,尼莫地平,氨氯地平,非洛地平,尼索地平,和苜普地尔;抗氧化剂;和抗凝剂如,华法林,肝素,依诺肝素,和达那肝素;和含雌激素的激素代替疗法的有用试剂,如共轭雌激素,炔雌醇,17- $\beta$ -雌二醇,雌二醇,和硫酸雌酮哌嗪。参见如 US5,288,711 和 WO01/97809 中的方法和材料可适用于本发明的雷帕类似物治疗各种疾病,包括过度增殖性或其它血管疾病。

本发明化合物还可用作神经营养剂,特别可用于促进神经元再生和功能恢复以及刺激轴突过度生长并因此治疗多种神经病理状态,包括由躯体损伤导致外周神经和中枢神经系统的损害(如,脊髓损伤和外伤、坐骨神经或面神经损害或损伤),病症(如,糖尿病性神经病),癌症化疗(如,长春花碱和阿霉素),中风相关的脑损害和中风相关的局部缺血,和神经病变包括,但不限于,各种与神经退行性病变相关的外周神经病变和神经障碍包括,但不限于,三叉神经痛、舌咽神经痛、贝尔氏麻痹、重症肌无力、肌营养不良、肌萎缩侧索硬化、进行性肌萎缩、进行性球遗传性肌萎缩、疝气、破裂或脱垂的椎盘综合征、颈椎关节强硬、网状组织病变、胸廓出口毁坏综合征、如那些由铅、丙烯酰胺、 $\gamma$ -二酮(glue-sniffer's 神经病变)、二硫化碳、氨苯砷引起的周围神经病;壁虱、卟啉症、Gullain-Barre 综合征、痴呆、阿尔茨海默症、帕金森症和亨廷顿舞蹈病。

##### 5. 用于预防再狭窄; 与支架或其它装置合用

本发明雷帕类似物可单独使用或与霉酚酸合用,如适用 US5665728 中公开的方法和材料,用于治疗或减轻哺乳动物内膜平滑肌细胞增生、再狭窄和血管闭塞的危险或严重程度,尤其是在生物学上或机械介导的血管损伤后,



或在预处理哺乳动物中引起的这样的血管损伤。生物介导的血管损伤可归因于以下因素：传染病包括内毒素和疱疹病毒如巨细胞病毒；代谢性病征如动脉粥样硬化；和由低温和辐射引起的血管损伤。机械介导的血管损伤尤其包括由导管插入术或血管刮除术如经皮腔内冠状动脉成形术；血管外科手术；移植外科手术；激光治疗；以及其它破裂血管内膜或内皮完整性的侵入方法引起的血管损伤。因此，本发明雷帕类似物可单独或与霉酚酸合用以预防因侵入方法破裂血管内皮层后的再狭窄，这样的侵入方法如经皮腔内冠状动脉成形术，血管导管插入术，血管刮除术，血管外科手术或激光治疗方法。

本发明雷帕类似物一种特别有意的应用是用于治疗或减少如发生在经血管成形步骤后的部分患者中的再狭窄的几率。用于这样的方法时，本发明化合物可在血管成形步骤之前、之中或之后给予，可与前述任一药物合用。本发明雷帕类似物最有意义的应用是置于支架上或中(或其它插入的或植入的装置)以减少引入装置后再狭窄的几率。本发明雷帕类似物可适用 US 5,516,781; 6,153,252; 5,665,728; 5,646,160; 5,563,146; 和 5,516,781 以及国际专利申请 WO 01/01957、01/49338、01/87263、01/87342、01/87372、01/87373、01/87374、01/87375 和 01/87376 和此处或别处指出的其它关于支架和其它含药装置的专利文献中公开的使用同样的装置释放其它药物，尤其是雷帕霉素所用的方法和材料。本发明雷帕类似物可通过涂层或其它将药物负载其上的方法和材料广泛地用于多种样式的支架。负载本发明雷帕类似物于医学装置，负载本发明雷帕类似物的医学装置和负载这样雷帕类似物的这样装置的插入件均包含于本发明。

一般说来，本发明含雷帕类似物的装置包含可植入体腔内的能扩张的结构和此结构之上或之中的释放本发明化合物的装置，在一些情况下以预定速率释放。化合物的释放速率可在  $5\mu\text{g}/\text{天}$  至  $200\mu\text{g}/\text{天}$  范围内，优选在  $10\mu\text{g}/\text{天}$  至  $60\mu\text{g}/\text{天}$  范围内。一些情况中，所释放的化合物总量在  $100\mu\text{g}$  至  $10\text{mg}$  范围内，优选在  $300\mu\text{g}$  至  $2\text{mg}$  范围内，更优选在  $500\mu\text{g}$  至  $1.5\text{mg}$  范围内。

能扩张的结构可以是支架的形式，其可维持腔的开放，或可以是移植物的形式，其可保护或增加腔壁的力度。能扩张的结构可以是径向扩张和/或自扩张且优选适宜于替换体腔。植入位点可以是患者脉管系统中的任何血管，包括静脉，动脉，主动脉，特别包括冠状动脉和周围动脉，以及先前植入的移植物，动静脉瘘管，瘘等等，或其它体腔，如胆管，或其它器官，如器官，

神经，腺体，导管等。用于本发明的例示性支架是商业可得的 Duraflex Coronary Stent (Avantec)。

“可径向扩张”是指植入所需的靶点后，装置或其片断可由小直径构型转化为径向扩张的构型，通常是圆柱形。装置可具有最低限度的弹性，如有延展性的，因此需要应用内力使其扩张并置于靶点。典型地，扩张力可由气囊提供，如用于血管操作的血管成形导管的气囊。此装置可在连续的单位片断提供 S 形连接，这对于增加支架的柔性和卷曲性特别有用。

或者，此装置可自扩张。这样的自扩张的结构通过使用有弹性的材料获得，如由回火的不锈钢或超弹性合金如 Nitinol™ 合金形成体段，这样就具有了所需的不受拘束时，如自鞘的径向拘束力中释放出来时，径向扩张的直径。为了保持在体腔的固定，装置应被体腔部分地限制。自扩张装置可以其径向受限的构型被纤拉递送，如，在将装置置于递送鞘或管中并在靶点除去此鞘。

装置的尺寸取决于其使用目的。典型地，应用于血管时装置的长度在 5 mm 至 100 mm 范围内，通常在 8 mm 至 50 mm 范围内。应用于血管时圆柱装置的小(径向压缩的)直径通常在 0.5 mm 至 10 mm 范围内，更通常在 0.8 mm 至 8 mm 范围内。应用于血管时扩张的直径通常在 1.0 mm 至 100 mm 范围内，优选在 2.0 mm 至 30 mm 范围内。装置的厚度在 0.025 mm 至 2.0 mm 范围内，优选在 0.05 mm 至 0.5 mm 范围内。

装置片断可由用于体腔支架或移植物的常规材料构成，典型地由可延展性金属如 300 系列不锈钢构成，或由有弹性的金属如超弹性和形状记忆合金如 Nitinol™ 合金、弹簧不锈钢等构成。体段可由这些金属的组合物或这些类型的金属与其它非金属材料的组合物构成。本发明体段或单位片断的其它结构在 US5,195,417; 5,102,417 和 4,776,337 中进行了说明，在此公开引用作为参考。US6,471,980 中公开了支架及药物的缓释或逐期释放，包括以预定速率释放的例子，在此全部公开作为参考。

在说明性的具体方案中，释放化合物的装置中含有至少构成部分结构的基质。基质可由可降解的，部分可降解的，不降解的，合成的，或天然的材料组成。化合物可置于基质内或与基质毗邻的方式以提供所需的释放速率。可替换地，化合物可置于与基质毗邻的可扩张结构之上或之内以提供所需的释放速率。适宜的生物降解或生物腐蚀的基质材料包括聚酐、聚原酯、聚己酸内酯、聚乙烯乙酸酯、聚羟基丁酸-聚羟基戊酸酯、聚羟基乙酸、聚乳酸

聚羟基乙酸共聚物和其它脂肪族聚酯,广泛的聚合基片可用于此目的。通常优选的生物降解基质材料是聚-L-乳酸和聚-ε-己内酰胺共聚物。适宜的不降解基质材料包括聚氨基甲酸乙酯、聚乙烯亚胺、乙酸丁酸纤维素、乙烯乙烯醇共聚物,等等。

聚合物基质可大量降解(即,基质完全降解)或表面降解(即,基质表面随时间降解但保持主体的完整)。有时优选趋向于以预定速率释放化合物的疏水性基质。可替换地,非降解性基质可用于经扩散释放化合物。

一些情况下,基质中可含有多个基质材料相同或不同的相连层,其中至少一层包含化合物且另一层包含化合物,至少一种不同于其化合物的物质或不合其它物质。例如,置于最外可降解基质层内的化合物随着最外基质层的降解而释放,而置于不降解基质层内的另一种物质主要通过扩散而释放。一些情况下,多种物质可置于同一基质层内。任选加入本发明化合物的物质例如可选自 US 6,471,980 中列出的物质。

此外,限速屏障可与结构和/或基质相连。这样的限速屏障可以是不腐蚀的或不降解的,如硅酮、聚四氟乙烯(PTFE)、聚对二甲苯和 PARYLAST™,可控制经限速屏障释放化合物的流速。这种情况下,化合物可经扩散通过限速屏障而释放。而且,可在基质或限速屏障外形成生物相容性或血液相容性层,如聚乙二醇(PEG),以增加释放假体生物相容性。

在另一个具体方案中,释放化合物的装置可含有至少在部分结构上形成的限速屏障。化合物可置于屏障内或与屏障毗邻。限速屏障可具有足够的厚度以提供所需的释放化合物的速率。典型的限速屏障的总厚度在 0.01 微米至 100 微米范围内,优选在 0.1 微米至 10 微米范围内,以提供所需的释放速率。典型的限速屏障是是不腐蚀的或不降解的,如硅酮、PTFE、PARYLAST™、聚氨基甲酸乙酯、聚对二甲苯,或其结合,化合物通过这样的限速屏障释放通常是经扩散实现的。一些情况下,限速屏障可含有多个屏障材料相同或不同的相连层,其中至少一层包含化合物且另一层包含化合物,至少一种不同于其化合物的物质或不合其它物质。同一屏障层中还可包含多种物质。

另一个具体方案中,释放物质的装置包含在结构之上或之内的药物储存器以及此储存器上的封盖。封盖可在预定的时间内降解或部分降解从而提供所需的化合物释放速率。封盖可包含如上述的聚合物基质,其包含储存器内的化合物。限速屏障,如硅酮,任选地与储存器和/或封盖毗邻,从而允许化

合物通过限速屏障扩散释放。或者，封盖可以是不降解的基质或限速屏障。

此发明的另一个装置包含可扩张的结构，其上具有限速屏障并可植入体腔以预定速率释放化合物，如，以选定的抑制平滑肌细胞增生的速率。屏障包含多层，其中各层包含 PARYLAST™或聚对二甲苯且厚度在 50 nm - 10 微米范围内。至少一层包含化合物，另一层包含化合物，至少一种不同于其化合物的物质，或不含其它物质。

另一种这样的装置是人工血管，其包含可扩张结构，此结构之上或之内的化合物源，以及任选的此结构之上或之内的加入化合物中的至少一种其它物质源。当可扩张结构植入血管时，化合物自化合物源中释放。可扩张结构植入血管时，任选的添加物质也自其源中释放。各源可包含基质，限速膜，储存器，或此处描述的其它控速装置。这样任选添加物质的例子包括免疫抑制物质(如，霉酚酸或其类似物)，抗血小板剂，抗血栓剂，或 US 6,471,980 中公开的 IIb/IIIa 试剂。

本发明因此提供抑制血管再穿透后再狭窄的方法。例如，一种包括在体腔内如冠状或周围血管内植入含有本发明化合物的人工血管以抑制血管再闭合的方法。化合物随后释放，在一些情况下以选定的速率抑制平滑肌细胞增殖。化合物可在支架引入或膨胀时立即释放，或可能延迟。因此，在一些情况下，化合物可在植入人工血管至少一小时后实质释放。可使用在血管环境内超过一小时后才至少部分降解的材料以实现自储存器内的延迟释放。一些情况下，可使用不降解材料或限速屏障延缓释放，其使化合物在一小时后扩散透出。化合物的释放速率典型的在 5 $\mu$ g/天至 200 $\mu$ g/天范围内，优选在 10 $\mu$ g/天至 60 $\mu$ g/天范围内。典型地，化合物在血管环境中 1 天至 45 天内释放，优选在血管环境中 7 天至 21 天内释放。

