

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C07D498/18

A61K 31/4353

A61P 29/00



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01815911.7

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1222529C

[22] 申请日 2001.9.13 [21] 申请号 01815911.7

[30] 优先权

[32] 2000.9.19 [33] US [31] 60/233, 776

[86] 国际申请 PCT/US2001/028575 2001.9.13

[87] 国际公布 WO2002/024706 英 2002.3.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.19

[71] 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 朱天民 M·B·福兹

审查员 于海江

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 马崇德

权利要求书 4 页 说明书 14 页

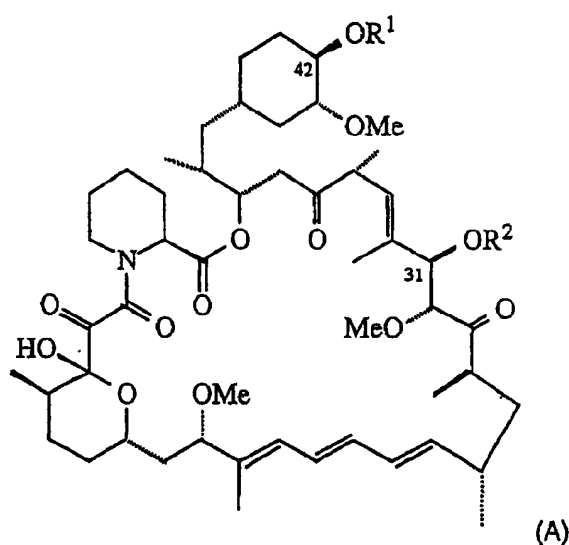
[54] 发明名称 水溶性雷帕霉素酯类

[57] 摘要

本发明提供雷帕霉素的聚乙二醇化的羟基酯类，它可用于诱导免疫抑制，并可用来治疗移植排斥、自免疫性疾病、实体肿瘤、真菌感染以及血管疾病。

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

1. 一种具有结构 (A) 的化合物或它们的药物上可接受的盐类,



5 其中

$R^1$  是氢、或  $-\text{CO}(\text{CR}^3\text{R}^4)_b(\text{CR}^5\text{R}^6)_d\text{CR}^7\text{R}^8\text{R}^9$ ;

$R^2$  是氢;

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基或含 2-7 个碳原子的炔基;

10  $R^5$  和  $R^6$  各自独立地是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

$R^7$  是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

15  $R^8$  和  $R^9$  各自独立地是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

$R^{10}$  是氢或  $-\text{COCH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-OCH}_3$ ;

$R^{11}$  是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基或含 7-10 个碳原子的苯基烷基;

$b = 0-6$ ;

$d = 0-6$ ;

$f = 0-6$ ;

20  $n = 5-450$ ;

前提条件是  $R^1$  和  $R^2$  二者都不同时是氢，进一步的条件是  $R^1$  或  $R^2$  两者中任一个均含有至少一个  $-(CR^3R^4)_fOR^{10}$  基团，其中  $R^{10}$  是  $-\text{COCH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2)_n\text{-OCH}_3$ 。

2. 权利要求 1 中的化合物，其中  $b=0$ ， $d=0$ 。
- 5 3. 权利要求 1 至 2 中任何一项中的化合物，其中  $f=1$ 。
4. 权利要求 1 至 3 中任何一项中的化合物，其中  $R^3$  和  $R^4$  是氢。
5. 权利要求 1 至 4 中任何一项中的化合物，其中  $R^7$  氢、含 1-6 个碳原子烷基、含 2-7 碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基或  $-\text{CF}_3$ 。
6. 权利要求 1 至 5 中任何一项中的化合物，其中  $R^8$  和  $R^9$  是  
10  $-(CR^3R^4)_fOR^{10}$ 。
7. 权利要求 1 至 6 中任何一项中的化合物，其中  $n=5-200$ 。
8. 权利要求 7 的化合物，其中  $n=8-135$ 。
9. 权利要求 7 的化合物，其中  $n=8-20$ 。
10. 权利要求 7 的化合物，其中  $n=90-120$ 。
- 15 11. 权利要求 1 的化合物，它是雷怕霉素-42 酯与 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸甲氧聚(乙二醇)硫醇 5000 的结合物。
12. 权利要求 1 的化合物，它是雷怕霉素 42 酯与 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸双(甲氧聚(乙二醇)硫醇 5000)的结合物。
13. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药  
20 物上可接受的盐类，在制备治疗或抑制哺乳动物中移植排斥作用或移植物对宿主造成的疾病的药物中的应用。
14. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药  
物上可接受的盐类，在制备治疗或抑制哺乳动物中的实体肿瘤的药物  
中的应用。
- 25 15. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药  
物上可接受的盐类，在制备治疗或抑制哺乳动物中的真菌感染的药物  
中的应用。
16. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药  
物上可接受的盐类，在制备治疗或抑制哺乳动物中的类风湿性关节炎  
30 的药物中的应用。
17. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药  
物上可接受的盐类，在制备治疗或抑制哺乳动物中的多发性硬化症的

