

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 31/59 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00815823.1

[45] 授权公告日 2010 年 1 月 6 日

[11] 授权公告号 CN 100577172C

[22] 申请日 2000.10.20 [21] 申请号 00815823.1

[30] 优先权

[32] 1999.10.20 [33] KR [31] 1999/45623

[86] 国际申请 PCT/KR2000/001188 2000.10.20

[87] 国际公布 WO2001/028564 英 2001.4.26

[85] 进入国家阶段日期 2002.5.17

[73] 专利权人 株式会社 柳柳

地址 韩国京畿道

[72] 发明人 姜胜安 李京姬 郭忠实 金昌种
李龙五

[56] 参考文献

US4621077A 1986.11.4

JP7-330613A 1995.12.19

CN1181008A 1998.5.6

WO9902539A1 1999.1.21

审查员 曹 维

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 34 页 附图 11 页

[54] 发明名称

用于治疗代谢性骨疾病的药物组合物及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于治疗代谢性骨疾病的药物组合物及其制备方法，特别涉及一种用于治疗代谢性疾病的改良的药物组合物及其制备方法，其中所述的组合物被制成一种复合药剂，该药剂含有作为两种主要活性成分的以能够产生最大协同治疗作用的最佳混合比例混合的骨化三醇(它能够减少脊柱骨折率和增加骨密度)和阿仑特罗(一种骨吸收抑制剂)，以及适量的其他添加剂，例如一种阿仑特罗的吸收增强剂。因此，按照本发明的药物组合物，可以抑制当单独给予骨化三醇时引起的血钙过多，由于骨化三醇的存在可以补偿由阿仑特罗引起的对骨质重建活性的抑制，并且可以改善与通常的给药困难以及食道中的副作用有关的药物依从性。因此，有效地预防了骨质疏松症的发生。

1. 用于治疗代谢性骨病的药物组合物，其包括骨化三醇颗粒和阿仑特罗颗粒的混合物，其中

(i) 所述骨化三醇颗粒通过向骨化三醇和乙醇的混合物中添加甘露糖醇，然后向上述的混合物中添加乙醇、抗氧化剂和粘合剂，将上述混合物粉碎成 14 - 35 目大小的颗粒并干燥上述的粉碎混合物的一系列步骤获得；以及

(ii) 所述阿仑特罗颗粒通过混合甘露糖醇、吸收增强剂和阿仑特罗，然后向上述的混合物中添加乙醇和粘合剂，将上述混合物粉碎成 14 - 35 目大小并干燥上述的粉碎混合物的一系列步骤获得；

其中所述的组合物中包含每 1 重量份的骨化三醇 1,000-50,000 重量份的阿仑特罗；所述赋形剂是甘露醇，其占组合物总重量的 70-97wt%，并且其中总甘露醇的 52-60wt% 包含在所述骨化三醇颗粒内，总甘露醇的 40-48wt% 包含在所述阿仑特罗颗粒中，其中所述组合物还包括占药物组合物总重 0.001-10 wt% 的抗氧化剂、0.1-20 wt% 的粘合剂、0.01-10 wt% 的吸收增强剂、0.1-20 wt% 的崩解剂、0.1-20 wt% 的润滑剂。

2. 按照权利要求 1 的用于治疗代谢性骨病的药物组合物，其中所述代谢性骨疾病包括：骨质疏松症、佩吉特病、脊柱炎、骨软化症、肾性骨营养不良、甲状旁腺机能亢进和甲状旁腺功能减退。

3. 按照权利要求 1 的用于治疗代谢性骨病的药物组合物，其中所述组合物被制备成裸片、肠溶片、颗粒剂和胶囊的形式。

4. 按照权利要求 1 的用于治疗代谢性骨病的药物组合物，其中所述组合物每剂量单位含有 0.1 - 5.0 μg 骨化三醇和 1 - 50 mg 阿仑特罗。

5. 按照权利要求 1 的用于治疗代谢性骨病的药物组合物，其中作

为一种吸收增强剂使用的添加剂为十二烷基硫酸钠,它占药物组合物总重量的 0.01~10 重量%。

6. 一种含有骨化三醇和阿仑特罗作为活性成分的用于治疗代谢性骨病的药物组合物的制备方法,其中所述方法包括:

a)通过一系列步骤获得骨化三醇颗粒的方法,该步骤由向骨化三醇和乙醇的混合物中添加甘露醇;向上述混合物中添加乙醇、抗氧化剂和粘合剂;将上述混合物粉碎成 14-35 目大小的颗粒并干燥上述粉碎混合物组成;

b)通过一系列步骤获得阿仑特罗颗粒的方法,该步骤由将甘露醇、吸收增强剂和阿仑特罗混合;向上述混合物中添加乙醇和一种粘合剂;将上述混合物粉碎成 14-35 目大小并干燥上述粉碎混合物组成;

c)一种按 1:1 重量份的混合比例混合从步骤 a) 中获得的骨化三醇颗粒和从步骤 b) 中获得的阿仑特罗颗粒,然后向上述混合物中添加崩解剂和润滑剂,最后将所得混合物压片的方法,

其中所述组合物中含有每一重量份的骨化三醇 1000-50000 重量份的阿仑特罗;其中包含的所述甘露醇的量为总组合物的 70-97 wt%;总甘露醇的 52-60wt%包含于所述骨化三醇颗粒内,40-48wt%包含于所述阿仑特罗颗粒内;其中所述抗氧化剂选自以下的一种或几种:丁基化羟基甲苯、丁基化羟基甲苯醚、DL- α -生育酚和卵磷脂,并且所述抗氧化剂的量占总药物组合物的 0.001-10wt%;其中所述粘合剂选自吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素和羧甲基纤维素钠,粘合剂占药物组合物总量的 0.1-20wt%;

其中所述吸收增强剂是十二烷基硫酸钠,并且其占药物组合物总量的 0.01-10wt%;

其中所述崩解剂选自交联羧甲基纤维素钠、低级取代的羟丙基纤维素和羧甲基纤维素钙,其占药物组合物总量的 0.1-20wt%;

其中所述润滑剂选自硬脂酸钙、硬脂酸镁和滑石,其占药物组合物总量的 0.1-20wt%。

用于治疗代谢性骨疾病的药物组合物及其制备方法

本发明的背景技术

本发明的技术领域

本发明涉及一种用于治疗代谢性骨疾病的复合药物组合物及其制备方法，其中所述的组合物被制成一种含有骨化三醇、阿仑特罗和适量其他添加剂的复合药剂。按照本发明的药物组合物，可以抑制当单独给予骨化三醇时引起的血钙过多，由于骨化三醇的存在可以补偿由阿仑特罗引起的对骨质重建活性的抑制，并且还可以改善药物的依从性。因此，有效地预防了骨质疏松症的发生。

相关领域的说明

骨质疏松症是一种全身性代谢性骨疾病，其特征是在不影响骨本身化学组成的情况下发生骨质量减少和骨中微结构改变，它导致骨折的易感性增加。特别是，已知老年患者更易受骨折的伤害，这通常发生于甚至是较小的身体震动；事实上，已知在美国两千五百万骨质疏松症患者中，每年有将近一百三十万的患者经受骨折的痛苦，此数量几乎占美国人口总数的 10 %。