装置可使用基质或屏障经喷雾，浸渍，沉积，或涂布进行涂层。这样的涂层可以是不均匀的。例如，可仅对假体的一端涂层，或一端较厚地涂层。同样地，装置还可因涂层，喷雾，浸渍，沉积，化学键连或涂布在装置表面或部分表面掺入化合物。

一些情况下，装置还含有至少一种除化合物外的其它物质，化合物可在 1 天至 45 天内释放，其它一种或多种物质可在 2 天至 3 个月内释放。因此，化合物和其它物质的释放可以是同时的也可以是相继的。

释放化合物的总量部分取决于血管损伤的水平 and 数量。在一些具体方案

中，释放速率在 100 $\mu\text{g}$  至 10 mg 范围内，优选在 300 $\mu\text{g}$  至 2 mg 范围内，更优选在 500 $\mu\text{g}$  至 1.5 mg 范围内。通常优选的起始期的释放速率为自 0 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 50 $\mu\text{g}/\text{天}$ ，通常自 5 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 30 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。后期化合物的释放速率会更高，典型地在 5 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 200 $\mu\text{g}/\text{天}$  范围内，通常自 10 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 100 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。因此，起始期释放速率典型地是后期释放速率的 0% 至 99%，通常是 0% 至 90%，优选自 0% 至 75%。起始期哺乳动物组织中化合物的浓度典型地在自 0 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织至 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织范围内，优选自 0 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织至 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织。后期哺乳动物组织中此物质的浓度典型地在自 1 皮克/mg 组织至 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织范围内，优选自 1 纳克/mg 组织至 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织。

起始期，后期，以及任何其它期的长度不同。典型地，起始期将足够长以允许至少部分支架初步成细胞化或成内皮细胞化，通常少于 12 周，更通常自 1 小时至 8 周，更优选自 12 小时至 2 周，最优选自 1 天至 1 周。后期的时间也是可变的，典型地自 4 小时至 24 周，更通常自 1 天至 12 周，更优选在血管环境中的时间在 2 天至 8 周内，最优选在血管环境中的时间在 3 天至 50 天内。

一些情况下，预定时间内的化合物释放曲线可容许在起始期具有较高的释放速率，典型地自 40 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 300 $\mu\text{g}/\text{天}$ ，通常自 40 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 200 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。这些情况下，化合物在后期的释放将会大幅降低，典型地在 1 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 100 $\mu\text{g}/\text{天}$  范围内，通常自 10 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 40 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。较高释放率的起始期的时间在 1 天至 7 天范围内，较低释放率的后期的时间在 2 天至 45 天范围内。起始期的 1-7 天哺乳动物组织中物质的浓度典型地在 10 纳克/mg 组织至 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织范围内。后期的 2-45 天哺乳动物组织中物质的浓度典型地在 0.1 纳克/mg 组织至 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织范围内。其它情况下，化合物的释放在 1 至 45 天内可稳定在 5 $\mu\text{g}/\text{天}$  至 200 $\mu\text{g}/\text{天}$ 。在此 1-45 天期间，哺乳动物组织浓度典型地在 1 纳克/mg 组织至 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$  组织范围内。

一个具体方案中，释放化合物的装置包含基质或至少在部分装置上形成的涂层，其中基质由可降解材料组成。化合物可置于基质中以提供所需的释放速率。可替换地，化合物可置于基质下的装置之内或之上以提供所需的释放速度。

装置用作释放基质的机械支持是有利的，这样允许广泛的材料用作释放基质。适宜的生物降解或生物腐蚀材料包括聚酐、聚原酸酯、聚己酸内酯、

聚乙烯乙酸酯、聚羟基丁酸-聚羟基戊酸酯、聚羟基乙酸、聚乳酸/聚羟基乙酸共聚物，和其它脂肪族聚酯，广泛的合成的或天然的聚合物质可用于此目的。

一个在本发明实践中有用的生物降解材料的例子是聚-L-乳酸(平均分子量约 200,000 道尔顿)和聚-ε-己内酰胺(平均分子量约 30,000 道尔顿)共聚物。聚-ε-己内酰胺(PCL)是半晶性聚合物，熔点范围为自 59°C 至 64°C，降解时间约为 2 年。因此，聚-L-乳酸(PLLA)可与 PCL 组合形成可产生所需释放速率的基质。优选的 PLLA 与 PCL 的比率是 75: 25 (PLLA/PCL)。如 Rajasubramanian 等在 *ASAIO Journal*, 40, pp. M584-589 (1994)中的一般性描述，在此引入作为参考，75: 25 的 PLLA/PCL 共聚物混合物显示了足够的强度和伸展性，可较容易地在架子上涂层 PLLA/PCL 基质。此外，75: 25 的 PLLA/PCL 共聚物基质允许在预定的时间内控制药物释放，这是由于较低的 PCL 含量使得共聚物化合物疏水性降低，然而较高的 PLLA 含量导致大空隙率的降低。

聚合物基质可大量降解，即基质完全降解，或优选表面降解，即只有基质表面随时间降解但保持主体的完整。可替换地，基质可由不降解性基质组成，其经扩散释放化合物。适宜的不降解基质材料包括聚氨基甲酸乙酯、聚乙烯亚胺、乙酸丁酸纤维素、乙烯乙二醇共聚物等等。

基质可包含多层，各层包含化合物、不同物质，或不含任何物质。最外层可不包含任何物质，而底层包含化合物。随着最外层降解，化合物释放速率增加。此外，本发明可在装置与基质之间应用限速屏障，或任选地在基质外形成限速屏障。这样的限速屏障可以是不腐蚀的并能控制化合物扩散穿过屏障的释放流动速率。适宜的限速屏障包括如硅酮，PTFE，PARYLAST™，等等。此外，可在基质外形成如聚乙二醇(PEG)等层以增加释放装置的生物相容性。

另一个具体方案中，释放化合物的装置包含在装置之上或之内的药物储存器以及此储存器上的封盖。封盖可在预定的时间内降解从而化合物开始自储存器中实质性释放。此例中的封盖可包含如上述的聚合物基质，其包含储存器内的化合物，储存器中这样基质被化合物填满。此外，还可在储存器和封盖之间或封盖顶上形成限速屏障，从而允许化合物经扩散限速屏障而释放。

操作中，释放化合物的方法包含提供混合或含有化合物的人工腔。此人工腔使用在血管环境中降解的基质涂层。此人工腔植入体腔，至少部分基质在预定时间内降解后化合物开始实质性释放。任选地，此人工腔涂有足够厚的限速屏障或不降解的基质以允许化合物扩散穿过屏障或不降解的基质。此人工腔植入体腔，化合物开始自屏障或不降解的基质实质性释放，优选在预定的时间后释放。由于在几周至几个月内通常出现再狭窄的增殖效应，一些具体方案中化合物在血管环境 4 小时至 24 周内开始实质性释放，优选在血管环境 1 天至 12 周的时间内，更优选在血管环境 2 天至 8 周的时间内，最优选在血管环境 3 天至 50 天的时间内。

化合物可混合在储存器中或装置上。在这种构型中，储存器被基质包裹，以至于化合物在基质充分降解暴露出储存器后开始实质性释放。可替换地，化合物可置于包裹装置的基质中。在这种构型中，外部的基质层基本上不含化合物，以至于直至外层降解后化合物才实质性开始释放。任选地，化合物可置于被基质包裹的部分装置之内或之上。

人工腔可通过涂布，喷雾，浸渍，沉积，或涂画将化合物掺合其上。通常，化合物溶于溶剂形成溶液。适宜的溶剂包括水溶剂(如，pH 缓冲液，pH 校正液，有机盐溶液，和无机盐溶液)，醇(包括，甲醇，乙醇，丙醇，异丙醇，己醇，和乙二醇)，腈(如，乙腈，苄腈，和丁腈)，酰胺(如，甲酰胺和 N 二甲基甲酰胺)，酮，酯，醚，DMSO，气体(如，二氧化碳)，等等。例如人工腔可使用溶液喷雾或浸渍于溶液中并干燥从而在人工腔表面留下化合物结晶。可替换地，经喷雾，浸渍，沉积，或涂画聚合物溶液使基质溶液包裹人工腔。通常，人工腔绕轴旋转时向其喷聚合物细雾。包裹基质的厚度可由喷雾时间和绕轴旋转的速度控制。包裹基质的厚度典型地在 0.01 微米至 100 微米范围内，优选在 0.1 微米至 10 微米范围内。化合物/基质包裹人工腔后，将支架置于真空或烘箱中挥干溶剂。

例如，尺寸为 3.0 mm×14 mm 的不锈钢 Duraflex<sup>TM</sup> 支架，使用 25 mg/ml 化合物的 100%乙醇、甲醇、丙酮、乙酸乙酯、二氯甲烷或其它溶剂的溶液喷雾。支架干燥溶剂挥发后，化合物留在支架表面。75: 25 的 PLLA/PCL 共聚物(Polysciences 商业销售)在 1,4 氧杂环己烷(Aldrich Chemicals 商业销售)中制备。负载化合物的支架置于旋转速率为 200 rpm 的旋转轴上，当其旋转时，使用喷枪以细雾形式向负载化合物的支架喷洒 10-30 秒共聚物溶液。然

后，将支架置于 25-35℃烘箱中不超过 24 小时以挥发溶剂。

可替换地，另一个具体方案中，可通过 Sousa 等在 *Circulation*, 2001; 103: 192; Sousa 等在 *Circulation*, 2001; 104: 2007; 以及 Morice 等在 *N Engl J Med* 2002; 346(23): 1773-1780 中类似的方法，但使用雷帕类似物替换 Sirolimus，制备和使用含本发明雷帕类似物的支架。因此，先天冠状动脉疾病的患者可植入洗脱雷帕类似物的 Bx VELOCITY 支架进行治疗。

在此具体方案中，雷帕类似物与不降解聚合物的混合物混合(参见如，Kindt-Larsen 等, *J Appl Biomater.* 1995; 6: 75-83; Revell 等, *Biomaterials.* 1998; 19: 1579-1586)，且 5- $\mu\text{m}$ -厚的雷帕类似物-聚合物基质应用于 Bx VELOCITY(考迪斯)支架的表面，激光剪切的 316L 不锈钢可扩张气囊支架。其被引作快速释放[FR]配制。

FR 配制中的药物将在植入 15 天内几乎完全洗脱。

为了实现缓慢释放[SR]配制，在药物-聚合物基质外应用另一层不含药物的聚合物以引入扩散屏障，将药物的释放延长至>28 天。在约 30 天内约 80% 的雷帕类似物自 SR 配制中释放。

在此具体方案中，不考虑包裹组合物，支架的每单位表面积负载固定量的药物(140  $\mu\text{g}$  药物/ $\text{cm}^2$ )。

基于 Sirolimus 实验，全部血液中药物水平的峰值出现在植入后 1 小时(~2 - 3 ng/mL, FR; ~1 ng/mL, SR)，在约 72 小时降至量化下限以下。考虑到肾移植患者维持慢性的雷帕霉素水平在 8 至 17 ng/mL 之间，植入此类排出雷帕类似物的支架后血液水平的峰值应是可忽略的。

在气囊预扩张为高压气囊(>12 大气压)后，按照标准的操作植入含雷帕类似物的 Bx VELOCITY 支架。此具体方案中的支架的长度为 18 mm，直径为 3 至 3.5 mm。可使用肝素以保持活化血块的时间>300 秒。患者还可在此植入支架过程至少 12 小时前服用阿司匹林(325 mg/d，非限定地)，以及在植入后立即服用含药量为 300 mg 的氯吡格雷，75 mg/d 持续 60 天。

另一个具体方案中，释放化合物的装置可包含支架之上或之内的储存器，其中含有化合物和外能源，此外能源在植入的人工腔处提供能量影响化合物的释放。可在包含化合物的储存器外形成基质层。可替换地，释放化合物的装置可包含至少在部分支架外的基质层，其中化合物置于基质层下或基质层内，还包含在植入的人工腔处提供能量影响化合物的释放的外能源。适