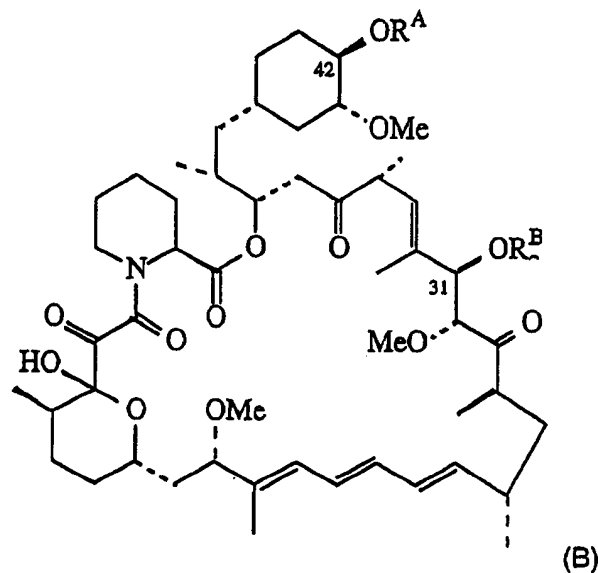
药物中的应用。

18. 权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药物上可接受的盐类, 在制备治疗或抑制哺乳动物中的心瓣再狭窄的药物中的应用。

5 19. 使用权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物或其药物上可接受的盐类, 在制备治疗或抑制哺乳动物中的肺炎的药物中的应用。

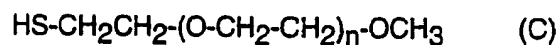
20. 一种药物组合物, 它含有权利要求 1 至 12 中任意一项的具有式 (A) 的化合物以及药物上可接受的载体。

10 21. 一种制备权利要求 1 中定义的具有式 (A) 化合物的方法, 它包括把具有公式 (B) 的化合物:



15 其中  $R^A$  是权利要求 1 中定义的  $R^1$ ,  $R^B$  是权利要求 1 中定义的  $R^2$ ,  $R^{10}$  与权利要求 1 中式 (A) 中的定义相关, 前提条件是至少一个  $R^{10}$  基团代表  $-COCH_2X$ , 其中  $X$  是一个适当的离去基团;

与具有下式 (C) 的化合物进行反应;



20 其中  $n$  值与权利要求 1 中的定义相同, 如果需要可将任何反应活性取代基进行保护, 并在需要时除去保护基, 而给出相应的式 (A) 化合物。

22. 如权利要求 21 中所定义的式 (B) 的化合物。

23. 权利要求 22 中的式 (B) 化合物, 它是雷帕霉素 42 位羟基

与 3-羟基-2-(2-碘-乙酰氧甲基)-2-甲基丙酸形成的酯。

24. 权利要求 22 中的式 (B) 化合物, 它是雷怕霉素 42 位羟基与 3-(2-碘乙酰氧基)-2-(2-碘乙酰氧甲基)-2-甲基-丙酸形成的酯。

## 水溶性雷帕霉素酯类

本发明涉及水溶性雷帕霉素酯类，后者可用于诱导免疫抑制和治  
5 疗移植排斥、自免疫性疾病、实体肿瘤、真菌感染和血管疾病中。更  
具体地说，本发明涉及雷帕霉素的羟基酯类的甲氧基聚（乙二醇）酯  
类，它们的制备和其中的中间体，以及用它们来诱导免疫抑制、和在  
治疗移植排斥、移植物对宿主的疾病、自免疫性疾病、炎症、成人 T-  
10 细胞白血病/淋巴瘤、实体肿瘤、真菌感染、心血管疾病、脑血管疾病、  
末梢血管疾病或血管过度增殖疾病时的使用方法。

雷帕霉素是由吸水链霉菌（*Streptomyces hygroscopicus*）产生  
的一种大环三烯抗生素，它被发现具有抗真菌活性，特别是对白色念  
珠菌（*Candida albicans*），在活体内或活体外都有活性 [参见  
C.Vezina 等人，J. Antibiot. 28, 721 (1975); S.N. Sehgal 等人，  
15 J. Antibiot. 28, 727 (1975); H.A. Baker 等人，J. Antibiot.  
31, 539 (1978); USP 3, 929, 992; USP 3, 993, 749]。另外，雷帕霉素  
单独（USP 4, 885, 171）或与溶链菌素结合使用（USP 4, 401, 653）也  
已显示具有抗肿瘤活性。

雷帕霉素的免疫抑制效果已被公开于 FASEB 3, 3411 (1989)。环孢  
20 子菌素 A 和 FK-506，其它大环分子，也显示出是有效的免疫抑制剂，  
从而可用于防止移植排斥 [FASEB 3, 3411 (1989); FASEB  
3, 5256 (1989); R.Y. Calne 等人，Lancet. 1183 (1978); USP  
5, 100, 899]。R. Martel 等人 [Can J. Physiol. pharmacol.  
55, 48 (1977)] 公开了雷帕霉素在实验性的过敏性脑脊髓炎模式、多发  
25 性硬化症模式中是有效的；在辅助性关节炎模式、一种类风湿性关节  
炎模式中也是有效的；并能有效地抑制类似 IgE 抗体的形成。

雷帕霉素也可用来预防和治理全身性红斑狼疮 [USP  
5, 078, 999]、肺炎 [USP 5, 080, 899]、胰岛素依赖型糖尿病 [USP  
5, 321, 009]、皮肤疾病、诸如牛皮癣、[USP 5, 286, 730]、肠通紊乱  
30 [USP 5, 286, 731]、平滑肌细胞增殖以及内膜增厚接着导致血管损伤  
[USP 5, 288, 711 和 5, 516, 781]、成人 T-细胞白血病/淋巴瘤 [欧洲专  
利申请 525, 960 A1]、眼炎 [USP 5, 387, 589]、恶性癌 [USP