骨质疏松症可以分成 I 型和 II 型。I 型骨质疏松症更频繁地发生于绝经后的妇女中，并且特点是由于雌激素的缺乏而导致骨吸收显著增加。由于雌激素缺乏导致的骨吸收增加是非常显著的。可以很经常地观察到 I 型骨质疏松症的患者丢失骨小梁并由此导致脊柱或腕的频繁骨折。同时，II 型骨质疏松症通常发生于老年人或男性，并且以骨质重建能力急剧下降而不是骨吸收增加为特点。但是，已知：由破骨细胞所致的骨吸收增加以及钙吸收下降，是两种类型的骨质疏松症所共同的。

在临床领域中治疗骨质疏松症所用的治疗剂通常被分为两组；一组

能够促进骨质重建，而另一组能够防止骨吸收。能够促进快速骨质重建的活性治疗剂的实例包括合成代谢的类固醇、氟化物、维生素 D 和甲状旁腺激素。随着目前骨生成机理的引入，由于维生素 D 衍生物在调节骨质平衡方面的作用，它已经成为公众关注的对象。骨化三醇，用 $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ 表示的活性维生素 D_3 之一，是一种上述的骨质重建激活剂，并且还是一种能够预防骨质疏松症的激素，原因是它不仅能够增加钙从肠道中的吸收，而且还能够抑制骨质量的下降。但是，骨化三醇还显示：当单独使用时引起血钙过多。血钙过多，是一种代谢性疾病，它的特点是血中血浆钙的浓度为 11.0 mg/dL 或者更高，是最常见的与致死性疾病例如肿瘤紧密相关的威胁生命的疾病之一。事实上，骨化三醇通过骨代谢导致血钙浓度的增加以及非正常的钙浓度调节，因而产生血钙过多。由于骨化三醇的副作用和维生素 D 的过量所致的血钙过多或钙成瘾（长时间血钙过多的严重情况）的症状，与血钙过多中所显示的症状非常相似。血钙过多偶而会出现例如食欲不振、头痛、呕吐、便秘的急性症状和包括营养不良、感觉异常、发热口渴、多尿症（hyperuriosis）、脱水、倦怠、生长迟缓，尿路感染等的血钙过多的慢性症状。血钙过多的患者经常出现并发症，这增加了治疗疾病例如骨质疏松症的困难。

在治疗骨质疏松症中作为骨吸收抑制剂使用的常规药剂包括雌激素、降钙素、二膦酸盐和异丙氧黄酮。日本专利公开说明书 No. 7-330613 公开了一种骨质重建激活剂，它含有阿仑特罗（一种二膦酸盐）作为一种活性剂，在二羟基维生素 D_3 的存在下，它可以激活成骨细胞的钙化以及骨基质的形成。

欧洲专利公开说明书 No. 88-4628 公开了一种用于口服给药的药剂，此药剂用二膦酸盐作为一种基质，并且含有适量的十二烷基硫酸钠。

美国专利 No. 125,372 公开了含有二膦酸盐的肠溶片。

但是，上述骨吸收抑制剂还没有成功地足以提高已经患有骨质疏松症患者的骨质量，因此，开发非常有效的骨质重建激活剂一直是长期企

盼的需要。

一篇近来的意大利报道公开了一种联合给予阿仑特罗和骨化三醇的方法 [Clinical Drug Investigation(临床药物研究)(1988) 3月, 15(3), 235-244]。在此报道中, 阿仑特罗和骨化三醇不是作为一种复合片给药, 只是单独给药。例如, 阿仑特罗一天给药一次, 而骨化三醇一天给药两次, 在每次给药之间有一定的时间间隔。而且, 阿仑特罗必须在餐前给药, 原因是当餐后给药时吸收不好, 导致药效显著下降。考虑到大多数骨质疏松症患者是老年人, 而且它们中的大多数还每天服用多种药物, 因此, 由于上述药物具有相当复杂的给药特点, 患者经常忘记服用一种或两种计划服用的药物也是情有可原, 所以上述给药的效果还存在疑问。

阿仑特罗还引起上消化道粘膜的局部刺激, 这常常导致食道中为数不多的副作用, 例如食道炎、食道溃疡、食道糜烂。因此, 对于患者来说, 当服用一种含有阿仑特罗的药物时, 必须饮用足够量的水, 以便使他们正服用的药物可以尽可能快地经过食道并使食道刺激保持在最低水平。而且对于药物依从性较低的患者, 这已经成为一种负担。

在 1997 年 1 月加拿大温哥华举行的“日本和美国青光眼协会”会议中, 宣布开发复合药剂的最终目的是提高药物的依从性。在 1998 年 2 月 4 日在芝加哥举行的“关于逆转录病毒和机会致病菌感染的第 5 次会议”中, 展示了: Combivir (一种含有药物机理彼此不同的拉米夫定和齐多夫定的复合药剂) 具有 96% 的疗效, 与当拉米夫定和齐多夫定作为一种独立的药物分别单独给药时所获得的 72% 的疗效相比, 有所提高。并且推测: 这种治疗效果提高的原因是患者对复合药剂药物依从性的提高。

在关于制备含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药片治疗骨质疏松症方面还没有进行过研究, 相反, 有许多研究思路集中在阿仑特罗作为一种治疗剂治疗由维生素 D 摄入引起的血钙过多的效果上。因此, 非常需要开发具有先进的配制技术的用于治疗骨质疏松症的复合药剂, 它不

仅能将例如血钙过多（当单独给予骨化三醇引起）的副作用降至最小，而且还能用小剂量预防/治疗骨质疏松症，并且通过改善相当复杂的给药途径和防止食道副作用的发生，提高了药物的依从性，此药物的依从性在常规的药物中通常是较低的。

本发明的总结

本发明涉及一种用于治疗代谢性骨疾病的药物组合物及其制备方法，特别涉及一种用于治疗代谢性疾病的改良的药物组合物及其制备方法，其中所述的组合物被制成一种复合药剂，该药剂含有(a)骨化三醇，它能够减少脊柱骨折率和增加骨密度；(b)阿仑特罗，一种骨吸收抑制剂，作为以能够产生最大治疗作用的最佳混合比例混合的活性成分，以及(c)适量的其他添加剂，例如阿仑特罗的吸收增强剂。因此，所得的药物组合物可以减少由骨化三醇引起的血钙过多，由于骨化三醇的存在可以补偿由阿仑特罗引起的对骨质重建活性的抑制，可以提高通常与由于给药困难和通常的食道中的副作用伴随的药物的依从性。因此，有效地预防了骨质疏松症的发生。

附图的简要说明

附图 1 显示了卵巢摘除术后给予阿仑特罗和骨化三醇两个月后胫骨骨小梁的显微镜视像 (x40)，阿仑特罗和骨化三醇或者单独给药或者作为两种成份联合给药。

附图 2 的图显示了通过使用图像分析仪观察到的骨小梁区域。

附图 3 的图显示了通过使用 Technicon 自动分析仪观察到的钙的浓度。

附图 4 的图显示了通过使用钙试剂盒 (Youngdong 药物有限公司，韩国) 观察到的尿中钙/肌酸酐的浓度。

附图 5 的图显示了通过一个使用 RIA 方法的试剂盒观察到的血清中骨钙蛋白的浓度。

附图 6 的图显示了通过使用 Technicon 自动分析仪观察到的碱性

磷酸酶的活性。

附图 7 的图显示了通过使用 Technicon 自动分析仪观察到的尿中 I 型胶原端肽 (NTx) 的浓度，I 型胶原端肽 (NTx) 被用作骨吸收率的一个指数。

对于附图 1-7 来说，A-F 代表进行如下治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的实验组。