宜的外能源包括超声、磁共振成像、磁场、无线电频率、温度变化、电磁、x-射线、辐射、热、 $\gamma$ -射线(gamma)和微波。

例如，超声外能源的频率在 20 kHz 至 100 MHz 范围内，优选在 0.1 MHz 至 20 MHz 范围内，强度水平在  $0.05 \text{ W/cm}^2$  至  $10 \text{ W/cm}^2$  范围内，优选在  $0.5 \text{ W/cm}^2$  至  $5 \text{ W/cm}^2$  范围内。超声能应被控制在距人工腔 1 mm 至 30 cm 的范围内，优选在 1 cm 至 20 cm 范围内。超声可持续或脉冲应用，应用时间在 5 秒至 30 分钟范围内，优选在 1 分钟至 15 分钟范围内。递送人工腔时的温度在  $37^\circ\text{C}$  至  $48^\circ\text{C}$  范围内。超声可用于提高人工腔的多孔性，因此允许化合物自人工腔释放。

在一个具体方案中，释放化合物的装置包含偶联化合物的磁性微粒和在植入的人工腔处提供磁场影响化合物的释放的磁性源。任选地，释放化合物的装置可包含与在装置外形成的基质层偶联的磁性微粒和在植入的人工腔处提供磁场影响化合物的释放的磁性源。化合物置于基质层下或基质层内。磁性微粒可由磁珠形成，微粒大小典型地在 1 nm 至 100 nm 范围内。磁源使人工腔暴露在磁场中，磁场强度典型地在 0.01 T 至 2 T 范围内，磁场可激活磁性微粒，并因此影响化合物自人工腔的释放。

此发明因此包括释放一种所述化合物于动脉的方法。此方法为将人工腔植入动脉且人工腔释放化合物。此方法包括植入依照程序开始释放化合物的人工腔，优选至少在部分人工腔上生长了一层细胞后才开始实质释放化合物。典型地，细胞包含炎症，平滑肌，或内皮细胞，表明再狭窄的开始。

还提供了一种在体腔中定位人工腔输送管以释放其中化合物的方法。一方法中，典型地使用气囊膨胀导管将人工腔输送到血管的狭窄区域。最初被运载于气囊抽气的气囊导管上的人工腔为其径向塌陷的构型。在荧光显微镜的引导下，典型地使用导线引入气囊导管。导管和导线可经常规入口引入脉管系统，如通过股动脉，或臂动脉，锁骨下动脉或桡动脉，进入冠状动脉。将人工腔输送管正确地安置于狭窄区域后，给气囊充气使狭窄区域内的人工腔径向膨胀。然后可给气囊放气，抽出导线上的导管。除去导线后，膨胀的人工腔留在原处以释放提供上述抑制再狭窄作用的化合物。

通常，可以结合上述不同的人工腔和治疗方法的要素。例如，具有释放化合物的储存器装置的人工腔还可具有限速屏障。此外，本发明的方法可以将当前描述的释放化合物的人工腔的治疗方法与解决狭窄位点的气囊血管

成型术和/或其它介入治疗方法相结合。

### 制剂、药物组合物、剂量和用法

本发明的雷帕类似物可以游离形式或，合适的话，以盐形式存在。本领域熟练人员已知许多化合物类型的药学上可接受的盐及其制备方法。药学上可接受的盐包括常规的无毒性的盐，包括这样的化合物碱与无机或有机酸形成的季铵盐。

本发明的化合物可形成水合物或溶剂合物。本领域熟练人员已知将化合物与水一起冻干时形成水合物或在溶液中与合适的有机溶剂浓缩时形成溶剂合物的方法。

本发明包含含有治疗量本发明化合物的药物，和一种或多种药学上可接受载体和/或赋形剂的药物组合物。载体包括如盐水，缓冲盐水，葡萄糖，水，甘油，乙醇，和它们的结合，下文更详细地论述。如果需要，该组合物还可以包含较小量的润湿剂或乳化剂，或 pH 缓冲剂。该组合物可以是液体溶液，悬浮液，乳剂，片剂，丸剂，胶囊，持续释放制剂，或粉末。该组合物可以用传统的粘合剂和载体如三酸甘油酯配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载体如药物品级的甘露糖醇，乳糖，淀粉，硬脂酸镁，糖精钠，纤维素，和碳酸镁，等等。视需要制剂而定，配制可以涉及混合，制粒和压缩或溶解成分。在另一个途径中，该组合物可以配制成纳米颗粒。

使用的药物载体可以为，例如，固体或者液体。

典型的固体载体包括乳糖、石膏粉、蔗糖、滑石、凝胶、琼脂、果胶、阿拉伯胶、硬脂酸镁、硬脂酸等等。固体载体可以包括一种或多种可能同时作为增香剂，润滑剂，增溶剂，悬浮剂，填料，助流剂，压缩助剂，粘合剂或片剂-崩解剂的物质；它还可以是包封材料。在粉末中，载体为精细粉碎的固体，它与精细粉碎的活性成分的混合。在片剂中，活性成分与具有必要的压缩性质的载体以合适的比例混合，以需要的形状和大小压缩。粉末和片剂优选包含至多 99% 活性成分。合适的固体载体包括，例如，磷酸钙、硬脂酸镁、滑石、糖、乳糖、糊精、淀粉、凝胶纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠盐、聚乙烯吡咯烷酮、低熔点蜡和离子交换树脂。

典型的液体载体包括糖浆，花生油，橄榄油，水，等等。液体载体用于制备溶液，悬浮液，乳剂，糖浆，酞剂和加压组合物。活性成分可以溶解或

悬浮于药学上可接受的液体载体如水, 有机溶剂, 二者的混合物或药学上可接受的油类或脂肪。液体载体可以包含其它合适的药物添加剂如增溶剂, 乳化剂, 缓冲剂, 防腐剂, 增甜剂, 增香剂, 悬浮剂, 增稠剂, 颜料, 粘度调节剂, 稳定剂或渗透压-调节剂。用于口服和肠胃外给药的液体载体的合适的例子包括水(部分地包含如同上述的添加剂, 例如纤维素衍生物, 优选羧甲基纤维素钠盐溶液), 醇(包括一元醇和多元醇, 例如乙二醇)和它们的衍生物, 和油类(例如分馏椰子油和花生油)。用于肠胃外给药的载体还可以为油酯如油酸乙酯和肉豆蔻酸异丙酯。无菌的液体载体用于肠胃外给药的无菌的液态组合物。用于加压组合物的液体载体可以为卤代烃或其他药学上可接受的抛射剂。无菌溶液或悬浮液液体药物组合物可以用来, 例如, 静脉内, 肌内, 腹膜内或皮下注射。注射时可单次推入或逐渐输液, 如 30 分钟的静脉内输液。该化合物还可以以液体或者固体组合物的形式口服给药。

体或赋形剂可以包括本领域已知的时间延迟材料, 如单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯, 还可包括蜡, 乙基纤维素, 羟丙基甲基纤维素, 异丁烯酸甲酯等等。当制剂用于口服时, 公认 PHOSALPG-50(磷脂与 1,2-丙二醇浓缩, A. Nattermann & Cie. GmbH)中的 0.01%吐温 80 用于用于其他化合物的可接受的口服制剂的配制, 可以适应于本发明各种化合物的配制。

给予本发明化合物时可以使用各式各样的药剂形式。如果使用固体载体, 制剂可为片剂, 被放入硬胶囊中的粉末或小药丸形式或锭剂或糖锭形式。固体载体的量在很大程度上变化, 但是优选从约 25mg 到约 1g。如果使用液体载体, 制剂可为糖浆, 乳剂, 软胶胶囊, 在安瓿或小瓶或非水的液体悬浮液中的无菌注射溶液或悬浮液。

为了获得稳定的水溶性的剂型, 可以将化合物或其药学上可接受的盐溶于有机或无机酸的水溶液, 0.3M 琥珀酸或柠檬酸溶液。选择性地, 酸性的衍生物可以溶于合适的碱性溶液。如果得不到可溶形式, 可将化合物溶于合适的共溶剂或它们的结合。这样的合适的共溶剂的例子包括, 但是不局限于, 浓度范围从 0-60%总体积的, 乙醇, 丙二醇, 聚乙二醇 300, 聚山梨酸酯 80, 甘油, 聚氧乙烯脂肪酸酯, 脂肪醇或甘油羟脂肪酸酯等等。

各种释放系统是已知的并且可用于化合物或其各种制剂的给药, 这些制剂包括包括片剂, 胶囊, 可注射的溶液, 脂质体中的胶囊, 微粒, 微胶囊, 等等。给药的方法包括但是不局限于皮肤的, 皮内, 肌内, 腹膜内的, 静脉

内的，皮下的，鼻腔内的、肺的，硬膜外的，眼睛的和(通常优选的)口服途径。化合物可以通过任何方便的或者其它适当的途径给药，例如通过注入或快速浓注，通过上皮的或粘膜途径(例如，口腔粘膜，直肠和肠粘膜，等等)吸收或通过负载药物的支架以及可以与其他生物活性剂一起给药。可以全身或局部给药。用于鼻、支气管或肺疾病的治疗或预防时，优选的给药途径为口服、鼻给药或支气管烟雾剂或喷雾器。

在某些具体方案中，化合物对需要治疗的区域局部给药也许合乎需要：实现这样的给药可以通过，例如，而不是作为限制，外科手术局部注入，局部施用，通过注射，通过导管，通过栓剂，或依靠蒙皮补片或支架或植入物，上述的植入物为多孔的，无孔的，或凝胶状的材料，包括膜，sialashc 膜，或纤维。

在具体的实施方案中，组合物根据常用方法制剂，用作向人静脉内的给药的药物组合物。典型地，用于静脉内的给药的组合物为无菌等渗的含水缓冲溶液。在必要时，组合物也可能包括增溶剂和在注射位点镇痛的局部麻醉剂。一般地，成分被分别或混合地提供于单位剂型，例如，冷冻干燥粉末或无水的浓缩物在密闭容器如显示活性剂的数量的小瓶或 sachette 中。组合物通过灌注给药时，它可以分装于包含无菌的药物级的水或盐水的输液瓶。组合物通过注射给药上，可以提供灭菌注射水或盐水的安瓿，可以在给药之前混合各成分。

例如，用于注射的本发明雷帕类似物溶液可包含 0.1 至 10mg/ml，如 1-3mg/ml，雷帕类似物的稀释液，该稀释液中含有 Phosal 50 PG(磷脂酰胆碱、丙二醇、单-或二-甘油酯、乙醇、大豆脂肪酸和抗坏血酸棕榈酸酯)和吐温 80，含有 0.5-4%的乙醇，如 1.5-2.5%乙醇。另一个例子中稀释液为丙二醇 USP 和吐温 80 的含量分别是 2-8%，如 5-6%的注射用水。我们已发现在一些情况下各为 5.2%时效果良好。典型地，溶液经常规的方法和材料处理，包括如一次或多次无菌过滤。

包含本发明化合物的口服制剂可含有任一常规使用的口服形式，包括片剂，胶囊，口腔形式，锭剂，糖锭或口服液，悬浮液或溶液。胶囊可包含活性化合物与惰性填充剂和/或稀释剂的混合物，如与药学上可接受的淀粉(如，玉米，土豆或树薯粉淀粉)，糖，人工甜味剂，粉状纤维素，如结晶性或微晶纤维素，面粉，明胶，树胶等的混合物。有用的片剂可经常规的方法压制，

湿法制粒或干法制粒，并利用药理学上可接受的稀释剂，粘合剂，润滑剂，崩解剂，表面修饰剂(如表面活性剂)，悬浮或增溶剂，包括但不限于，硬脂酸镁、硬脂酸、十二烷基硫酸钠、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、黄酸胶、柠檬酸钠、硅酸盐复合物、碳酸钙、氨基乙酸、糊精、蔗糖、山梨醇、磷酸氢钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露醇、氯化钠、滑石粉、干淀粉和糖粉。适宜的表面修饰剂包括非离子性和离子性的表面修饰剂。表面修饰剂的典型例子包括，但不限于，泊洛沙姆 188、氯苄烷铵、硬脂酸钙、硬脂酸铈醇(cetostearyl alcohol)、cetomacrogol 乳化蜡、脱水山梨醇酯、胶体二氧化硅、磷酸酯、十二烷基硫酸钠、硅酸镁铝、和三乙胺。此处的口服制剂可利用标准的缓释或即时释放制剂改变活性化合物的吸收。口服制剂还可由给予的水或果汁中的活性成分组成，需要时可包含适当的增溶剂或乳化剂。US5,559,121; 5,536,729; 5,989,591; 5,985,325; 5,145,684(纳米微粒); 6,197,781; 和 WO 98/56358 中公开了适用于本发明雷帕类似物的口服制剂，所有文献在此引用作为参考。包含本发明雷帕类似物的片剂可包含常规的非活性成分包括如蔗糖，乳糖，聚乙二醇 8000，硫酸钙，微晶纤维素，药物级珐琅质，滑石粉，二氧化钛，硬脂酸镁，povidone，泊洛沙姆 188，聚乙二醇 20,000，甘油单油酸酯，巴西棕榈蜡，和其它成分。口服给药时还可使用纳米级大小的组合物。这样的情况下，纳米微粒形成于包含(基于重量/重量)1-20%雷帕类似物，70-95%惰性物质如蔗糖，0.1 至 4%的如聚乙烯吡咯烷酮和氯苄烷铵等物质和 0-1%表面活性剂如吐温。一个说明性的这样的组合物包含约 15%雷帕类似物、81%蔗糖、2%聚乙烯吡咯烷酮、2%氯苄烷铵和 0.1%吐温。