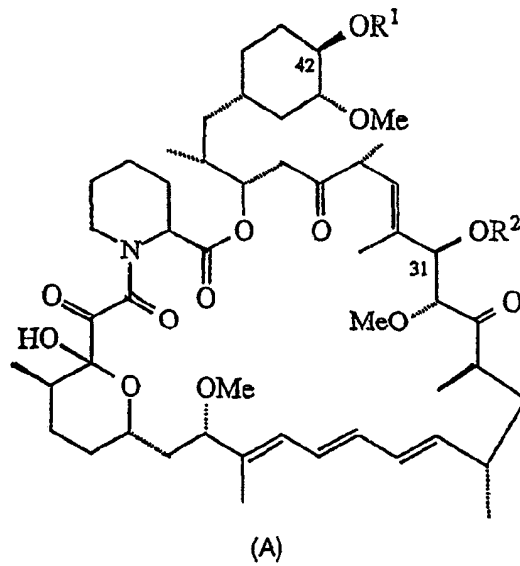
5,206,018]、心脏炎性疾病 [USP 5,496,832]、和贫血 [USP 5,561,138]。

一种雷帕霉素酯，即雷帕霉素 42 位羟基与 3-羟基-2-(羟甲基-2-甲基丙酸形成的酯 [公开于 USP 5,362,718])，也被称为 CCI-779，  
5 已显示出具有对于许多肿瘤细胞株在活体动物肿瘤模型以及在阶段 I 临床试验中的抗肿瘤活性。 [Gibbons, J., Proc. Am. Assoc. Can. Res. 40: 301 (1999); Georger B., Proc. Am. Assoc. Can. Res. 40: 603 (1999); Alexandre. J., Proc. Am Assoc. Can. Res. 40: 613 (1999); 以及 Alexandre, J., Clin. Canser. Res. 5 (November  
10 Supp.), Abstr. 7 (1999)]。

聚乙二醇 (PEG) 是一种线型或带叉链的、中性聚合物，可具有各种大小的分子量并且可溶于水和大多数有机溶剂中。当分子量小于 1000 时是粘稠的、无色液体；较高分子量的 PEG 是蜡状的白色固体。固体的熔点比例于它的分子量，在达到 67°C 以后曲线即达到平顶。分子量范围为几百至约 20,000 的 PEG 通常被用于生物学和生物技术应用中。在生物医学领域中令人很感兴趣的是这样的事实，即 PEG 是无毒的，并被 FDA 批准可用于体内消耗。PEG 化的雷帕霉素被公开于 USP 5,780,462。

#### 发明内容

20 本发明提供具有以下结构 (A) 的雷帕霉素羟基酯的甲氧基聚(乙二醇)酯类：



其中

$R^1$  和  $R^2$  各自独立地是氢或  $-\text{CO}(\text{CR}^3\text{R}^4)_b(\text{CR}^5\text{R}^6)_d\text{CR}^7\text{R}^8\text{R}^9$ ;

$R^3$  和  $R^4$  各自独立地是氢、含 1 至 6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、三氟甲基或  $-\text{F}$ ;

$R^5$  和  $R^6$  各自独立地是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

$R^7$  是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

$R^8$  和  $R^9$  各自独立地是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基、 $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$ ,  $-\text{CF}_3$ ,  $-\text{F}$ , 或  $-\text{CO}_2\text{R}^{11}$ ;

$R^{10}$  是氢或  $-\text{COCH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-OCH}_3$ ;

$R^{11}$  是氢、含 1-6 个碳原子的烷基、含 2-7 个碳原子的烯基、含 2-7 个碳原子的炔基或含 7-10 个碳原子的苯基烷基;

$b = 0-6$ ;

$d = 0-6$ ;

$f = 0-6$ ;

$n = 5-450$ ;

前提条件是  $R^1$  和  $R^2$  二者都不是氢, 进一步的条件是  $R^1$  或  $R^2$  当中的任一个包含至少一个  $-(\text{CR}^3\text{R}^4)_f\text{OR}^{10}$  基团, 其中  $R^{10}$  是  $-\text{COCH}_2\text{-S-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O-CH}_2\text{-CH}_2\text{)}_n\text{-OCH}_3$ , 或其药物上可接受的盐, 它可用于诱导免疫抑制, 并可用来治疗移植排斥、移植物对宿主的疾病、自免疫性疾病、炎症、成人 T-细胞白血病/淋巴



瘤、实体肿瘤、真菌感染、心血管疾病、脑血管疾病、末梢血管疾病或血管过度增殖疾病等。本发明的这种化合物也可称为雷怕霉素的聚乙二醇化的羟基酯类。

本发明的化合物(A)和(B)中,以下的这些是个别地举出的实例,以任何组合或所有的组合:

R<sup>2</sup>可以是例如氢。

b和d值例如可以独立地是0或1;例如b是0并且d是1;优选二者均为零。

f值的实例是1-4,例如1-2,优选f值为1。

R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>可以是氢或含1-6个碳原子的烷基,优选氢。

R<sup>7</sup>可以是例如氢、含1-6个碳原子的烷基、含2-7个碳原子的烯基、含2-7个碳原子的炔基或-CF<sub>3</sub>;例如氢或含1-4个碳原子的烷基。

R<sup>8</sup>和R<sup>9</sup>可以是例如氢或-(CR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>)<sub>f</sub>OR<sup>10</sup>。

其中当多于一个R<sup>10</sup>=-COCH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-(O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OCH<sub>3</sub>基存在时,它们可以是相同或不相同的。优选有一个或两个这样的基团存在。

n值的实例范围在5-400之间,诸如5-350或5-300,例如在约65-155范围内。

当可应用时,药物上可接受的盐类在雷怕霉素包含一个合适的酸性部份时,可以由有机或无机碱类来形成(即,当化合物含有游离的羟基时),诸如碱金属盐类、(例如钠、锂或钾)碱土金属盐类、铵盐、含有1-6个碳原子的烷基铵盐或在每个烷基中含有1-6个碳原子的二烷基铵盐以及在每个烷基中含有1-6个碳原子的三烷基铵盐。