A: 没有治疗

B: 单用赋形剂治疗

C: 单用骨化三醇 (0.1 µg/kg) 治疗

D: 单用阿仑特罗 (1.0 mg/kg) 治疗

E: 复合治疗 1 [骨化三醇 (0.1 µg/kg) + 阿仑特罗 (0.5 mg/kg)]

F: 复合治疗 2 [骨化三醇 (0.1 µg/kg) + 阿仑特罗 (1.0 mg/kg)]

G: 复合治疗 3 [骨化三醇 (0.1 µg/kg) + 阿仑特罗 (2.0 mg/kg)]

附图 8 的图显示了观察两周的用一种含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂口服治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的体重变化。

附图 9 的图显示了观察两周的用一种含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂口服治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的饮食摄入。

对于附图 8-9 来说，1-8 代表进行如下治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的实验组。

1: 骨化三醇 (125 µg/kg) + 阿仑特罗 (1250 mg/kg)

2: 骨化三醇 (100 µg/kg) + 阿仑特罗 (1000 mg/kg)

3: 骨化三醇 (75 µg/kg) + 阿仑特罗 (700 mg/kg)

4: 骨化三醇 (50 µg/kg) + 阿仑特罗 (500 mg/kg)

5: 骨化三醇 (25 µg/kg) + 阿仑特罗 (250 mg/kg)

6: 骨化三醇 (5 µg/kg) + 阿仑特罗 (50 mg/kg)

7: 骨化三醇 (1 µg/kg) + 阿仑特罗 (10 mg/kg)

8: 骨化三醇 (0.2 $\mu\text{g/kg}$) + 阿仑特罗 (2.0 mg/kg)

附图 10 的显微镜视像(H & E x100)显示了用一种含有 100 $\mu\text{g/kg}$ 骨化三醇和 1000 mg/kg 阿仑特罗的复合药剂口服治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的脾组织发现物的结果。

附图 11 的图显示了观察 7 周的用一种含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂口服治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的体重变化。

附图 12 的图显示了观察 7 周的用一种含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂口服治疗的 Sprague-Dawley 白色大鼠的饮食摄入。

对于附图 11-12 来说, 1-4 代表进行如下治疗的试验 Sprague-Dawley 白色大鼠的组。

1: 骨化三醇 (25 $\mu\text{g/kg}$) + 阿仑特罗 (250 mg/kg)

2: 骨化三醇 (5 $\mu\text{g/kg}$) + 阿仑特罗 (50 mg/kg)

3: 骨化三醇 (1 $\mu\text{g/kg}$) + 阿仑特罗 (10 mg/kg)

4: 骨化三醇 (0.2 $\mu\text{g/kg}$) + 阿仑特罗 (2 mg/kg)

本发明的详细描述

本发明涉及一种用于治疗代谢性骨疾病的药物组合物, 其特征是含有骨化三醇和阿仑特罗作为两种活性成分, 其中所述的组合物中每 1 重量份的骨化三醇含有 1,000 - 50,000 重量份的阿仑特罗。

本发明还涉及一种制备上述含有骨化三醇和阿仑特罗作为活性成分的药物组合物的方法, 该方法包括:

a) 一种获得骨化三醇颗粒的方法;

通过向骨化三醇和乙醇的混合物中添加甘露糖醇, 然后向上述的混合物中添加乙醇、抗氧化剂和粘合剂, 将上述混合物粉碎成 14 - 35 目大小并干燥上述的粉碎混合物完成;

b) 一种获得阿仑特罗颗粒的方法;

通过混合甘露糖醇、吸收增强剂和阿仑特罗，然后向上述的混合物中添加乙醇和粘合剂，将上述混合物粉碎成 14-35 目大小并干燥上述的粉碎混合物完成；

c) 一种制备药片的方法；

通过按 1: 1 重量份的混合比例混合从步骤 a) 中获得的骨化三醇颗粒和从步骤 b) 中获得的阿仑特罗颗粒，然后向上述的混合物中添加一种崩解剂和一种润滑剂并将所得的混合物压片完成。

通过下列的实施例对本发明进行更为详细地说明，但是这些实施例不应该被认为是对本发明范围的限制。

本发明涉及一种含有以最佳的混合比例混合的骨化三醇和阿仑特罗作为两种活性成分的药物组合物的制备方法，此药物组合物中的前一种成分已知在减少脊柱骨折和增加骨密度方面有效，而在加入了吸收增强剂之后，后一种成分在抑制骨吸收方面有效。

下面对上述两种活性成分进行进一步阐述。

首先，骨化三醇，用 $1,25-(\text{OH})_2\text{-D}_3$ 表示的活性维生素 D_3 衍生物之一，它与钙在肠道的运输有关，而且已知它能够激活肠道内的钙的吸收，而且它能够减少甲状旁腺激素的分泌，因此减轻了患有骨质疏松症的绝经妇女的骨丢失 [Aloia J. F., Am J Med(美国医学杂志)(1988), 84, 401-8]。另外，还已知：骨化三醇能够激活骨钙蛋白的产生，骨钙蛋白是一种涉及与成骨细胞有关的骨矿化的骨特异性蛋白 [Price P. A., Calcif Tissue Int (1990) 4 月, 46 (4), 270-9]。但是，骨化三醇作为一种药剂，还存在一个问题，那就是当单独使用时经常引起血钙过多，并因此为了克服这种缺点进行了许多这方面的研究。

其次，用 4-氨基-羟基亚丁基-1, 1-二膦酸盐表示的阿仑特罗是一种被开发用作治疗骨质疏松症治疗剂的二膦酸盐，而且已知它能够通过抑制破骨细胞的活性预防骨丢失，并因此有助于提高骨密度。事实上，临床研究表明可以增加大约 2-3% 的骨密度。例如，一个对来自 16 个不

同国家的 994 名绝经后妇女进行的临床研究表明：脊柱骨和下肢骨的矿物质密度逐渐增加。而且，在用阿仑特罗药物治疗的组中新的脊柱骨折的发生率，与安慰组相比，下降了大约 48%。

一般地，骨的矿物质密度与骨密度紧密相关，因此当矿物质的密度变高时，骨折的发生率急剧下降。当阿仑特罗以 10 mg/日的量持续给药 3 年(10 mg/日的阿仑特罗被认为具有最好的治疗效果 [Lieberman, N. Engl. J. Med. (新英格兰医学杂志) (1995), 333, 1437-1443]，脊柱骨和下肢骨的矿物质密度分别增加 8.2%和 7.2%，但是在相同的给药时间内，安慰组中的矿物质密度下降了 0.7%。但是，阿仑特罗却显示出对正常骨代谢周期的负面影响，这种负面影响是通过降低骨质重建率导致的。因此，需要一种必需能够解决这个问题的复合药剂。

由于阿仑特罗能够预防血钙过多，已知血钙过多是由骨化三醇引起的最严重的副作用，因此，我们假设：联合给予阿仑特罗和骨化三醇将能够解决血钙过多，并且还可以给予最佳剂量的骨化三醇，由于骨化三醇的安全界限狭窄，其每日剂量一直被限制。而且，阿仑特罗对骨质重建的拮抗活性还将由于骨化三醇的存在而得到补偿。