一些情况下可能需要将化合物以气雾剂的形式直接对气道给药。

将有效量的化合物向个体给药还可以通过将化合物直接向个体皮肤的受影响的区域局部地给药而实现。为了这个目的，化合物给药或应用的组合物包括药理学可接受的局部给药载体，如凝胶，油膏，洗液，奶油，其中包括，无限制的，这样的载体如水，甘油，醇，丙二醇，脂肪醇，甘油三酯，脂肪酸酯，或矿物油。其他局部给药的载体包括液体石油产品，棕榈酸异丙基酯，聚乙二醇，乙醇(95%)，聚氧化乙烯单月桂酸酯(5%)的水溶液，或十二烷基硫酸钠(5%)水溶液。其他原料如抗氧化剂，湿润剂，粘度稳定剂，和相似的药剂可以根据需要添加。也可能包括经皮渗透增强剂如氮酮(Azone)。

此外,某些情况下,预计该化合物可以安排在装置内,放置于皮肤的上面、里面或下面。这样的透皮装置包括补片,植入物,和注射液,通过被动或者主动释放机制,将化合物释放到皮肤内。对于此公开的目的,透皮给药被理解为包括所有的穿过身体表皮或身体通道的内层包括上皮和粘膜组织的给药方式。这样的给药可使用本发明化合物,或其药学上可接受的盐,以洗剂,乳剂,泡沫,补片,悬浮液,溶液,和栓剂(直肠和的或阴道的)的方式给予。

可通过使用包含活性化合物和载体的透皮补片而实现透皮给药,此载体对于活性化合物是惰性的,对于皮肤无毒,并允许试剂经皮肤释放入血液从而全身吸收。载体可采用如乳剂和软膏,贴剂,凝胶,和闭塞装置等的任何形式。乳剂和软膏可任为水包油型或油包水型的粘性液体或半固体乳剂。适宜的贴剂由包含活性成分分散于石油产品或亲水石油产品中吸附性粉末组成。多种闭塞装置可用于将活性成分释放到血液中,如包含活性成分且任选包含载体的包裹半透膜的储藏库,或包含活性成分的基质。文献中已知其它闭塞装置。

栓剂可经常规的材料制备,包括如可可脂,任选地加入蜡以改变栓剂的熔点,和甘油。还可使用水可溶性栓剂基质,如各种分子量的聚乙二醇。

产生各种制剂的原料和方法在本领域是已知的,可以适合于实施本发明。参见例如 US5,182,293 和 4,837,311 (片剂、胶囊及其他口服的制剂以及静脉内的制剂)和 EP0649 659(1995年4月26日出版;IV给药的说明性制剂)和 0 648 494(1995年4月19日出版;口服给药的说明性制剂)。还可参见 US5,145,684 (纳米微粒)和 5,989,591 (固体剂型)和 WO 98/56358 以及 Yu, K. 等, *Endocrine-Related Cancer* (2001) 8, 249-258 和 Georger 等, *Cancer Res.* (2001) 61 1527-153。

化合物的有效剂量典型地在约 0.01 至约 100 mg/kgs, 优选约 0.1 至约 10mg/kgs 哺乳动物体重的范围之内,以单或多剂量给药。一般地,对需要这样的治疗的病人的给药的日剂量范围为每位患者约 1 到约 2000mg。每天,每周(或在其它多天间隔中)或间歇方案中可给药一次或多次。例如,在几周时间内,如 4-10 周,每周的基本日中(如各周一)每天可给药一次或多次。或者,在不给药一段时间后(如 1-30 天)给药一段时间(如 2-10 天),重复这一循环若干次,如 4-10 次。例如,本发明的抗癌化合物可每天给药,持续 5 天,

停药 9 天后，再重复另一个 5 天给药 9 天停药周期，周而复始，重复 4-10 次。

有效治疗或预防具体的紊乱或症状的化合物的量部分地取决于影响影响药物剂量的已知因素，在应用工程基因和细胞治疗时，还取决于多聚化剂融合蛋白质的特性，基因工程细胞的特性和位置，以及紊乱或症状的性质，可以通过标准的临床技术测定。另外，可以选择性地使用体外或体内测定帮助确定最佳的剂量范围。有效剂量可以从源自体外或动物模型测试系统的剂量反应曲线推断。主治医师其他卫生保健提供者将决定精确的剂量水平，它取决于众所周知的因素，包括给药途径、个体的年龄、体重、性别和总的健康状况；疾病的性质，严重程度和临床阶段；伴随治疗的使用(与否)；以及患者的基因工程细胞的性质和范围。

用以治疗或已知特定的疾病阶段或紊乱时，给予的本发明雷帕类似物的有效剂量可以不同，这取决于所用的特定化合物、给予的方式、症状和所治疗症状的严重程度，以及与被治疗个体相关的各种身体因素。许多情况下，每天给予雷帕类似物的剂量在约 0.01 mg/kg-100 mg/kg，优选在 0.01-25 mg/kg 之间，更优选在 0.01-5 mg/kg 之间，可获得满意的结果。计划的日剂量预期随着给药途径而变化。这样，胃肠外的剂量水平通常大概为口服剂量水平的 10%至 20%。

当所用的雷帕类似物是组合方案的一部分时，在所需的治疗期内给予合用药各成分的制剂。合用药的成分可同时给予；或作为包含所有成分的单一剂型，或作为独立的制剂单元；合用药的成分还可在治疗期内给予不同的次数，或一种可作为另一种的预处理给予。

本发明也提供具有包含一个或多种本发明药物组合物成分的一个或多个包装物的药物包装或试剂盒。与这样的包装物选择性地关联的可以为政府机构规定的药物或生物制品的制造、使用或销售的公告形式，该公告反映政府机构批；住用于人给药的制造、使用或销售。该布告或包装说明书可能包含与本申请公开的一致本发明的雷帕类似物的使用说明书。

下列实施例包含重要的其他信息、例证和指导，可以实施本发明各种具体方案及其同等物。实施例提供说明，不应该被理解为以任何方式的限制。本发明的许多修饰和变化对本领域技术人员显而易见。这样的修饰和变化，包括雷帕类似物选择、制备、制剂和给药的设计选择；支架样式、材料和方

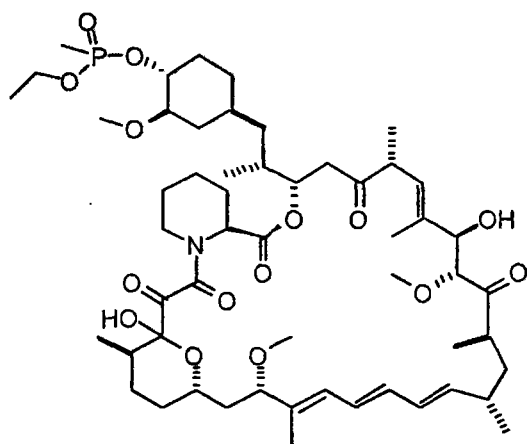
法以及其上负载雷帕类似物和洗脱药物的释放性支架的材料等等包括于本发明的范围和附加的权利要求的范围内。

所有引用的包括参考文献包括本文件引用的参考文献书目、授权的专利、以及公开专利申请，特此作为参考编入。除非另有指明，本发明实施中使用合成有机化学的常规技术，包括产品回收、纯化和配制，以及细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因的生物学、微生物学、重组 DNA 以及免疫学，都在本领域技术人员已知的范围之内。这样的技术完全在专利和科学文献中说明。参见例如，下列生物技术：Molecular Cloning<sup>Ü</sup>A Laboratory<sup>Ü</sup>Manual, 第二版, Sambrook, Fritsch 和 Maniatis 主编 (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, 卷 I 和 II (D. N. Glover ed., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984); Mullis 等 U.S. Patent No: 4,683,195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

## 实施例

### 实施例 1: 甲基磷酸乙酯 C-43 雷帕霉素酯





### 甲基磷酸乙酯酰氯(ethyl methylphosphonochloridate)

向冷却的(0°C)甲基磷酸二乙酯(15.2 g, 0.1 mol)的苯溶液(30 mL)(0°C)中一次性加入  $\text{PCl}_5$  (20.8 g, 0.1 mol)。在 0°C 下搅拌反应混合物 2 小时后, 经高真空除去溶剂和副产物  $\text{POCl}_3$ 。蒸馏得 12.7 g 无色油状产物: Bpt. 52-54 °C / 1 mmHg;  $^{31}\text{P}$ -NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 40.7。

### 甲基磷酸乙酯 C-43 雷帕霉素酯

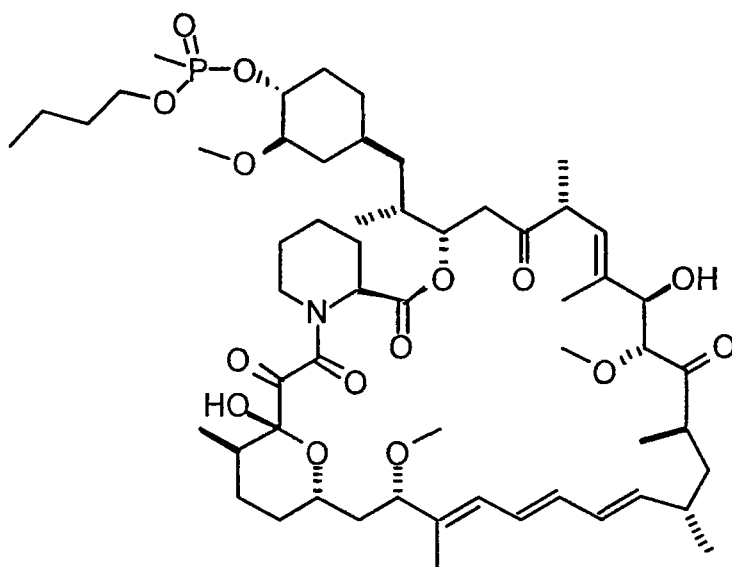
在氮氮中, 向 1.5 mL 冷却的(0°C)雷帕霉素(0.1 g, 0.109 mmol)的二氯甲烷溶液中加入 0.25 mL 的 3,5-二甲基吡啶(0.088 g, 0.82 mmol)的二氯甲烷溶液, 随后立即加入 0.25 mL 甲基磷酸乙酯酰氯(0.078 g, 0.547 mmol)的二氯甲烷溶液。在 0°C 下搅拌无色反应液 3 小时(通过 MS 监测反应; 在分析前, 直接使用 50: 50 的  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ , 1 滴 DMSO 稀释反应样液)。冷的反应液经 ~20 mL 的 EtOAc 稀释后转移至含 EtOAc (150 mL)和饱和的  $\text{NaHCO}_3$  (100 mL)的分离漏斗中, 除去水层后, 有机层相继使用冰冷的 1N HCl (1x100 mL)、饱和  $\text{NaHCO}_3$  (1x100 mL)和盐水(1x100 mL)洗涤, 并经  $\text{MgSO}_4$  干燥, 浓缩。粗产物经硅胶快速层析法(洗脱剂为 0.5: 10: 3: 3 的  $\text{MeOH}/\text{DCM}/\text{EtOAc}/$ 正己烷)纯化得到 0.024 g 白色固体(~2:1 非对映混合物):  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d. 4.19 (m, 1Ha, 1Hb), 4.15-4.01 (m, 3Ha, 3Hb), 1.56-1.27 (m, 6Ha, 6Hb);  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 32.1, 29.9; 1043 m/z ( $\text{M}+\text{Na}$ )。)