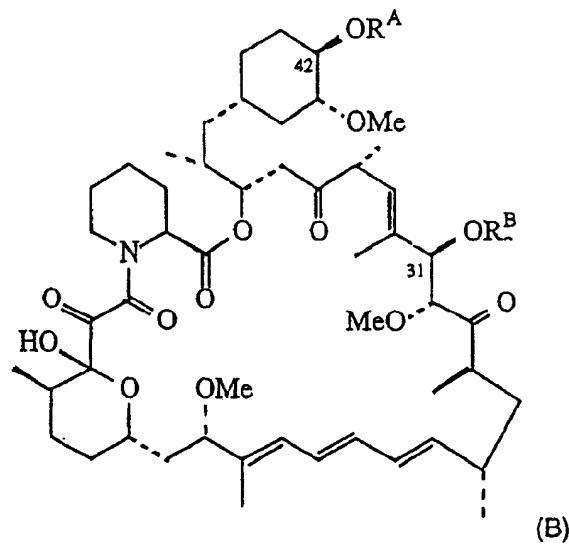
如本发明中所使用的那样,术语“提供”是指提供一种本发明所涵盖的化合物或物质,它或者是意指直接眼用这样的化合物或物质,或者是眼用一种药物前体、衍生物或类似物,后者在体内将会形成有效剂量的上述化合物或物质。

在本发明涵盖的雷怕霉素的聚乙二醇化的羟基酯类中,优选雷怕霉素的羟基酯是CCI-779,其中3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸部份中的一个或者两个羟基被聚乙二醇化。在本发明的化合物中,优选n值=5-200;更优选n=8-135。最优的成员是其中的n值=8-20和那些其中n=90-120的。n值指示出PEG侧链中重复的乙氧单位的范围。例如,当化合物被描述为其n=5-200时,它意指这化合物是由如下一

些化合物的混合物所组成，这些化合物在  $n=5$  和  $n=200$  之间呈现正态分布，在近似  $n=100$  处具有最大的频率。以化合物 III 和 IV 为例，其平均的  $n$  值为 108，并且  $n$  值中 99% 是在 65 和 155 之间。本发明的这些化合物也可以用基于产生它们的酯侧链的聚乙二醇链的平均分子量来描述和理解。例如，CCI-779-PEG 5000 酯是指这样一种具有上述通式的化合物，其中一个侧链 PEG 酯是利用平均分子量在 5000 范围内或接近 5000 范围内的聚乙二醇衍生物来形成的；而 CCI-779-(PEG 5000)<sub>2</sub> 酯则是指这样一种具有上述通式的化合物。在它的两个侧链 PEG 酯部份是利用平均分子量在 5000 或接近 5000 范围内的聚乙二醇衍生物来形成的。

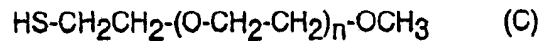
术语“烷基”、“烯基”和“炔基”包括直链的和带叉链碳链两者。烷基可含有 1-6 个、例如 1-4 个碳原子，例如甲基、乙基、丙基和叔丁基。烯基和炔基可包含 2-7 碳原子，例如 2-5 个碳原子诸如乙烯基、丙烯基或乙炔基。

本发明也提供一种制备式 (A) 化合物的方法，它包括把具有下式 (B) 的化合物：



其中 R<sup>A</sup> 是前面定义的 R<sup>1</sup>，并且其中 R<sup>B</sup> 是前面定义的 R<sup>2</sup>，其中 R<sup>10</sup> 与式 (A) 中所定义的相关，条件是至少一个 R<sup>10</sup> 基代表 -COCH<sub>2</sub>-X，其中 X 是一个适当的离去基团；

与具有下式 (C) 的化合物进行反应：



式 (C) 中的  $n$  值的定义与前面相同, 如果需要任何活泼的取代基可被保护, 并在需要时除去任何保护基以给出式 (A) 化合物或它的药物上可接受的盐。

5 式 (B) 化合物也形成本发明的另一个方面。

用于本发明化合物制备中的试剂可以是市售的, 也可以用文献中已叙述的标准操作程序来制备。

由它可制得聚乙二醇化的羟基酯的雷帕霉素的羟基酯的制备方法被描述于 USP 5, 362, 718 和 WO 95/28406 中, 它们在此引入作为参考。  
10 方便地, 一种或多种羟基酯可用具有一般结构  $\text{X-CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  的酰化试剂来酰基化, 其中  $\text{X}$  是诸如溴或碘这类合适的离去基团, 反应是在碱性催化剂诸如二甲胺基吡啶 (DMAP) 存在时, 在一种偶联剂诸如二环己基碳二亚胺 (DCC) 存在的条件下进行的。按此, 雷帕霉素 42 位羟基与  
15 3-羟基-2-(2-碘乙酰氧甲基)-2-甲基丙酸形成的酯 (化合物 I) 以及雷帕霉素 42 位羟基与 3-(2-碘-乙酰氧基)-2-(2-碘-乙酰氧甲基)-2-甲基-丙酸形成的酯 (化合物 II) 是用这种方法学制备的中间体, 它们分别用于生产相应的聚乙二醇化的雷帕霉素的羟基酯类 (分别得到化合物 III 和 IV)。