作为一种开发用于治疗绝经后妇女的最有效的复合药剂的方法，首先，在本发明中诱导实验动物患有骨质疏松症，然后将它们置于给予不同浓度的骨化三醇和阿仑特罗的混合物的大量试验中，这些不同浓度的骨化三醇和阿仑特罗的混合物是由于骨化三醇和阿仑特罗的混合比例不同所产生的，并且其最佳混合比例最后被定在不仅能在不减慢骨质重建率的情况下有效地预防骨质疏松症，而且还可以将血液中的钙浓度控制在正常水平的比例。此结果表明：药剂中两种成分之间的最佳浓度比例为 1 重量份的骨化三醇含有 1,000-50,000 重量份的阿仑特罗。如果上述药剂中 1 重量份的骨化三醇所含的阿仑特罗的数量小于 1,000 重量份，所得的血浆钙浓度将会增加，并且当给予此药剂时，将会冒很高的引起血钙过多的危险。另一方面，上述药剂中 1 重量份的骨化三醇所含的阿仑特罗的数量大于 50,000 重量份时，它将会对正常的骨代谢周期

产生负面影响，这种负面影响是由降低骨质重建率所致的。

按照本发明的药剂可以制备成不同的剂型，例如裸片、肠溶片、颗粒剂、肠溶颗粒剂、胶囊和肠溶胶囊。而且，每个剂量单位中建议使用的每种成分的范围为：骨化三醇为 0.1 - 5.0 μg ，阿仑特罗为 1 - 50 mg。

进行一系列显示制备药剂效力的试验后，选择添加剂。然后将适量的所选添加剂分别加入上述两种活性成分中的每一种活性成分中，以制备两种初步的制剂，然后将它们混合在一起最后形成一种复合药剂。如此获得的复合药剂，与那些主要由于给药困难以及在食道中的副作用而导致具有较低的药物依从性的常规药物相比，显示出改进很多的药物依从性，因此，它有效地预防了骨质疏松症的发生。

本发明所用制备方法的特征如下。

方法 A

在本发明中，将甘露糖醇加入骨化三醇和乙醇的混合物中，并混合，然后将乙醇、抗氧化剂和一种粘合剂加入此混合物中，并混合，然后将所得混合物粉碎成 14 - 35 目大小并在 30-50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥，得到骨化三醇颗粒。如果混合物的大小小于 14 目，所得的骨化三醇颗粒变得不均匀，而如果混合物的大小大于 35 目，产率变低并且压片的操作性变差。

方法 B

在一个与上述方法 A 分开的独立步骤中，将阿仑特罗、甘露糖醇和一种吸收增强剂混合在一起，并添加乙醇和一种粘合剂。然后，将所得的混合物粉碎成 14 - 35 目大小并在 30-50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥，得到阿仑特罗颗粒。如果混合物的大小小于 14 目，所得的阿仑特罗颗粒变得不均匀，而如果混合物的大小大于 35 目，产率变低并且压片的操作性变差。

方法 C

将分别从方法 A 和 B 中获得的骨化三醇颗粒和阿仑特罗颗粒混合在一起，添加崩解剂和润滑剂，并将所得的混合物压片以最终得到本发明的复合药剂。

下面描述本发明中所使用的添加剂。

首先，在上述方法 A 和 B 中使用甘露糖醇作为一种赋形剂，在方法 A 和 B 中所使用的甘露糖醇的量分别限制在占最终药物组合物中所含甘露糖醇总量的 50-60 重量 % 和 40-60 重量 %。

限制甘露糖醇数量的理由如下。骨化三醇和阿仑特罗之间的可混性试验表明：两种成分的混合物导致骨化三醇的稳定性下降。但是，在一个相容性试验中，当骨化三醇在与阿仑特罗混合之前先于其他的赋形剂混合时，骨化三醇在所得的混合物中保持稳定。因此，为了避免骨化三醇和阿仑特罗直接接触，本发明的发明人首先用甘露糖醇将骨化三醇和阿仑特罗分别稀释以产生它们的颗粒，然后将它们混合。关于在制备上述颗粒中所用甘露糖醇的数量，我们发现甘露糖醇的数量对于保持上述颗粒的均匀性是很重要的。当分别使用 50% 总甘露糖醇制备骨化三醇颗粒和阿仑特罗颗粒时，可以观察到所得颗粒在比容上存在差别，而且随后（在将上述颗粒混合并压片后）获得的药片在上述成分的数量上是不均匀的。因此，进行了大量试验以发现甘露糖醇的一个最佳数量，在此数量下可以产生均匀颗粒并且使每一种所给成分均含有相同的数量；结果发现：使用大约 50-60% 的总甘露糖醇制备骨化三醇颗粒是适宜的，并且优选 52%。同时，制备阿仑特罗颗粒建议使用大约 40-60% 的总甘露糖醇，并且优选 48%。然后，在上述两种颗粒混合前，对他们进行调整以使其具有相同的数量。

在本发明中可以使用的赋形剂的实例包括白糖、纤维素和乳糖以及甘露糖醇，优选右旋甘露糖醇。这些赋形剂建议使用 10-98 重量 %，优选 70-97 重量 %。如果所加甘露糖醇的数量不在上述范围内，之后压片的可操作性变差。

本发明中可以使用的抗氧化剂是一种或多种选自丁基化羟基甲苯 (BHT)、丁基化羟基苯甲醚 (BHA)、DL- α -生育酚和卵磷脂的抗氧化剂, 优选丁基化羟基甲苯 (BHT) 和丁基化羟基苯甲醚 (BHA)。这些抗氧化剂可以使用占总组合物重量的 0.001-10 重量 %, 优选 0.01-1.0 重量 %。如果抗氧化剂的量不在上述范围内, 之后将会出现氧化三甲醇稳定性方面的问题。

粘合剂可以选自吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基纤维素和羧甲基纤维素钠。这种作为添加剂的粘合剂的建议使用量为占总组合物重量的 0.1-20 重量 %, 优选 1-10 重量 %。如果粘合剂的数量不在上述范围内, 由于不均匀的颗粒分布, 之后压片的可操作性将变差。

崩解剂可以选自交联羧甲基纤维素钠、低级取代的羟丙基纤维素、和羧甲基纤维素钙。这种作为添加剂的崩解剂的建议使用量为占总组合物重量的 0.1-20 重量 %, 优选 1-10 重量 %。如果崩解剂的数量不在上述范围内, 之后将会出现药片崩解方面的问题。

润滑剂的实例包括硬脂酸钙、硬脂酸镁和滑石。它的建议使用量为占总组合物重量的 0.1-20 重量 %, 优选 1-10 重量 %。如果崩解剂的数量不在上述范围内, 之后将会出现压片可操作性方面的问题以及活性成分测定方面的问题。

十二烷基硫酸钠可以作为一种吸收增强剂使用, 它的建议使用量为占总组合物重量的 0.01-10 重量 %, 优选 0.1-1 重量 %。

另外, 用于缓释的添加剂可以选自羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、羟丙基纤维素和乙基纤维素。

按照本发明的药物成分, 可以通过用一种肠溶包衣溶液包覆制成肠溶片, 而且, 还可以通过将一定的药物组合物装入常规的胶囊制成胶囊。此肠溶包衣溶液由肠溶包衣成分、增塑剂和溶剂组成。肠内吸收剂的实例是羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、甲基丙烯酸聚合物和邻苯二甲酸醋酸纤维素, 增塑剂的实例包括柠檬酸三乙酯、聚乙二醇和丙二醇。本发明中所用的溶剂是两种或多种选自二氯甲烷、乙醇、丙酮和蒸馏水的

溶剂。

如此制备的药剂，在治疗代谢性骨疾病例如骨质疏松症、佩吉特病、脊柱炎、骨软化症、肾衰竭患者的肾性骨营养不良、甲状旁腺机能低下和甲状旁腺功能亢进方面，已经显示出的良好的治疗效果。