### 实施例 1, 另一种合成法

雷帕霉素和二氯甲烷注入氮气保护的反应瓶中。搅拌溶液并冷却至约 0°C(在反应全过程中保持外温  $-5 \pm 5^\circ\text{C}$ )。在约 8-13 分钟内加入甲基磷酸乙酯

酰氯的二氯甲烷溶液。随后立即开始加入 3,5-二甲基吡啶的二氯甲烷溶液，在约 15-20 分钟内加完。两次加料过程中，反应内温保持低于 0°C。搅拌冷却的反应液 3 小时，并通过 TLC(1: 10: 3: 3 的 MeOH/DCM/EtOAc/正己烷)和反相 HPLC 分析监测反应过程。在相应的过程中，反应混合物经乙酸乙酯稀释并按照如上操作进行。

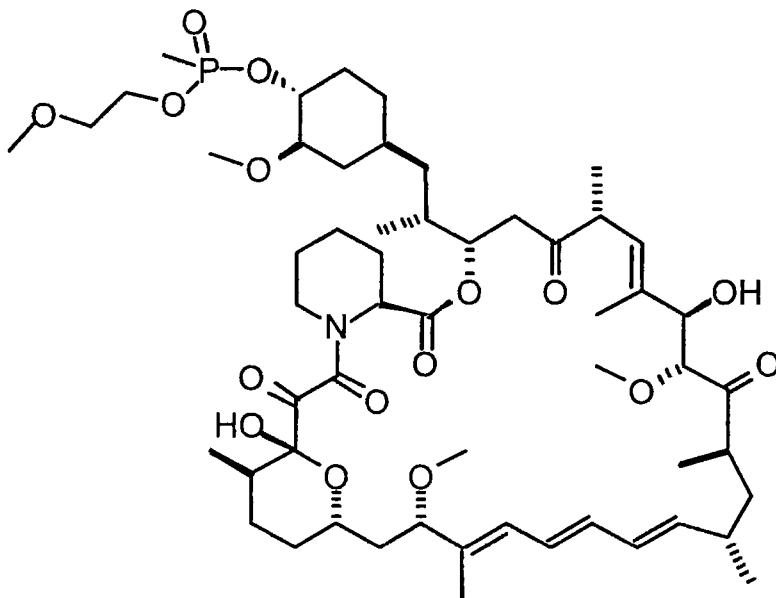
### 实施例 2: 甲基磷酸正丁基酯 C-43 雷帕霉素酯



向包含 1H-四氮唑(~0.002 g, 0.028 mmol)的烧瓶中加入 0.33 mL 正丁醇(0.041 g, 0.55 mmol)的 DCM 溶液，随后加入 0.33 mL 的 3,5-二甲基吡啶(0.090 g, 0.84 mmol)的 DCM 溶液。所得的澄清液冷至 0°C 后在氮氛中加入 0.33 mL 甲基磷酸二酰氯(0.073 g, 0.55 mmol)的 DCM 溶液。得到的白色混悬液室温下搅拌过夜。冷却的(0°C)雷帕霉素(0.1 g, 0.11 mmol)的 DCM 溶液中加入 0.5 mL 的 3,5-二甲基吡啶(0.090 g, 0.84 mmol)的 DCM 溶液，随后立即加入磷酸化试剂(具有白色沉淀的黄色溶液)并用 1.0 mL DCM 洗涤。所得黄色溶液在 0°C 下搅拌 1.0 小时(经 MS 分析)。冷的(0°C)反应液经~20 mL EtOAc 稀释后转移至含 EtOAc (120 mL)和饱和的 NaHCO<sub>3</sub> (100 mL)的分离漏斗中。除去水层后，有机层相继使用冰冷的 1N HCl (1x100 mL)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> (3x100 mL)和盐水(1x100 mL)洗涤，并经 MgSO<sub>4</sub> 干燥，浓缩。粗产物经硅胶快速层析法(洗脱剂为 0.25: 10: 3: 3 以及 0.5: 10: 3: 3 的 MeOH/DCM/EtOAc/

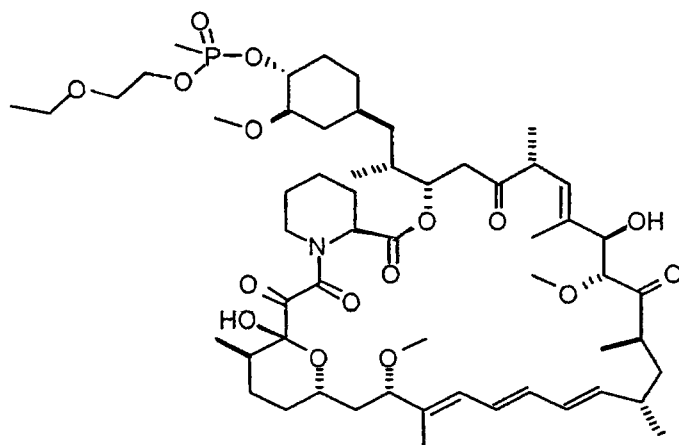
正己烷) 和反相 HPLC(85% MeOH/H<sub>2</sub>O)纯化得到白色固体(~2: 1 非对映混合物): <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.15 (m, 1Ha, 1Hb), 4.11-3.89 (m, 3Ha, 3Hb), 3.04 (m, 1Ha, 1Hb); <sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 32.1, 29.9; 1071 m/z (M+Na).

**实施例 3:** 甲基膦酸 2-甲氧基乙基酯 C-43 雷帕霉素酯



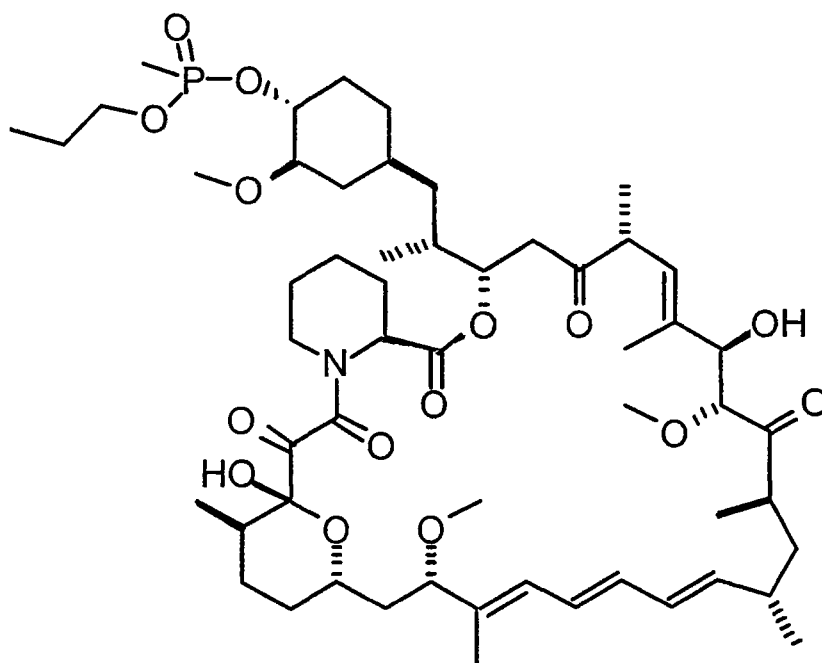
标题化合物经实施例 2 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体 (~2: 1 非对映混合物): <sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) d 33.0, 30.8; 1073 m/z (M+Na).

**实施例 4:** 甲基膦酸 2-乙氧基乙基酯 C-43 雷帕霉素酯



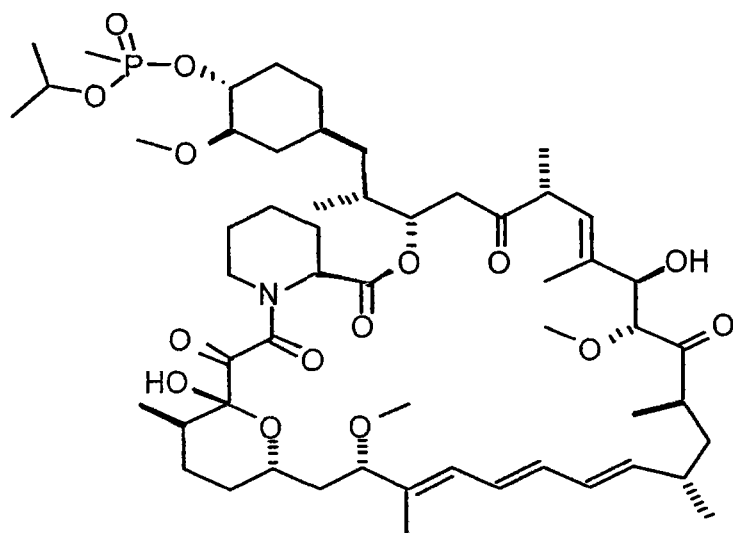
标题化合物经实施例 2 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体 (~2: 1 非对映混合物):  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 32.8, 30.8; 1087 m/z (M+Na)。

**实施例 5:** 甲基磷酸 2-正丙氧基乙基酯 C-43 雷帕霉素酯



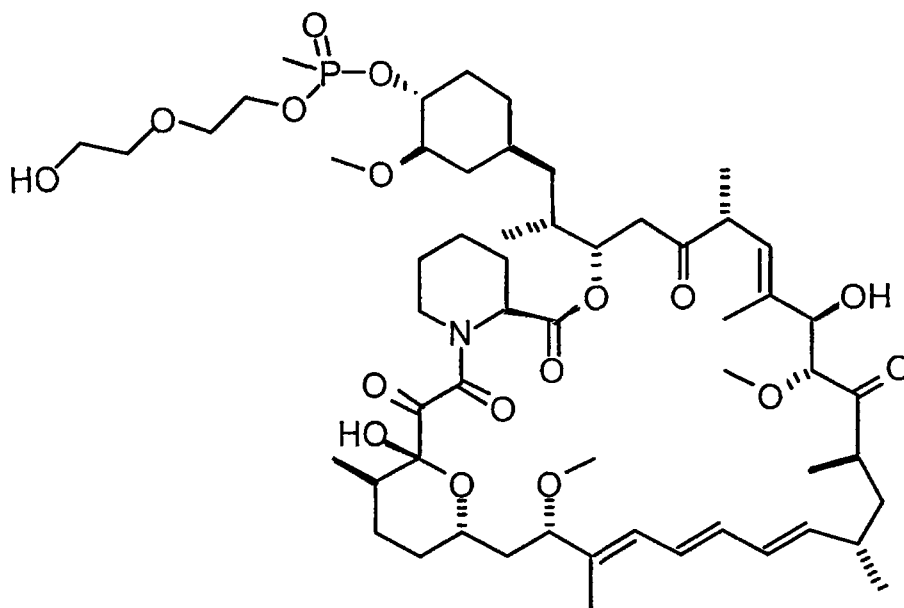
标题化合物经实施例 2 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体 (~2: 1 非对映混合物):  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 32.1, 29.9; 1057 m/z (M+Na)。

**实施例 6:** 甲基磷酸异丙基酯 C-43 雷帕霉素酯



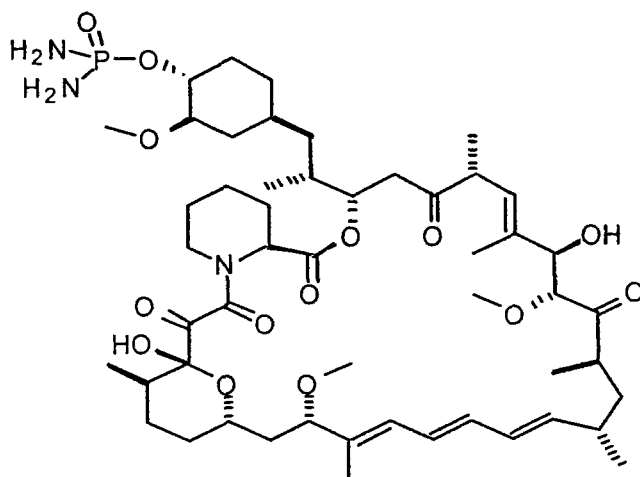
标题化合物经实施例 2 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体 (~2: 1 非对映混合物):  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 31.3, 28.8; 1057 m/z (M+Na).

**实施例 7:** 甲基磷酸 2-(2-羟基-乙氧基)-乙基酯 C-43 雷帕霉素酯



标题化合物经实施例 2 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体 (~2: 1 非对映混合物):  $^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 32.7, 30.9; 1103 m/z (M+Na).