聚乙二醇化的酯类可方便地利用本领域已知的聚乙二醇来产生,  
20 诸如那些被描述于 "The Handbook of Pharmaceutical Excipients" 第二版 (1994) 第 355 至 361 页中的。本发明优选的化合物也可被描述为上式中用平均分子量为约 200 至约 200,000 的聚乙二醇酯化的那些化合物。本发明的 PEG 酯类的优选范围包括那些酯链中聚乙二醇部份的分子量在约 300 至约 20,000 范围内的, 更优选分子量在约 350 至  
25 约 6,000 之间的。已用上述方法酰化的雷帕霉素的羟基酯与合适的聚乙二醇硫醇、在一种碱酸氢钠存在的条件下发生反应即提供所需的聚乙二醇化的雷帕霉素的羟基酯。

本发明的这些化合物的抗肿瘤活性, 可通过用 CCI-779-PEG-5000 酯 (化合物 III) 和 CCI-779-(PEG5000) 酯 (化合物 IV) 作为本发明的  
30 的代表性化合物, 用标准的药理试验操作程序来证实, 该试验可测量对 U87MG 人类恶性胶质瘤细胞生长的抑制情况。以下简要地描述了所用的操

作程序和获得的结果。U87MG 人类恶性胶质瘤细胞 (ATCC#HTB14; 可从 10801 University Boulevard; Manassas, VA 20110; American Type Culture Collection 买到) 在以下介质中生长:

生长介质: 带 Earle 盐类的 BRL 最小必需介质 (500 毫升)

- 5        +5 毫升 BRL MEM 非必需的氨基酸 (10mM)  
           +5 毫升 BRL 青霉素-链霉素 (10000 国际单位/毫升, 10000 微克/毫升)  
           +5 毫升 BRL 丙酮酸钠溶液 (100mM)  
           +5 毫升 BRL L-谷氨酰胺 (200mM)  
 10        +50 毫升 BRL 小牛血清 (合格品)

试验操作程序:

1. 将细胞胰蛋白酶化并在 96 池的平底池板上布板, 使每个小池中细胞浓度为  $10^4$ /池, 并使之在 200 微升最终体积的介质中生长, 布板在 37°C 允许粘附 24 小时。
- 15        2. 小心地通过抽吸除去介质而不要扰动单细胞层。在每个池中加入 200 微升新鲜的介质, 允许有足够多的池被点样以便一式三份地进行试验。被试验的化合物被加到 10 微升磷酸盐缓冲溶液中 (PBS) 并在 37°C 孵育另外 48 小时。
3. 在孵育的最后 5 小时期间, 池板的每个小池用 1 微居里  $^3\text{H}$  胸腺嘧啶脱氧核苷标记 (New England Nuclear thymidine, Catalog# NET-027, 6.7 居里/毫摩尔)。1 微居里被加进 10 微升 PBS 中 (在采集试样那天)。池板被放回孵育器中孵育最后的 5 小时。
- 20        4. 通过抽吸除去带放射活性的介质, 小心不要扰动单细胞层。然后往每个小池中加入 50 微升 BRL10 $\times$  胰蛋白酶, 接着在 37°C 孵育 10  
 25        分钟或直到单细胞层从池底松脱。用 Skatron 96 池采集器把试样采集在玻璃纤维簇上。纤维簇在 Wallac Betaplate 计数器中计数。

结果:

<u>化合物</u>	<u>IC<sub>50</sub></u>
CCI-779	0.6 纳克/毫升
化合物 III	1.0 纳克/毫升
化合物 IV	4.0 纳克/毫升

\*注: CCI-779 的纳克/毫升当量

在这种标准的药理试验操作程序中得到的结果显示，本发明的化合物抑制肿瘤细胞生长，因而可以用作抗肿瘤剂。具体地说，本发明的化合物可用来治疗或抑制实体肿瘤的生长，包括肉瘤和癌，诸如星形细胞瘤、前列腺癌、乳腺癌、小细胞肺癌和卵巢癌。

- 5 本发明的化合物也可用来治疗或抑制移植排斥作用，诸如肾、心脏、肝、肺、骨髓、胰腺（小岛细胞）、角膜、小肠等的移植、皮肤同种移植、心脏瓣膜异种移植等；并可用来治疗或抑制移植对宿主造成的疾病；以及用来治疗或抑制自免疫性疾病诸如狼疮、类风湿性关节炎、糖尿病、重度肌无力、和多发性硬化症；以及炎症诸如牛皮癣、皮炎、湿疹、皮脂溢性皮炎、肠炎、肺炎（包括哮喘、慢性阻塞性肺病、肺气肿、急性呼吸窘迫综合症、支气管炎等）和眼色素层炎症；
- 10 成人 T-细胞白血病/淋巴瘤；真菌感染；血管过度增殖疾病瓣再狭窄、移植血管动脉粥样硬化；以及心血管疾病、脑血管疾病、末梢血管疾病，冠状动脉疾病、脑血管疾病、动脉粥样硬化、非动脉粥样硬化性的动脉硬化症、或由于细胞活动造成的血管壁损伤与致免疫间介的血管损伤，以及用来抑制中风或多发性梗死痴呆症。

当用于心瓣再狭窄时，优选本发明化合物是被用来治疗血管成形术操作后发生的心瓣再狭窄，本发明的化合物可以在操作之前，操作过程或操作以后服用，或任何上述的组合。

- 20 本发明也涵盖了本领域已知的其它雷帕霉素的类似的聚乙二醇化的羟基酯、诸如，但不限于 29 位去甲氧基雷帕霉素 [USP 4, 375, 464, 在 C. A 命名法中被称为 32 位去甲氧基雷帕霉素]；雷帕霉素的衍生物，其中 1-、3-、和/或 5 位的双键已被还原 [USP 5, 023, 262]；29 位去甲基雷帕霉素 [USP 5, 093, 339, 在 C. A 命名法中被称为 32 位去甲基雷帕霉素]；7, 29-双去甲基雷帕霉素 [USP 5, 093, 338, 在 C. A 命名法中被称为 7, 32-去甲基雷帕霉素]；27-羟基雷帕霉素 [USP 5, 256, 790] 和 15-羟基雷帕霉 [USP 5, 102, 876]。本发明也涵盖 42-氧代雷帕霉素的 31 位酯 [USP 5, 023, 263]。上面引证的美国专利中的公开内容均在此引入作为参考。