通过下列的实施例对本发明进行进一步说明。但是，这些实施例无论如何不应该被认为是对本发明范围的限制。

参考实施例

在不仅能有效地预防骨质疏松症的发展，而且能使血浆钙浓度以及钙的尿排泄量保持在一个正常水平，同时又不抑制骨质重建率的情况下，计算出最佳浓度比。

1) 骨质疏松症的诱导

从 Daehan Bioclink 有限公司（汉城，韩国）中购买十二周龄的成熟雌性 Sprague-Dawley 白色大鼠，并在汉城大学药物学院动物试验室的一间干净房间中饲养。通过用普通的饲料（Purina, chow diet）喂养，使这些白色大鼠适应一周，并将它们分为 6 个不同的组，其中每组由具有相似体重分布的 10 只白色大鼠组成，对它们中的所有白色大鼠实行卵巢切除术（ovariotomies）。可以允许这些白色大鼠自由地饮水，在 22℃、50% 湿度、12h 暗/明周期的标准条件下进食。

2) 药物治疗

卵巢切除术后，这些白色大鼠静养 2 天，然后在 2 月的时间内，每周 5 天早晨口服给予一种药物，此药物含有一定剂量的单一的骨化三醇或阿仑特罗或它们的组合，它们分别独立地溶于 0.5 mL 精制棕榈油和生理盐水中。每组中给予药物的剂量显示于表 1 中，对照组仅仅给予相同数量的实验组中所用的棕榈油和生理盐水。

表 1.

分类		骨化三醇 ($\mu\text{g/kg}$)	阿仑特罗 (mg/kg)	棕榈油 (mL)	生理盐水 (mL)
对照组		—	—	0.5	0.5
给予骨化三醇的组		0.1	—	0.5	0.5
给予阿仑特罗的组		—	1.0	0.5	0.5
给予骨化三醇 和阿仑特罗的 组	1	0.1	0.5	0.5	0.5
	2	0.1	1.0	0.5	0.5
	3	0.1	2.0	0.5	0.5

3) 收集样本和预处理

在开始上述药物给药 2 个月后, 通过使用一个代谢笼收集白色大鼠 24h 的尿样, 将其离心, 然后在 -70°C 下贮存。将试验白色大鼠禁食过夜, 将其断头, 并收集它们的血样。然后通过离心那些血样获得白色大鼠的血清, 然后收集血清, 并在 -70°C 下贮存。通过分离术分离胫骨, 并用 pH 7.4 的 4% 福尔马林固定。

4) 统计学数据和评价

每个试验的结果用均值 $\pm$ 标准差表示, 其显著性通过 $P < 0.05$ 水平下的 ANOVA、Duncan 多范围检验确定。

实验例 1: 骨组织形态测定

为了对上述参考实施例中固定的胫骨进行脱钙作用, 将每个胫骨置于 10% 硝酸溶液中 6 小时, 然后经过浓度范围在 80% 至 100% 的 10 种不同浓度的乙醇溶液进行脱水。然后, 分别在二甲苯和石蜡中将它包埋 2 次, 用一种切骨微锯将胫骨近端切成 4cm 厚的骨片, 并用苏木精-伊红染色。

在 40 倍放大率的显微镜下观察上述胫骨近端, 应用定量图象分析系统测定骨小梁的面积后, 计算标准面积 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 内的骨小梁面积与此标准面积的比率。骨组织形态测定的结果如下。

人的骨皮质每年更新大约 2-3%; 相比而言, 骨小梁的更新速度较

快，每年为 25%。因此骨小梁的发育速度可用作一种辨别骨健康状况的直接而精确的方法，而且它已经广泛地应用于动物试验中。在本试验中，在卵巢摘除术后，将阿仑特罗和骨化三醇单独给药或者联合给药 2 个月，胫骨骨小梁显微镜观察结果显示：骨小梁的面积与正常组相比明显减少（见附图 1）。应用图像分析仪的实验组的观察结果显示：在单用阿仑特罗治疗的组、用一种复合药物治疗的组 1、2 和 3 中，骨小梁的面积显著增加，而在单用骨化三醇治疗的组中没有增加（见附图 2）。例如就骨小梁的面积而言，用一种含有阿仑特罗和骨化三醇的复合药物治疗的组显示了与单用阿仑特罗治疗的组相同的结果，而且在分别用一种复合药物治疗的组 1、2 和 3 之间没有差异。

实验实施例 2：生化试验

所用的试剂是从上述参考实施例中所获得的那些。

1) 血清钙浓度的测定

应用 Technicon 自动分析仪测定血清钙浓度，结果显示如下。

单用骨化三醇治疗的组中的血清钙浓度显著升高，而单用阿仑特罗治疗的组中的血清钙浓度明显下降。这是因为骨化三醇增加了钙在肠中的吸收，而阿仑特罗通过减少甲状旁腺激素抑制了骨吸收，然后阻止骨中钙释放至血流中，并抑制骨化三醇 $[1, 25-(\text{OH})_2\text{-D}_3]$ 在肾中的合成，因此减少了肠中钙的吸收。因此，用复合药物给药的组 1、2 和 3 中血清钙的浓度保持在单用骨化三醇组和单用阿仑特罗组的浓度的中间水平，此与所期望的一致（见附图 3）。

2) 尿中钙排泄的测定

为了研究药物对血清钙浓度和所得尿钙排泄之间关系的影响，用一种钙试剂盒（Yeongdong 药物有限公司，韩国）测定 24 小时尿样的钙/肌酸浓度比，结果显示于附图 4 中。按照附图 4，用骨化三醇给药时钙排泄明显升高，而用阿仑特罗给药时未观察到差异。在用含有骨化三醇和阿仑特罗二者的复合药物的组 1 和组 3 中，钙排泄量升高，而组 2 的钙排泄量保持在与对照组类似的水平上（附图 4）。

3) 骨质重建指数的测定

用 Technicon 自动分析仪测定血清碱性磷酸酶的活性水平，并应用 RIA 方法，用一种试剂盒 (OSCA test, Brahams, 柏林, 德国) 测定骨钙蛋白的浓度。

测定血清骨钙蛋白的浓度和碱性磷酸酶的活性，作为骨质重建率的指数。当单用骨化三醇给药时骨钙蛋白浓度和碱性磷酸酶的活性均有轻度升高，而用阿仑特罗给药时，它们下降，尽管下降水平不明显（附图 5 和 6）。在用复合药物治疗的所有组中的骨钙蛋白浓度未观察到变化。在用复合药物治疗的组 3 中碱性磷酸酶的活性明显降低，但组 1 和组 2 中碱性磷酸酶的活性没有显著的变化，因此提示组 1 和组 2 中骨质重建率没有下降。

4) 骨吸收指数的测定

通过应用一种试剂盒 (Osteomark, Ostex, USA) 测定 24 小时尿样 N-端肽 (NTx) 的浓度，计算尿中 NTx/肌酸的比值。N-端肽是 I 型胶原的副产品。结果显示由给药引起的骨吸收的比率没有明显的变化（见附图 7）。

从上面实验例 1 和 2 中，复合给药 (0.1 μ g/kg 骨化三醇+1.0 mg/kg 阿仑特罗) 的组 2 显示：作为一种复合药剂，它具有最佳的浓度比，这是因为在没有抑制骨质重建率的情况下，有效地阻止骨质疏松症的进展，而且血清钙浓度和尿钙排泄保持在正常的水平。因此如在下面实验实施例 3 和 4 所述，按照 1998 年 4 月 29 日发布的韩国食品药品监督管理局 98-56 中所述的标准急性毒性试验和亚急性毒性试验，对所得复合药剂的安全性进行评价，其安全性均得到证实。