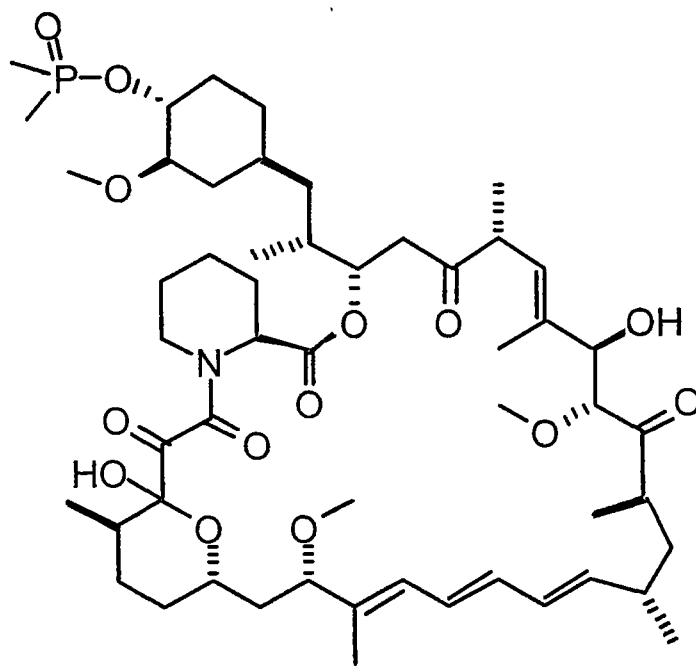
**实施例 8:** 二氨基-次磷酸(phosphinic acid)C-43 雷帕霉素酯



二氨基-次磷酸 C-43 雷帕霉素酯

向 5.0 mL 搅拌的雷帕霉素(0.109 g, 0.12 mmol)和 4-二甲基氨基吡啶(0.072 g, 0.59 mmol)的 DCM 溶液(0°C)中逐滴加入氯氧化磷(0.050 mL, 0.54 mmol)。15 分钟后, 使用 5.0 mL DCM 稀释混合物并冷却至-78°C。向反应液中通入氨气 2 分钟出现浓厚的白色沉淀。反应混合物在 75 mL EtOAc 和 25 mL 5% HCl 水溶液的两相混合物中分离。有机部分相继经 25 mL 水和 25 mL 盐水洗涤, MgSO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩。所得残留物经硅胶快速层析法(洗脱剂为 9:1 二氯甲烷/甲醇)纯化得 0.029 g 所需产物: <sup>31</sup>P NMR (121 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 16.4; 1014 m/z (M+Na)。

### 实施例 9: 二甲基-次磷酸 C-43 雷帕霉素酯



#### 二甲基-次磷酸 C-43 雷帕霉素酯

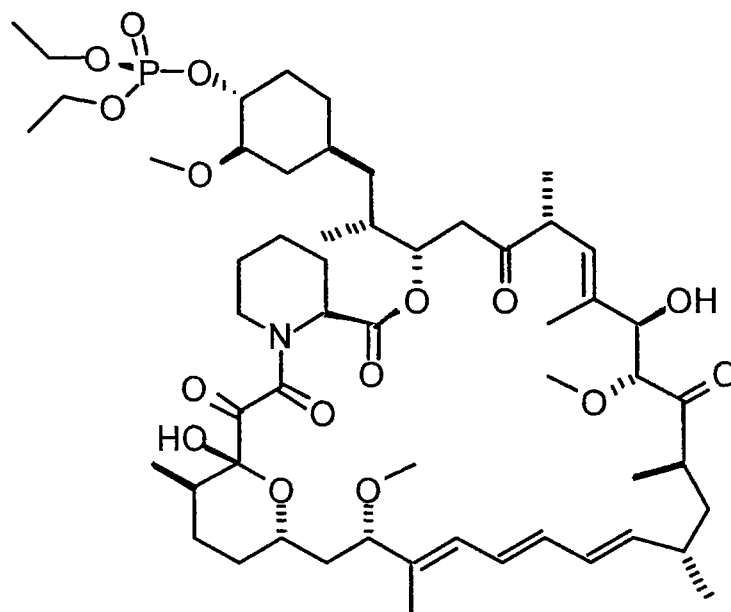
在氨气流中, 向 1.8 mL 冷却的(0°C)雷帕霉素(0.1 g, 0.109 mmol)的二氯甲烷溶液中加入 0.168 g (0.82 mmol) 2,6-二-叔丁基-4-甲基吡啶, 随后立即加入 0.2 mL 二甲基次磷酸酐(0.062 g, 0.547 mmol)的二氯甲烷溶液。浅黄色反应液在氨气中于 0°C 搅拌 3.5 小时(通过 TLC 监测反应)。冷的(0°C)反应液经 ~20 mL EtOAc 稀释后转移至含 EtOAc (150 mL)和饱和的 NaHCO<sub>3</sub> (100 mL) 的分离漏斗中。除去水层后, 有机层相继使用冰冷的 1N HCl (1x100 mL)、饱和 NaHCO<sub>3</sub> (1x100 mL)和盐水(1x100 mL)洗涤, 并经 MgSO<sub>4</sub> 干燥, 浓缩。

粗产物经硅胶快速层析法(洗脱剂为 1: 10: 3: 3 的 MeOH/DCM/EtOAc/正己烷)纯化得到白色固体:  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) . 4.18 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 1.51 (m, 6H);  $^{31}\text{P NMR}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) d 53.6; 1013 m/z (M+Na).

### 实施例 9: 另一种合成法

雷帕霉素和二氯甲烷注入氮气保护的反应瓶中。搅拌溶液并冷却至约  $0^\circ\text{C}$  (在反应全过程中保持外温  $-5 \pm 5^\circ\text{C}$ )。在约 8-13 分钟内加入二甲基次磷酸酰氯(2.0 摩尔当量)的二氯甲烷溶液。随后立即开始加入 3,5-二甲基吡啶(2.2 摩尔当量)的二氯甲烷溶液, 在约 15-20 分钟内加完。两次加料过程中, 反应内温保持低于  $0^\circ\text{C}$ 。冷却的反应液搅拌 1 小时后, 将冷的反应液转移至包含饱和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液和甲基叔丁基醚(MTBE), 乙酸乙酯或乙醚的提取器中。在此过程 30 和 60 分钟时移出样品。经与所述反应工艺相似的方法制备样品。反应过程通过 TLC(1: 10: 3: 3 MeOH/DCM/EtOAc/环己烷)和反相 HPLC 分析监测。分离出的有机层继使用冰冷的 1N HCl (1x)、饱和  $\text{NaHCO}_3$  (2x)、和饱和 NaCl 水溶液洗涤, 并经硫酸钠干燥。过滤并除去溶剂, 残留物粗产物与丙酮溶剂交换后真空浓缩得粗产物, 经正相或反相 HPLC 分析纯化。

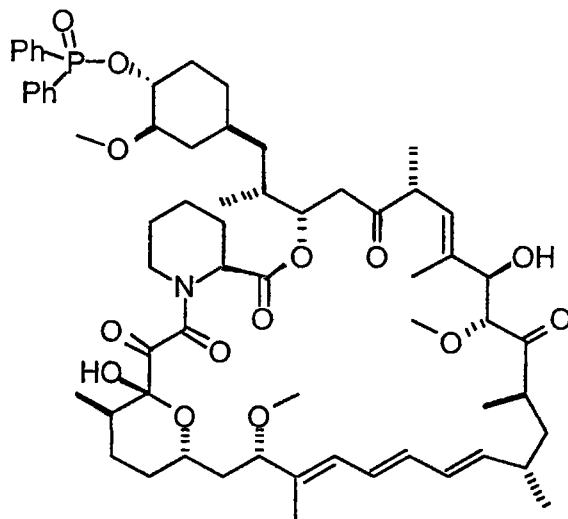
### 实施例 10: 磷酸二乙酯 C-43 雷帕霉素酯



标题化合物经实施例 9 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体:

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -1.2; 1073 m/z ( $\text{M}+\text{Na}$ ).

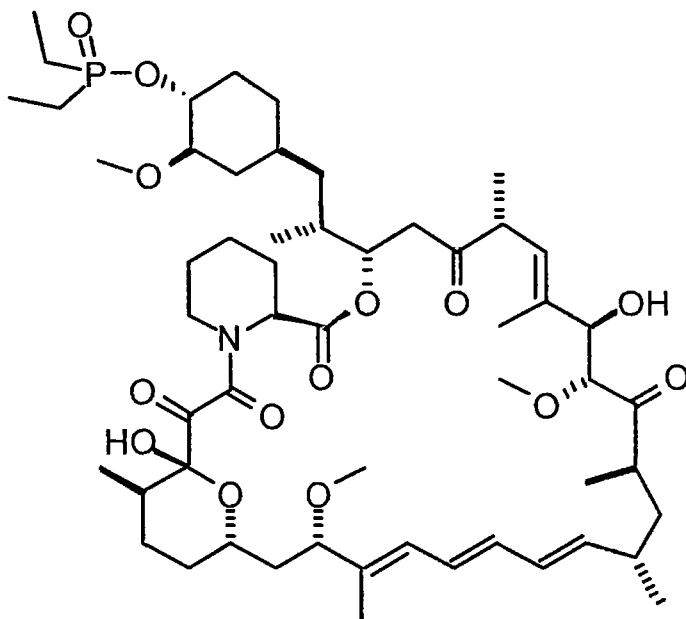
**实施例 11: 二苯基-次磷酸 C-43 雷帕霉素酯**



标题化合物经实施例 9 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体:

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  31.3; 1137 m/z ( $\text{M}+\text{Na}$ ).

**实施例 12: 二乙基-次磷酸 C-43 雷帕霉素酯**

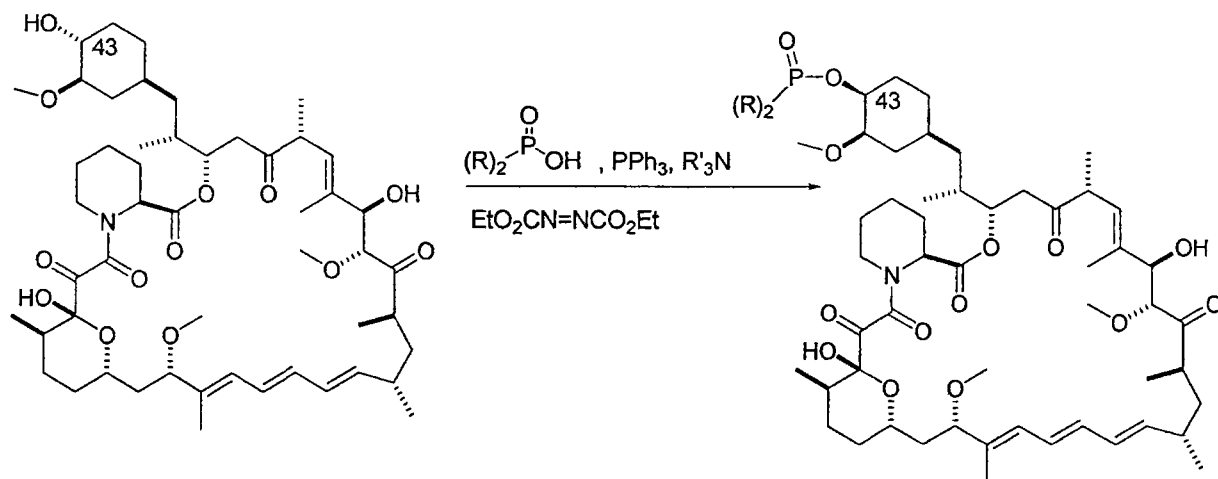


标题化合物经实施例 9 中描述的相似方法合成。所得产物为白色固体:

$^{31}\text{P}$  NMR (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  61.3; 1041 m/z ( $\text{M}+\text{Na}$ ).