- 30 当为了治疗或抑制一种具体的疾病状态或障碍时，应该理解雷帕霉素的聚乙二醇化的羟基酯的有效剂量可能依赖于所使用的特定化合物、服药的方式、症状及其严重程度、被治疗的症状以及有关被治疗

个体的各种物理因素而变化。如按照本发明使用，当雷帕霉素的聚乙二醇化的羟基酯每日口服剂量约为设计的活性化合物的每日剂量，即0.1 微克/公斤体重-100 毫克/公斤体重、优选 0.001-25 毫克/公斤体重、更优选 0.01-5 毫克/公斤体重时，可获得满意的结果。设计的每日剂量预期会随着给药途径而变化。

这样的剂量可以任何有用的能把活性化合物导入受体血流中的方法来给药，包括口服、经过移植物、非肠道给药（包括静脉注射、腹膜内注射和皮下注射）、直肠给药、鼻内给药、阴道给药和经皮给药。本发明的聚乙二醇化的佛类提供比没有聚乙二醇化的雷帕霉素的酯类要好的容易配方和给药方面的优点，因为它们比相应的没有聚乙二醇化的酯类具有明显更大的水溶性。例如，化合物 3 和 4 二者的水溶解度均>100 毫克/毫升，而 CCI-779 的水溶解度则<1.1 微克/毫升。这一优点对于口服和非肠道给药特别重要。

含有本发明活性化合物的口服配方可以包括任何普通使用的口服剂型，包括片剂、胶囊剂、颊型、糖锭剂、锭剂、以及口服的液体、悬浮液或溶液。胶囊剂可含有活性化合物与惰性填料和/或稀释剂的混合物，诸如药物上可接受的淀粉（例如玉米淀粉、土豆粉或木薯淀粉）、糖类、人造甜味剂、粉状纤维素、诸如结晶的和微晶纤维素、面粉、明胶、树脂等。有用的片剂配方可以通过普通的压缩、湿造粒、或干造粒方法来制造，并利用药物上可接受的稀释剂、粘合剂、润滑剂、崩解剂、表面修饰剂（包括表面活性剂）、悬浮剂或稳定剂，包括，但不限于，硬脂酸镁、硬脂酸、滑石、月桂基硫酸钠、微晶纤维素、羧甲基纤维素钙、聚乙烯基吡咯烷酮、明胶、藻酸、阿拉伯胶、黄原胶、柠檬酸钠、复合的硅酸盐、碳酸钙、甘氨酸、糊精、蔗糖、山梨糖醇、磷酸二钙、硫酸钙、乳糖、高岭土、甘露糖醇、氯化钠、滑石、干淀粉和粉状的糖。优选的表面修饰剂包括非离子和阴离子表面修饰剂。表面修饰剂的有代表性的实例包括，但不限于，poloxamer 188、benzalkonium chloride、硬脂酸钙、十六醇十八醇混合物、聚乙二醇单醋醚乳化的蜡、脱水山梨糖醇酯类、胶体二氧化硅、磷酸盐、十二烷基硫酸钠、铝硅酸镁、和三乙醇胺。这里的口服配方可利用标准的延迟或随时释出配方来改变活性化合物的吸收。这种口服配方也可由服用在水中或果汁中的活性组份来组成，如需要时可包含适当的

助溶剂或乳化剂。

在某些情况下可能需要以气溶胶的形式直接经气道服用这些化合物。

5 本发明的化合物也可以不经肠道或腹膜内服用。以游离碱或药物上可接受的盐的形式的这些活性化合物的溶液或悬浮液可以在适当地混有表面活性剂诸如羟丙基纤维素的水中制备。分散液也可以在甘油、液体聚乙二醇和它在油类中形成的混合物中制备。在普通的贮存和使用条件下，这些制剂含有保存剂以防止微生物的生长。

10 适合于注射使用的药物形式包括无菌的水溶液或分散液以及供无菌注射溶液或分散液现场制备用的无菌粉末。在所有情况下，这些形式必须是无菌的并且必须是液体且以容易供注射的程度存在。它们在制造和贮存条件下必须是稳定的并且必须能被贮存而不会受到微生物诸如细菌和真菌的感染。载体可以是溶剂或含有例如水、乙醇、多元醇（例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇）的分散介质、它们的合适的  
15 混合物以及植物油。

为本公开内容的目的，经皮给药应被理解为包括所有经过身体表面以及身体通道的内部衬里的给药方式，包括经上皮和粘膜组织给药。这类给药方式可用本发明化合物或其药物上可接受的盐类制成的  
20 洗剂、乳膏、泡沫剂、膏药、悬浮液、溶液和栓剂（供直肠和阴道用）等来实施。

经皮给药可通过使用含有这种活性化合物和对于化合物是惰性的载体的经皮膏药来完成，载体对皮肤是无毒的，并能让试剂系统地经过皮肤被吸收而进入血流中。这种载体可以取任何数目的形式，诸如乳膏、软膏、糊剂、凝胶、以及封闭装置。乳膏和软膏可以是粘稠的  
25 液体或半固体的乳液，既可以是水包油型的，也可是油包水型的。含有分散在矿脂或亲水性矿脂中的可吸收的粉末，其中含有活性组份的糊剂也是合适的。各种封闭装置可用来把活性组份释出并进入血流中，诸如复盖在含有活性组份、有或没有载体的贮器上的半透膜或包含这种活性组份的基质。其它封闭装置在文献中是已知的。