实验实施例 3: 含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂的急性毒性试验

测定经口服给予实验动物的含有骨化三醇和阿仑特罗的单剂量复合药剂的毒性，以评价上述复合药剂的安全性。在此试验中，将上述复合药剂给予 Sprague-Dawley 白色大鼠，通过 LD₅₀、一般状况、体重和饮食摄入量研究其急性口服毒性，并通过尸体解剖做进一步的测定。

喂养条件

在由意大利 Techniplast 公司设计的、位于附属于韩国 Choong-Ang 大学药理学系的动物护理中心的 SPF 房间中，在 23 ±2℃、相对湿度 60 ±2%、每小时通风 13-15 次、每天照明 12 小时（上午 7 时-下午 7 时）的条件下，饲养 180 只 4-5 周龄的 Sprague-Dawley 白色大鼠（90 只雄性和 90 只雌性）。将上面的试验白色大鼠置于笼中，让其自由地摄入用 X 线照射消毒的固体饲料（Hanil Feed: Greenpia 有限公司, 韩国）和饮料（高温消毒的自来水）。

样品试剂的制备

称取贮存于-20℃冰箱内避光容器中的骨化三醇 1.0 mg，并将其加入一个褐色烧瓶中。当需要时，通过加入一种溶剂（100%乙醇：MCT = 5:95）新近制备 1.0 μg/mL 和 10 μg/mL 的溶液，并与已经悬浮了阿仑特罗一钠的 0.5% 的 CMC-Na 水溶液混合。

药量的确定

根据人的给药量，将骨化三醇和阿仑特罗给药量之间的混合比例确定为 0.5 μg : 5 mg。根据 LD₅₀ 值将动物按比例分为 8 个不同的组，按照表 2 所示测定全部 9 个组，其中包括 1 个对照组。在确定容积总数为 1ml 后，进行口服给药。根据人的体重和白色大鼠的给药量之间的关系，将骨化三醇和阿仑特罗的最小剂量分别定为 0.2 μg/kg 和 2.0 mg/kg。

表 2.

组	1	2	3	4	5	6	7	8	对照
骨化三醇 (μg/kg)	125	100	75	50	25	5	1	0.2	0.0
阿仑特罗 (mg/kg)	1250	1000	750	500	250	50	10	2.0	0.0

实验项目

1) LD₅₀的测定

为了测定雄性和雌性白色大鼠的 LD₅₀ 值，将实验动物分为 8 个药物治疗组和一个对照组，每个组中有 10 个白色大鼠，并对其进行口服给药。然后计算给药后 2 周内死亡的动物数，应用 Brehrens-Karber 法计算药物的 LD₅₀ 值。

用含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药物给药的白色大鼠的 LD₅₀ 如下。

雄性和雌性白色大鼠的死亡率显示在下面表 3 中，这些白色大鼠是用含有骨化三醇和阿仑特罗 (1 μg/kg : 10mg/kg) 的复合药物单次口服给药的。

表 3.

口服给药(骨化三醇+阿仑特罗)		死亡率	
骨化三醇(μg/kg)	阿仑特罗(mg/kg)	雌性	雄性
125	1250	10/10	10/10
100	1000	9/10	9/10
75	750	6/10	5/10
50	500	0/10	0/10
25	250	0/10	0/10
5	50	0/10	0/10
1	10	0/10	0/10
0.2	2.0	0/10	0/10

按照 Brehrens-Karber 方法计算骨化三醇和阿仑特罗的复合药物的 LD₅₀ 值。结果显示雄鼠骨化三醇的 LD₅₀ 为 77.5 μg/kg，阿仑特罗的 LD₅₀ 为 775mg/kg，雌鼠骨化三醇的 LD₅₀ 为 75.0 μg/kg，阿仑特罗的 LD₅₀ 为 750mg/kg。

2) 正常状态的观察

对全部试验白色大鼠每天均进行观察，观察期为 2 周。在给药后的最初 6 小时每 30 分钟观察 1 次，然后从第 2 天起每天在预定的时间观察 1 次。下面是正常状态下白色大鼠的观察结果。

在给药后的最初 6 小时，给药大于 LD_{50} 的雌性白色大鼠组表现出一种特别的行为，即它们用腿搔抓它们的头，这种行为原来是因为食管胃刺激引起的症状。然后，那些白色大鼠在给药后的 1 小时内表现出抽搐和呼吸困难。在给药后的 2 小时内自发病下降，轻度的活动屈曲，保持昏睡状态，并有呼吸紧张。几乎所有的骨化三醇和阿仑特罗给药量分别不少于 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 的白色大鼠在给药后的 24 小时内死亡。在给药量为 $75\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 $750\text{mg}/\text{kg}$ 阿仑特罗的白色大鼠组中，60% 的雌鼠和 50% 的雄鼠死亡，而在给药量为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 $500\text{mg}/\text{kg}$ 阿仑特罗的白色大鼠组中，所有白色大鼠均存活。在给药量为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 $500\text{mg}/\text{kg}$ 阿仑特罗的白色大鼠组中，每 10 个中有 3 个表现出上述食管胃刺激症状，但它们在恢复期的第一天即恢复过来。

3) 体重和食物摄入量的测定

在给药前和给药后两周时间内每天的预定时间测定所有实验白色大鼠的体重和食物摄入量。结果显示除了死亡的白色大鼠，在雄鼠和雌鼠的食物摄入量和体重均无显著性的变化(附图 8-9)。

4) 尸体解剖

从死亡的白色大鼠以及存活白色大鼠用乙醚麻醉处死后获得肉眼结果。用 10% 中性福尔马林固定肉眼发现的异常器官或组织，然后将它们做成标准组织样本。然后用苏木精和伊红染色而获得组织结果，所得结果如下。

除了脾脏凝血 (hemostasis) 外，用含有不少于 $75\mu\text{g}/\text{kg}$ 的骨化三醇和 $750\text{mg}/\text{kg}$ 的阿仑特罗的复合药物治疗的白色大鼠尸体解剖没有异常的发现物。对对照白色大鼠和用含骨化三醇和阿仑特罗的复合药物治疗后 14 天恢复期完成后的存活白色大鼠进行尸体解剖，除了脾脏轻度肿大外，没有异常的发现物。用 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 阿仑

特罗治疗后发现死亡的白色大鼠的组织解剖显示,存在严重的脾脏凝血和出血(附图 10)。

实验例 4: 含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂的亚急性毒性试验

将 5 周重复剂量的含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂对实验白色大鼠进行口服给药,进行亚急性毒性试验,以评价上述复合药剂的安全性。在 5 周重复口服给药期和 2 周恢复期,每天对实验白色大鼠检测一次。为了评价复合药剂的亚急性毒性,在用所给的药物治疗后进行诸如正常状态、体重变化、饮食摄入量、眼科检查、听力检测、尿液试验、血液学试验、血液生化试验和病理学试验等检查。

实验动物和喂养条件

在实验例 3 急性毒性试验中上述的相同条件下喂养 Sprague-Dawley 白色大鼠,除了在完成试验前的头一天将它们放置于代谢笼中。每个实验组由 20 个雄鼠和 20 个雌鼠组成,并对它们治疗 5 周。在 2 周的恢复期后,从每个组中选择 10 个雄鼠和 10 个雌鼠进行检查。

样品药剂的制备和药量的测定

按照实验例 3 急性毒性试验中所述的相同方法制备样品药剂。按照人的给药量、已经报道的 LD₅₀ 值和已知的在临床治疗和预防骨质疏松症中有效的给药量,测定骨化三醇和阿仑特罗药量的混合比例为 0.5 µg : 5 mg。通过 azetropy 5 选择 5 个组,其中 4 个不同的治疗组和 1 个对照组,如表 4 中所示。

表 4.