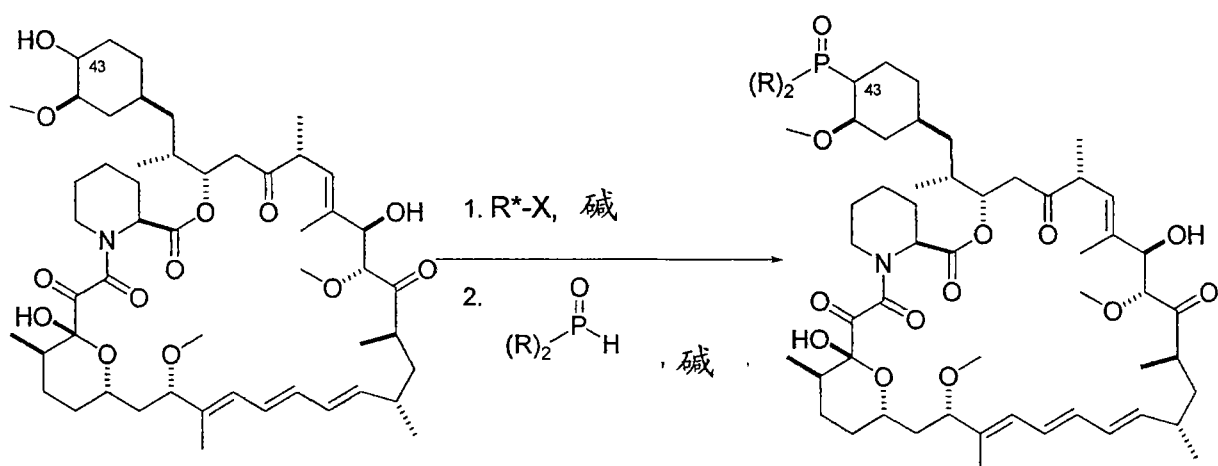


### 实施例 13: 含磷的表 C-43 雷帕霉素酯衍生物的制备



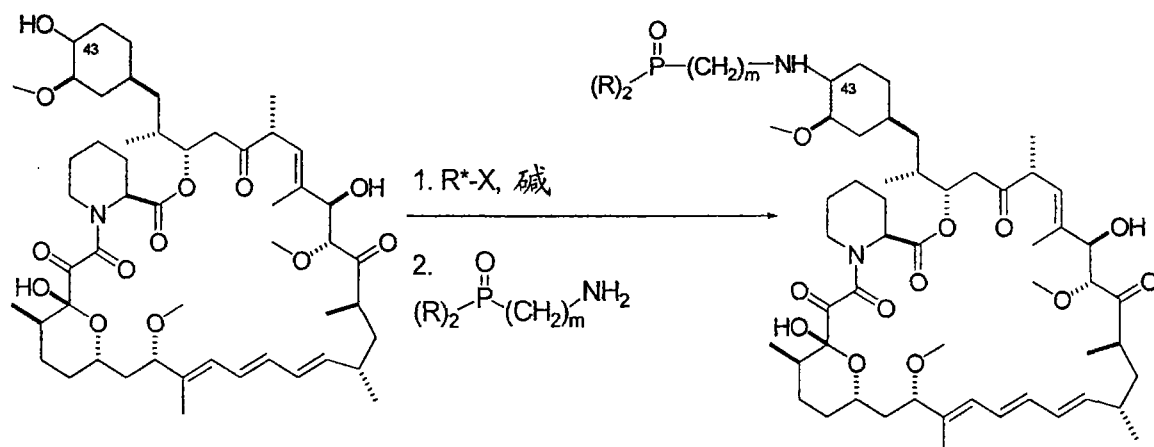
上示此类 43-表化合物可适用 Kay, P.B. 等在 J Chem Soc, Perkin Trans. 1, 1987, [8], 1813-1815 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 R 和各 R' 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

### 实施例 14: 与磷相连的 C-43 雷帕霉素酯衍生物的制备



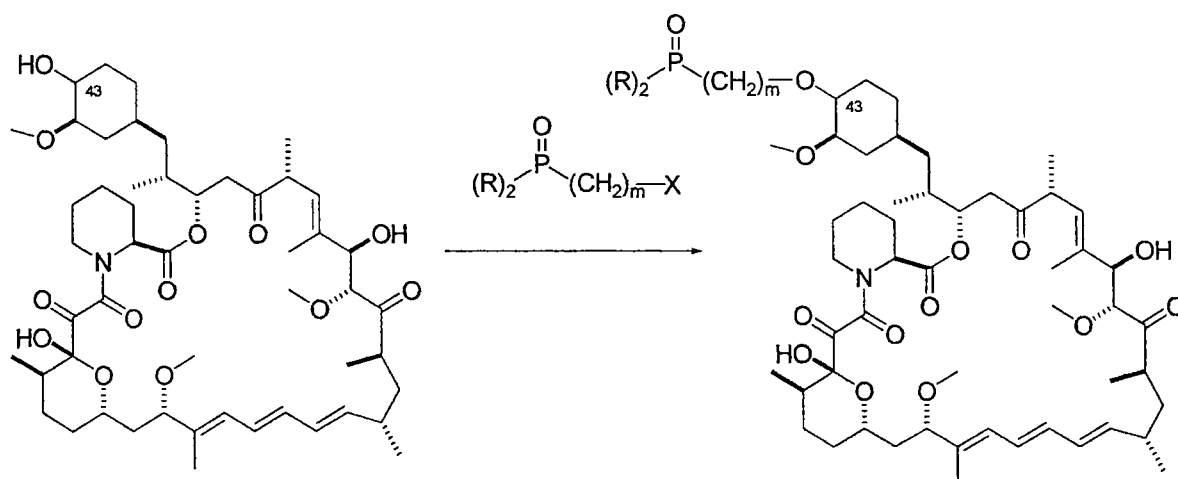
上示此类与磷相连的化合物可适用 Yamashita, M. 等在 Bull Chem Soc Japan, 1983, 56, 1871-1872 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是卤素或酸酐例如, R\*X 生成了作为离去基团的 C-43 R\*O-部分, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

### 实施例 15: 含磷的烷基氨基相连的 C-43 雷帕霉素衍生物的制备



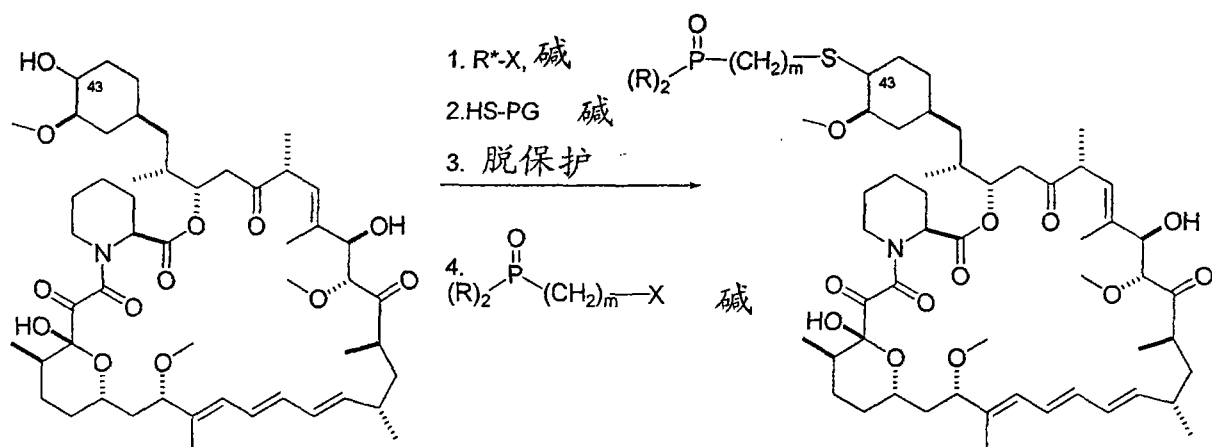
上示此类与氨基相连的化合物可适用 Cavalla, D. 等在 Tet. Lett., 1983, 24, 295-298; Grinfield, A.等在 WO 98/09972 和 Or, Y.S. 等在 US 5,583,139 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是卤素或酸酐例如, R\*X 生成了作为离去基团的 C-43 R\*O-部分, m 是 1 至 10 的数字, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

#### 实施例 16: 含磷的醚基相连的 C-43 雷帕霉素衍生物的制备



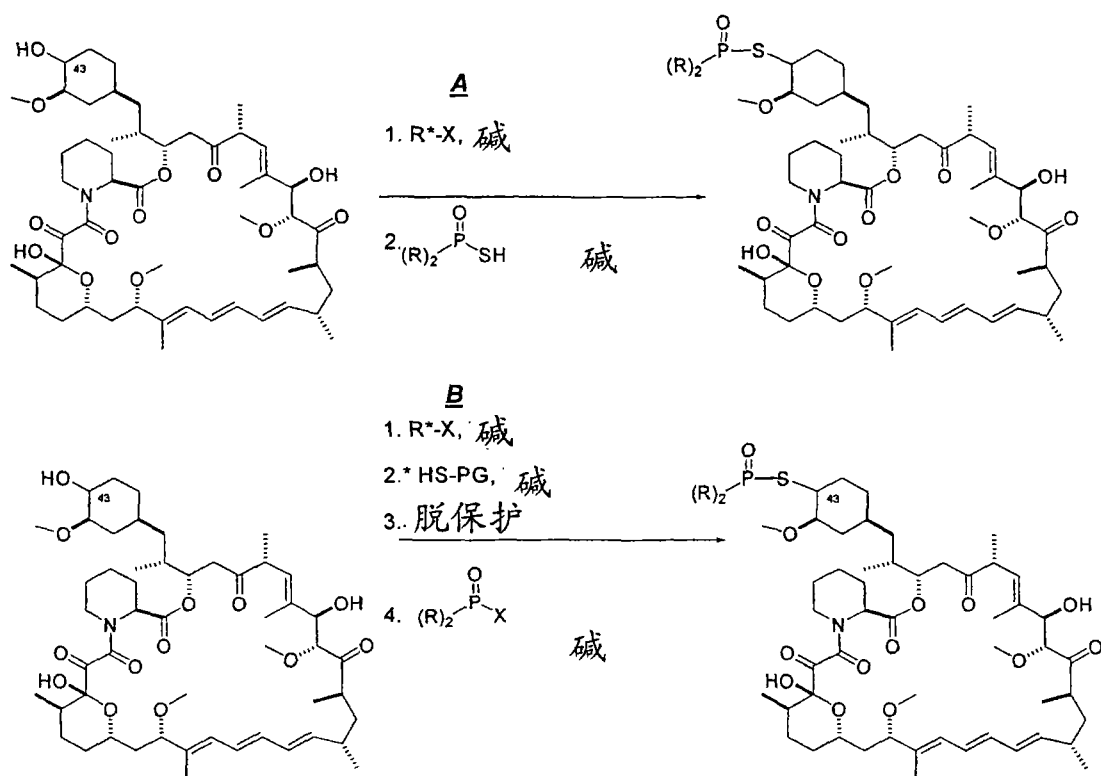
上示此类醚化合物可适用 Cottens, S 等在 PCT 国际申请公开 WO 94/09010 和 Cheng, D.等 WO 98/09970 中公开的方法制备, 所用的描述试剂(和基数)中 X 是离去基团, m 是 1 至 10 的数字, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

#### 实施例 17: 含磷的烷基硫基相连的 C-43 雷帕霉素衍生物的制备



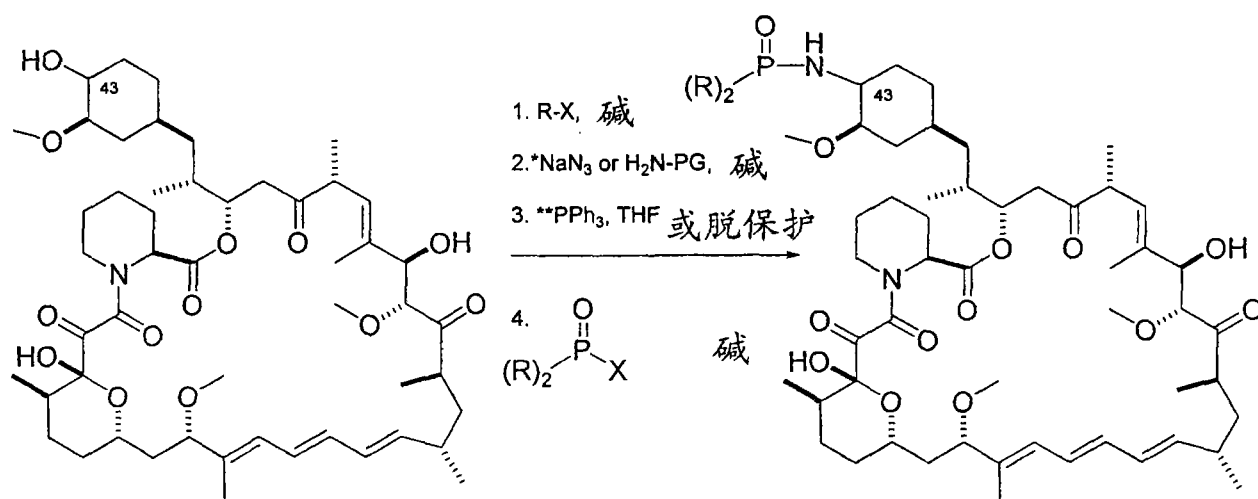
上示此类硫醚化合物可适用 Grinfield 等在 PCT 国际申请公开 WO 98/09972 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是卤素或酸酐例如,  $R^*X$  生成了作为离去基团的 C-43  $R^*O$ -部分, m 是 1 至 10 的数字, PG 是硫基保护基, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