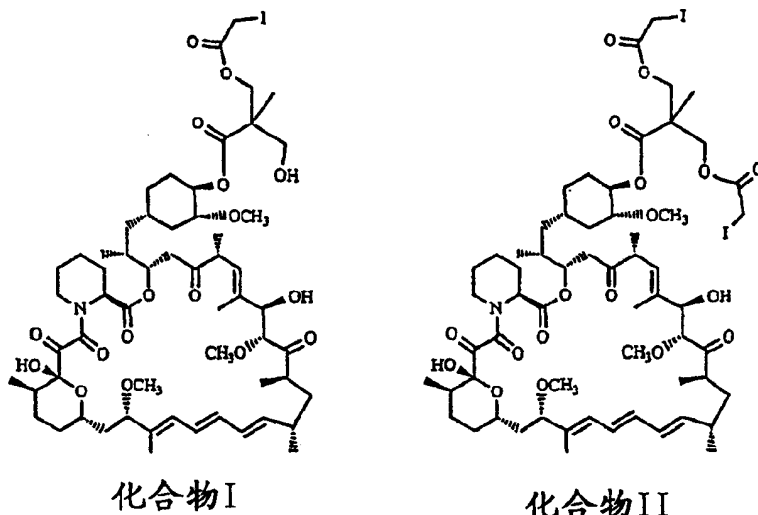
30 栓剂配方可用传统材料制得，包括可可油、添加或者不添加蜡来改变栓剂的熔点，以及甘油。也可以使用诸如具有各种分子量的聚乙二醇的水溶性栓剂基质。

本发明的有代表性的实例的制备被描述如下。

### 实施例 1

雷怕霉素 42 位羟基与 3-羟基-2-(2-碘-乙酰氧甲基)-2-甲基丙酸形成的酯(化合物 I)以及雷怕霉素 42 位羟基与 3-(2-碘乙酰氧基)-2-(2-碘乙酰氧甲基)-2-甲基丙酸形成的酯(化合物 II)

5



在 250 毫升圆底烧瓶中把 CCI-779 (1.03 克,  $1.0 \times 10^{-3}$  摩尔)、4-二甲氨基吡啶 (3.0 毫克) 和 1,3-二环己基碳二亚胺 (0.136 克,  $6.6 \times 10^{-4}$  摩尔) 溶解在 50 毫升无水二氯甲烷中。把碘乙酸 (0.185 克,  $1.0 \times 10^{-3}$  摩尔) 溶解在 10 毫升无水二氯甲烷中。在 10 分钟内通过磁性搅拌器搅拌把碘乙酸溶液加入到反应混合物中。然后把反应混合物在室温下搅拌另外 2.5 小时, 通过滤纸把溶液过滤。滤液转移到分液漏斗中, 用 50 毫升碳酸氢钠溶液 (5.5 克/100 毫升) 洗涤, 再用  $2 \times 50$  毫升水洗涤。把二氯甲烷层用 10 克无水硫酸钠干燥 2 小时。然后滤出硫酸钠, 并在旋转蒸发器上除去二氯甲烷。共得到 0.93 克黄色固体。纯净的化合物 I 和化合物 II 的析离是通过用 Waters 公司的 Prep Nova-pak HR C18 (300 $\times$ 19 毫米) 柱用制备性高压液相层析法来实施的。用梯度洗脱 (30%A、70%B 洗脱 5 分钟, 然后用 100%B 洗脱 30 分钟) 时化合物 I 在 18.4 分钟时被洗脱, 化合物 II 在 24.4 分钟时被洗脱。A 是 90%水和 10%乙腈; B 是 10%水, 90%乙腈。收集相应的馏份并用  $2 \times 100$  毫升二氯甲烷提取。汇合有机层并且无水硫酸钠干燥 4 小

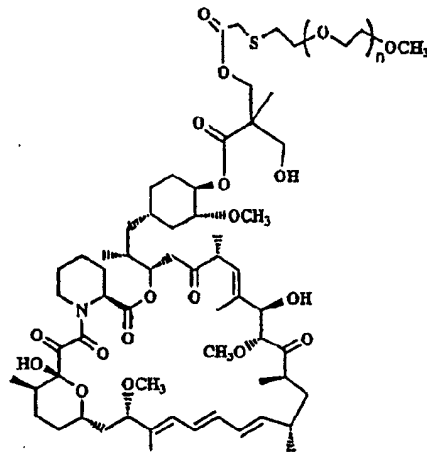
20



时。通过旋转蒸发器除去有机溶剂至干。获得的化合物 I 为黄色固体 (0.14 克)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 3.68 (单峰, 2H, I-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-), 4.28 (dd 四重峰, 2H, -CO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)。MS m/z 1215.8 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>。化合物 II 得到的也是黄色固体 (0.08 克)。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 3.72 (单峰, 4H, 两个 I-CH<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>-), 4.28 (dd 四重峰, 4H, 两个 -CO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), MS m/z 1383.6 (M+NH<sub>4</sub>)<sup>+</sup>。

### 实施例 2

#### CCI-779-PEG 5000-雷帕霉素 42 位羟基与 3-羟基-2-(羟甲基)-2-甲基丙酸甲氧基聚(乙二醇)硫醇 5000 结合物形成的酯 (化合物 III) 的制备



CCI-779-PEG 5000  
(化合物 III)