组	1	2	3	4	对照
骨化三醇 (µg/kg)	25	5	1	0.2	0.0
阿仑特罗 (mg/kg)	250	50	10	2.0	0.0

实验项目

1) 死亡检查

没有观察到死亡, 接受含骨化三醇和阿仑特罗的复合药物治疗的雄鼠和雌鼠均全部存活, 不论是在给药完成时, 还是恢复期完成时均存活。

2) 正常状态的观察

观察白色大鼠的正常状态, (a) 在治疗期每天 3 次: 给药前、给药后的即刻以及给药后 2 小时; (b) 在假期每天 2 次: 给药前、给药后的即刻, 以及 (c) 在恢复期每天 1 次。

直到给药后的第 3 天才观察到食管胃刺激症状和昏睡状态, 但这些症状在第 5 天后均消失。其它实验组的所有动物的正常状态没有似乎与给药相关的特别的变化。

3) 体重和水摄入量的变化

在给药期和恢复期的每 3 天测定 1 次体重。测定 7 天的累计水摄入量, 每周 1 次; 通过这样估计每个白色大鼠每天的摄入量。结果显示直到治疗期和恢复期结束, 在用含骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中, 在体重(附图 11)和水摄入量(附图 10)上没有明显变化。

4) 眼科学尸体解剖

在检查期间对所有实验白色大鼠进行眼科学尸体解剖, 并在试验的第 5 周仅对每个组中的 5 个雄鼠和 5 个雌鼠进行检查。当观察眼外部状态时, 用阿托品滴眼, 检查眼的前房、眼的中间导体和眼底。当在第 5 周没有观察到任何与所用药物有关的变化时, 则省略随后恢复期的检查。结果显示: 在治疗期和恢复期结束后, 在用骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中没有任何明显的眼科学变化。

5) 听力检测

在治疗期的第 5 周对每个实验组中的 10 个雄鼠和 10 个雌鼠, 通过 Gaidan Boizur₁ 机(大约 600Hz)进行 Outreflex 检查。当在第 5 周没有观察到任何与所用药物有关的变化时, 则省略随后恢复期的检查。结果

显示：在治疗期和恢复期结束后，在用骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中没有任何明显的听力改变。

6) 尿液检测

在治疗期的第5周和恢复期的第2周，从每个实验组中选择10个雄鼠和10个雌鼠，令其禁食，但允许饮水，然后在禁食4小时后收集它们的尿样。然后让它们自由地摄食和饮水，并在自由进食20小时后收集它们的尿样。分析首份4小时所采集尿样的白细胞、亚硝酸盐、尿胆原、pH值、蛋白、酮体、尿糖、潜血、比重、尿胆红素（AMES尿检试纸，N-Multistix SG-L: Japan Bayer, Samkong 有限公司）、颜色和尿沉淀。20小时获得的尿样用于检测Na、K和Cl（总量测定）。结果显示：在治疗期和恢复期结束后，在用骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中没有任何有意义的尿液方面的变化，而且它们均在正常值范围内。

7) 血液检测

在处死白色大鼠前将它们禁食过夜大约16小时，然后用乙醚麻醉后，沿正中线解剖它们。从腹动脉采集血样，并将它们贮存在含有抗凝剂（7.5% EDTA-2K）的真空试管中（Bechon Dickinson Vacutainer Systems, 欧洲英格兰）。然后分析血样的红细胞（RBC）计数（电阻中变化的检测法）、血红蛋白量（氰化正铁血蛋白法）、红细胞压积（估计RBC计数和平均红细胞体积）、细胞平均体积、细胞平均血红蛋白（从血红蛋白量和红细胞压积估计）、血小板计数（电阻中变化的检测法）（异常自动分析仪：Cell-Dyne 3000, Abbot Co.）、网织红细胞（Brecher法）和白细胞分类计数（May-Giemsa法）。在此，将3.8%枸橼酸钠处理的血样离心（在3,000 rpm下离心10分钟）所得血浆，通过凝血酶原时间（Quick法），估计上述检测，所得结果如下。

治疗期结束时

在用骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中没有观察到任何有意义的变化。

恢复期结束时

在用骨化三醇和阿仑特罗的复合药剂治疗的所有实验组中没有观察到任何有意义的变化。

8) 血生化检测

按照血液检测中相同的方法从腹静脉中采集血样，并用肝素处理。将血样离心(在 3,000 rpm 下离心 10 分钟)获得血清，然后分析 GPT 和 GOT(异常 UV 比率法，异常自动分析仪，CH16，Texas 国际公司)、ALP(Bessey-Lowry 法)、总胆固醇(CEH-COD-POD 法)、总胆红素、血糖(己糖激酶 PD 法)、尿素氮(Urea-GL PC 法)、无机亚磷(六价钼酸法)和总蛋白(Biuret 法)(异常 UV 比率法，异常自动分析仪，Monach 仪器研究室)。可从 Stanbio Laboratory Inc. (Texas, USA)购得上述试验所用的试剂，其结果如下。

治疗期结束时

用 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250 mg/kg 阿仑特罗治疗的雄性白色大鼠与用 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 50 mg/kg 阿仑特罗治疗的雄性白色大鼠的 GPT 活性轻度升高。所有实验白色大鼠的 GPT 活性均升高。但是，没有任何有意义的剂量-依赖性的变化，而且甚至用溶剂治疗的对照组的 GTP 活性水平相对较高，因此提示这种 GTP 活性的轻度升高与采集血样时造成的轻度溶血有关。所有雄性和雌性实验白色大鼠的血糖均轻度升高，但在量上没有观察到有意义的依赖性。用溶剂治疗的对照组也轻度升高，并且尿液中没有检测到尿糖，因此提示血糖轻度升高与饮食无关，而是压力引起的一过性升高。因此，可从上面的结果得出：除了 GOT 活性和血糖水平的轻度升高外，在实验组和对照组中均没有任何与药物治疗相关的有意义的剂量依赖性的改变。

恢复期结束时

用 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250 mg/kg 阿仑特罗治疗的雄性白色大鼠与用 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 50 mg/kg 阿仑特罗治疗的雄性白色大鼠的 GPT 活性在恢复期结束时正常。所有实验白色大鼠的 GOT 活性比治疗期结束时降低。但是，没有任何有意义的剂量-依赖性的变化，而且甚至用溶剂治疗的对照组的 GTP 活性水平相对较高，因此提示这种 GTP 活性的轻

度升高与采集血样时造成的轻度溶血有关。因此,可从上面的结果得出:除了与治疗期结束时相比, GOT 活性和血糖水平轻度升高外, 在实验组和对照组中均没有任何与药物治疗相关的有意义的剂量依赖性的改变。

9) 尸体解剖

从死亡白色大鼠和所有存活白色大鼠用乙醚麻醉处死后获得肉眼观察资料。用 10% 中性福尔马林固定通过肉眼发现的异常器官或组织, 然后将它们制备成标准组织样品。然后用苏木精染色以获得组织结果, 所得结果如下。