### 实施例 18: 其它含磷的硫相连的 C-43 雷帕霉素衍生物的制备



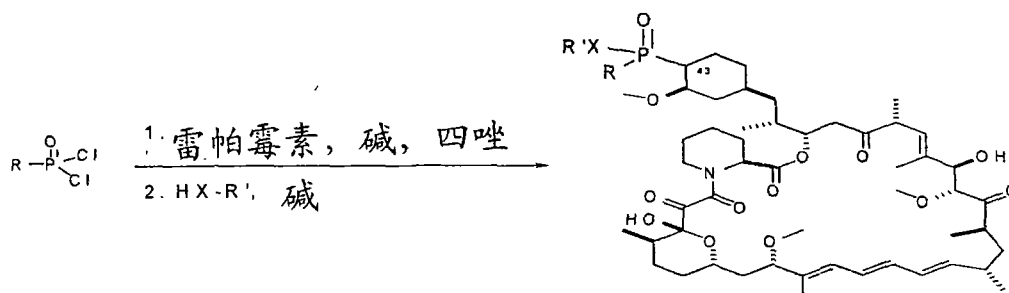
上示此类硫-化合物中可适用 Yuan 等在 Synthesis, 1989, 1, 48 - 50 (路线 A)或 Grinfield 等在 PCT 国际申请公开 WO 98/09972 以及 Masson S 等在 Bull Soc Chim Fr, 1996, 133, 951-964 (路线 B)公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是卤素或酸酐例如, R\*X 生成了作为离去基团的 C-43 R\*O-部分, m 是 1 至 10 的数字, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

### 实施例 19: 含磷的氨基相连的 C-43 雷帕霉素衍生物的制备



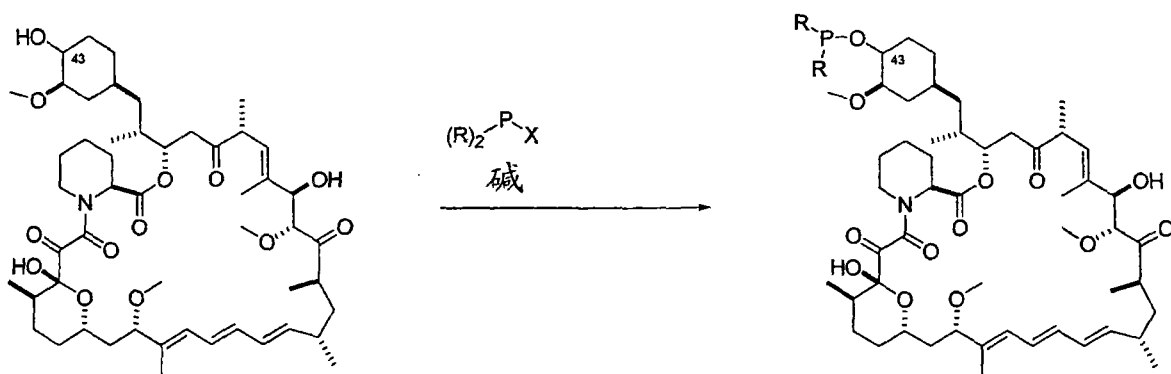
上示此类化合物可适用 Grinfield 等在 PCT 国际申请公开 WO 98/09972 ; Bravo, F 等在 Tetrahedron: Assymetry, 2001, 12, 1635 - 1643; 和 Wang M, 等在 J Org Chem, 1995, 60, 7364 - 7365 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是卤素或酸酐例如, R\*X 生成了作为离去基团的 C-43 R\*O-部分, m 是 1 至 10 的数字, PG 是保护基, 各次出现的 R 是取代或未取代的脂肪族、脂氧基、芳基、芳氧基、杂芳基、杂芳氧基等部分。

### 实施例 20: 含磷且 C-43 雷帕霉素混合酯衍生物的制备



上示此类化合物可适用 Zhao, K.等在 Tetrahedron, 1993, 49, 363-368 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 是 NH, O 或 S, 各次出现的 R 和 R' 是取代或未取代的脂肪基, 脂氧基, 芳基, 芳氧基, 杂芳基, 杂芳氧基等部分 (或如果 X 是 NH, R' 可以是 H)。

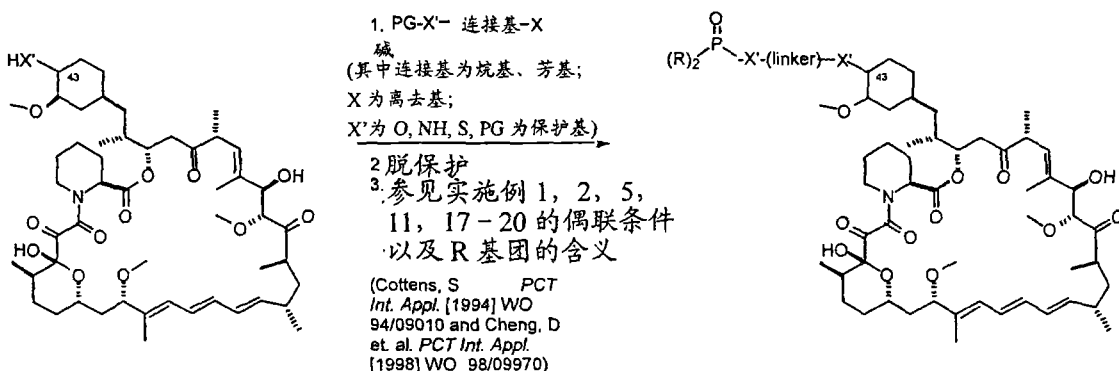
### 实施例 21: 其它 O-P-连接的化合物



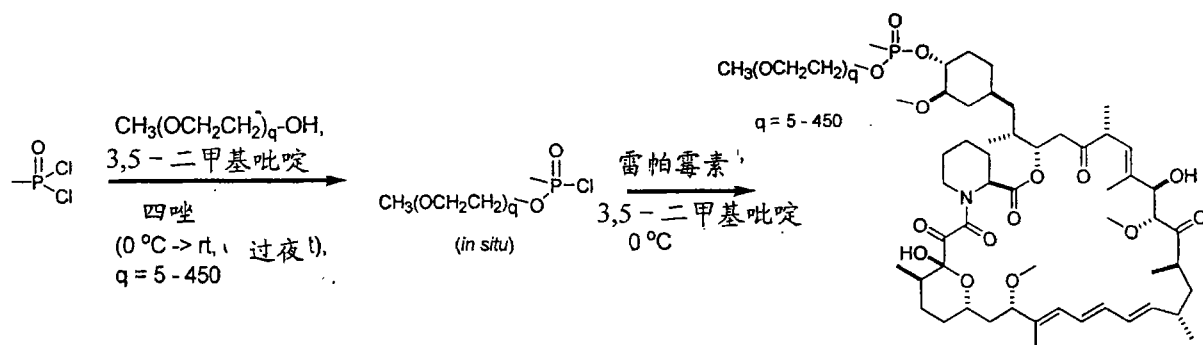
上示此类化合物可适用 McCallum, J. S. 等在 Synthesis, 1993, 8, 819-823, 和 Nifantsev, E. E. 等在 J. Organomet. Chem., 1997, 529, 171-176 中公开的方法制备, 所用的描述试剂中 X 离去基团。

### 实施例 22: 其它化合物

含磷的 C-43 雷帕霉素醚连衍生物的制备(参见实施例 1、2、5、11、17-20 的偶联条件和 R 基团的含义)



### 实施例 23: 磷连的 C-43 雷帕霉素 PEG 酯的制备



### 实施例 24: 纯化

前述说明性实施例中的化合物可使用硅胶快速柱层析法纯化以除去可能存在的杂质如残留的反应物(包括残留的雷帕霉素或雷帕类似物等起始原料)和不需要的副产物。适宜的快速层析系统包括商业提供的预填充的层析柱系统, 如BIOTAGE, Inc. (PO Box 8006), Charlottesville, Va 22906-8006)的产品。可获得的层析柱中包含粒径为~30-70 $\mu\text{m}$ , 孔径为60 Å的硅胶。下文提供了使用这样的快速层析系统纯化本发明化合物的方法。

粗产物溶于最小量的合适溶剂中(如二氯甲烷, “DCM”)并装填于FLASH Biotage层析柱上。非极性杂质经DCM洗脱后, 使用如0.5: 10: 3: 3 MeOH/DCM/EtOAc/环己烷的溶剂系统洗脱产物。最后使用如1: 10: 3: 3 MeOH/DCM/EtOAc/环己烷的溶剂系统冲洗层析柱。收集的各份洗脱液经TLC, 正相或反相HPLC分析。合并经正相HPLC确定的含纯产物的两份或更多份洗脱液并真空浓缩。为了改善纯化产物的总收率, 不纯的洗脱液可在分离性FLASH Biotage系统中使用相同的洗脱溶剂再次纯化并按照同样的纯度标准合并。多个纯化的产物沉淀池分别进行多次溶剂交换, 如与丙酮(典型地进行4-6次), 并使用相同的溶剂(如, 丙酮)作为转移溶剂进行合并。合并前, 应分析并确定合并组分中可接受的纯度。可使用相同的溶剂(此例中为丙酮)再对合并的同批产物进行溶剂交换(典型地进行2次), 室温下真空干燥至恒重, 如果需要的话, 所得样品可用于QC分析。

### 实施例25: 负载化合物的血管支架

使用25 mg/ml含实施例1-12中任一化合物的100%乙醇、丙酮或乙酸乙酯溶液对尺寸为3.0 mm x 14 mm的不锈钢Duraflex.TM.支架进行喷雾。干燥支

架，溶剂蒸发后将化合物留于支架表面。在1,4-二氧杂环己烷(Aldrich Chemicals销售)中制备75: 25的PLLA/PCL共聚物(Polysciences销售)。使负载化合物的支架以200 rpm的轴心转速旋转，并在其旋转时使用喷雾枪(Binks Manufacturing销售)喷射共聚物溶液的细雾10-30秒。然后将支架置于25-35°C炉中可长达24小时使溶剂完全挥发。

#### 实施例26: 在血管支架上增加负载化合物

不锈钢Duraflex支架(3.0 x 13 mm)自SS管激光剪切得到。通过增加支架表面的粗糙度增加负载药物的表面积。沿着支架的连接杆(strut)刻上宽10 nm、深5 nm的凹槽可进一步增加支架的表面积和容积。凹槽刻在扩张时所受压力低的位置，这样不会减弱支架的径向力。实施例1-12的任一化合物可通过浸渍或喷雾化合物的溶液负载于支架上和凹槽中，所用溶剂为低表面张力溶剂如二氯甲烷、异丙醇、丙酮、乙酸乙酯、乙醇或甲醇。干燥支架，化合物留在支架表面和凹槽中形成药物储藏室。然后在支架上覆以聚对二甲苯作为限速屏障。化合物自支架洗脱的时间在1天至45天内。

#### 实施例27

实施例1-12的任一化合物溶于乙酸乙酯中，然后喷雾于支架上，挥发溶剂后化合物保留在支架表面。在含有化合物的支架表面喷射或堆积基质或屏障(硅酮，聚四氟乙烯，PARYLAST™，聚对二甲苯)。化合物的量在100微克至2毫克之间，释放速度在1天至45天之间。

#### 实施例28

涂层于支架上的含化合物的基质如实施例25中的描述制备，然后使用限速屏障(和/或用作限速屏障的不含药物的基质)的外层涂液进行涂层或喷射。或者，化合物可经限速屏障涂层于支架上，然后使用外层涂液(另一种屏障或基质)包裹。使用外层涂液进一步提供了释放速率的控制，生物相容性的改善，和/或对支架运输或扩张时的划痕或裂口的抗力。