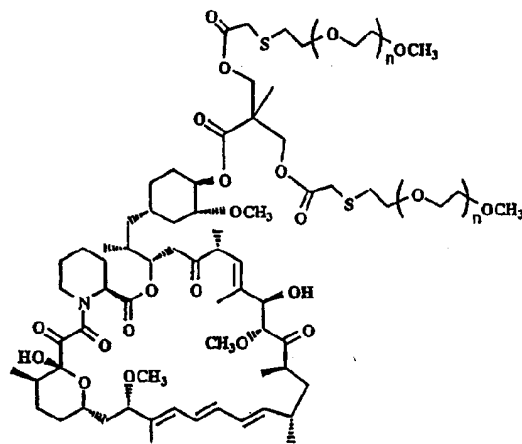
n 平均值=108

把化合物 I (90 毫克,  $7.6 \times 10^{-5}$  摩尔) 溶解在含有 50% 乙腈和 50% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (0.1M) 所形成的溶液中。溶液用 N<sub>2</sub> 气吹洗 10 分钟。取原始试样 10 微升用于高压液相色谱分析。然后往反应溶液中加入的 PEG-SH 5000 (450 毫克,  $9.1 \times 10^{-5}$  摩尔) 并把反应混合物在室温搅拌另外 45 分钟。再取 10 微升试样进行高压液相色谱分析来校核反应进行情况。色谱分析表明化合物 I 已经 100% 转化为化合物 III。反应混合物用  $2 \times 100$  毫升二氯甲烷提取。有机层用无水硫酸钠干燥后过滤。滤液通过旋转蒸发浓缩至体积为 20 毫升。加入 150 毫升醚以沉淀

出粗产物。用烧结的玻璃砂漏斗过滤后得到 404 毫克白色粉末，将它在真空下干燥。纯化合物 III，也可被称之为 CCI-779-PEG-5000，的析离是通过在 Waters 公司出售的 Prep Nova-pak HR C18 (300 × 19 毫米) 色谱柱上进行制备性高压液相色谱来实施的。用梯度洗脱 (60%A, 40%B 洗脱 5 分钟，然后用 20%A, 80%B 洗脱 30 分钟) 时化合物 III 在 18 分钟时被洗脱。收集相应馏份并用 2 × 100 毫升二氯甲烷提取。汇合有机层并用无水硫酸钠干燥 4 小时。通过旋转蒸发除去有机溶剂至干。残余物溶解在 5 毫升二氯甲烷中并通过加入 150 毫升醚沉淀出产物。用烧结的玻璃砂漏斗滤出后获得白色粉末，把它在真空下干燥。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 2.83 (三重峰, 2H, -S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.30 (单峰, 2H, -COCH<sub>2</sub>-S), 3.38 (单峰, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 4.25 (dd 四重峰, 2H, -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)。MS (MALD/TOF) m/z 5894.5 (平均分子量) 这表明化合物 III 中平均 n 值=108, 其中 99% 的 n 值在 65 和 155 之间。

### 实施例 3

15 CCI-779-(PEG 5000)<sub>2</sub>-雷帕霉素 42 位羟基与 3-羟基-2 (羟甲基)-2-甲基丙酸双 (甲氧基聚 (乙二醇) 硫醇 5000) 结合物所形成的酯 (化合物 IV)



CCI-779-(PEG 5000)<sub>2</sub>  
(化合物 IV)

n 平均值=108

20 把化合物 II (50 毫克,  $3.6 \times 10^{-5}$  摩尔) 溶解在 30 毫升由含有 50%

乙腈和 50% NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (0.1M) 所组成的溶液中。溶液用 N<sub>2</sub> 气吹洗 10 分钟。取原始试样 10 微升作高压液相色谱分析。然后往反应溶液中加入 mPEG-SH 5000 (500 毫克,  $1.0 \times 10^{-4}$  摩尔) 并将反应溶液在室温搅拌大约 70 分钟。再次取出 10 微升试样作高压液相层析以校核反应进行情况。色谱显示化合物 II 已经 100% 转化为化合物 IV。反应混合物用 2 × 50 毫升二氯甲烷提取。有机层用无水硫酸钠干燥后过滤。滤液通过旋转蒸发浓缩到剩下 10 毫升体积。加入 150 毫升醚沉淀出粗产物。用烧结的玻璃砂漏斗滤出沉淀并在真空下干燥后得到 500 毫克白色粉末。纯化合物 IV, 它也可被称为 CCI-779-(PEG 5000)<sub>n</sub>, 的析离是通过用 Waters 公司出售的 Prep Nova-pak HR C18 (300 × 19 毫米) 色谱柱进行制备性高压液相色谱来实施的。在用梯度洗脱时 (60%A, 40%B 洗脱 5 分钟, 然后用 20%A, 80%B 洗脱 30 分钟) 化合物 IV 在 22 分钟时被洗脱。收集这一馏份并用 2 × 100 毫升二氯甲烷提取两次。汇合有机层并用无水硫酸钠干燥 4 小时。通过旋转蒸发除去有机溶剂至干。残余物溶解在 5 毫升二氯甲烷中并通过加入 150 毫升乙醚而沉淀出来。用烧结的玻璃砂漏斗滤出并在真空下干燥后即获得白色粉末。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 2.81 (三重峰, 4H, 两个 S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-), 3.29 (单峰, 4H, 两个 -CO-CH<sub>2</sub>-S-), 3.38 (单峰, 6H, 两个 -OCH<sub>3</sub>), 4.26 (dd 四重峰, 4H, 两个 -CO<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-)。MS (MALD/TOF) m/z 10760.7 (平均分子量), 这指示化合物 IV 中平均的 n 值为 108, 其中 99% 的 n 值在 65 至 155 之间。

25