在治疗期结束时

用 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250 mg/kg 阿仑特罗的复合药物治疗的白色大鼠的尸体解剖显示, 存在脾脏的显著增生, 但用低于上述剂量治疗的白色大鼠没有任何异常的结果。除了脾脏以外, 其它组织结果均未表现出与药物有关的显著变化。

恢复期结束时

用 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250 mg/kg 阿仑特罗的复合药物治疗的白色大鼠的尸体解剖显示, 存在脾脏的显著增生, 但用低于上述剂量治疗的白色大鼠没有任何异常的结果。除了脾脏以外, 其它组织结果均未表现出与药物有关的显著变化。

10) 病理检查

一采集好血样, 就通过驱血法将所有实验白色大鼠处死。通过裸眼观察所有器官的异常后, 切除脑、下丘脑、甲状腺包括甲状旁腺、唾液腺(颌下腺和舌下腺)、胸腺、心脏、肺包括支气管、肝脏、脾脏、肾脏、睾丸、肾上腺、卵巢、前列腺、精囊、子宫和胸骨, 并分别称重。在尸体解剖当天让实验白色大鼠禁食, 并分别将上述每个器官的相对重量估算为体重的 100g。同样, 将脊髓、坐骨神经、胸主动脉、气管、舌、食管、胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠、直肠、胰腺和肠系膜的异常部分切除, 并用含磷酸盐缓冲剂的 10% 福尔马林固定, 用 Bouin's 溶液固定脑和脊髓(胸骨和股骨), 并用石蜡包埋。用苏木精

和伊红将所有实验组和溶剂对照组的治疗期和恢复期白色大鼠的所有组织和器官的标本进行染色，并在显微镜下进行观察。结果显示没有任何明显的与治疗药物有关的变化。

实验例 3-4 的结论

将含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药物口服给予雄性和雌性 Sprague-Dawley 白色大鼠，骨化三醇和阿仑特罗的混合比为 1: 10000，在 5 周的急性或亚急性毒性试验期间，或者给药一次，或者重复给药。其结果如下。

首先，上述复合药物的急性毒性试验的结果如下。

用 Brehrens-Karber 法计算骨化三醇和阿仑特罗复合药物的口服给药的 LD₅₀ 值。结果显示雄性白色大鼠骨化三醇的 LD₅₀ 为 77.5 µg/kg，阿仑特罗的 LD₅₀ 为 775mg/kg，而雌性白色大鼠骨化三醇的 LD₅₀ 为 75.0 µg/kg，阿仑特罗的 LD₅₀ 为 750mg/kg。当用 50 µg/kg 骨化三醇和 500 mg/kg 阿仑特罗的复合药物口服治疗一次时，所有实验白色大鼠均存活，并且除了食管胃刺激症状和昏睡外，没有观察到正常状态的任何异常改变。体重、饮食摄入量和尿检结果均显示正常。

口服不少于 75 µg/kg 的骨化三醇和不少于 750mg/kg 的阿仑特罗的复合药物而处死的白色大鼠，其尸体解剖显示，存在严重的脾脏凝血和出血，但没有观察到其它与药物治疗有关的特殊损害。

其次，上述复合药物的亚急性毒性试验的结果如下。

在重复药物治疗结束时

用 25 µg/kg 骨化三醇和 250mg/kg 阿仑特罗的复合药物重复口服治疗 5 周后，所有实验白色大鼠均存活，并且其正常状态、饮食摄入量、眼科检查、听力检查、血液检查和血液生化检查均没有观察到任何异常改变。

上述白色大鼠尸体解剖显示，除了脾脏肥大外，其每个器官的重量没有异常发现，但也观察到中等水平的局限性肺间隔和轻度脾脏、肝脏、肾脏凝血，以及食管胃粘膜水肿和炎细胞浸润。但是，在用骨化三醇低

于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和阿仑特罗低于 50mg/kg 的低剂量复合药物治疗的实验组中, 以及对照组中, 也可观察到这些损害。因此认为这些损害与治疗药物不相关。在脑、骨髓、性腺和消化腺中没有任何异常发现。

在恢复期结束时

用 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250mg/kg 阿仑特罗的复合药物重复口服给药 5 周后, 在 2 周恢复期结束时, 所有实验白色大鼠均存活, 而且其正常状态、饮食摄入量、眼科检查、听力检查、血液检查和血液生化检查均没有观察到任何异常改变。

上述白色大鼠尸体解剖显示, 除了脾脏肥大外, 其每个器官的重量没有异常发现, 但也观察到中等水平的局限性肺间隔和脾脏、肝脏、肾脏中轻度的止血, 以及食管胃粘膜水肿和炎细胞浸润。但是, 在用骨化三醇低于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和阿仑特罗低于 50mg/kg 的低剂量的复合药物治疗的实验组中, 以及对照组中, 均可观察到这些损害。因此认为这些损害与治疗药物不相关。观察到的轻度食管胃炎不是一种特殊的改变, 而认为是在评价所给治疗药物的毒性试验中啮齿动物表现的一种可逆的损伤。在脑、骨髓、性腺和消化腺中没有任何异常发现。

如上所述, 将具有混合比例为 1: 10000 的骨化三醇和阿仑特罗的复合药物单次口服给药, 其结果显示: 骨化三醇和阿仑特罗的 LD_{50} 分别大于 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 750mg/kg。因此证明这种药物是一种毒性低的药物。用含有 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 250mg/kg 阿仑特罗的复合药物重复口服给药 5 周, 在恢复期以及治疗期结束时, 也没有造成任何显著的亚急性毒性, 并且考虑到推测的人的剂量 (按照人平均体重 60kg) 仅相当于白色大鼠给药剂量 (即 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 骨化三醇和 5mg/kg 阿仑特罗) 的 1/3000, 因此认为本发明的含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药物是安全的。

实验例 5: 对具有不同的骨化三醇和阿仑特罗混合比例的含有骨化三醇和阿仑特罗的复合药物进行的试验

1) 一种骨化三醇和阿仑特罗的混合物与添加剂例如一种赋形剂的可混性。以某种显示于下列表 5 和 6 中的比例, 将赋形剂加入上述骨化三

醇和阿仑特罗的混合物(5 μg : 50 mg)中。

2) 然后向 1) 中所得的混合物中加入 5%的水, 并在 40℃下储存 14 天。

通过 HPLC (高效液体色谱) 对上述混合物的稳定性进行测定, 结果显示于下列表 5 和 6 中。

表 5.

骨化三醇的稳定性(残渣率%)			
种类	混合比例	干燥	含水量(%)
骨化三醇+阿仑特罗	-	80.1	79.6
甘露糖醇	9:1	101.9	101.6
白糖	9:1	94.7	95.0
纤维乳糖 (Cellactose)	9:1	64.5	63.5
β -环糊精	9:1	97.5	96.3
聚乙烯吡咯酮	9:1	98.3	99.1
羟丙基甲基纤维素	3.6:1	95.4	93.5
羟丙基纤维素	3.6:1	91.8	92.2
十二烷基硫酸钠	3.6:1	83.9	83.4
低级取代羟甲基纤维素	3.6:1	95.4	94.3
交联羧甲基纤维素钠	3.6:1	93.5	92.0
交联羧甲基纤维素钙	3.6:1	75.2	73.5
交联聚乙烯吡咯酮	3.6:1	88.5	89.7
丁基化羟基甲苯	3.6:1	27.7	14.4
丁基化羟基苯甲醚	3.6:1	84.6	78.3
DL- α -生育酚	3.6:1	86.4	86.2
硬脂酸钙	3.6:1	101.7	101.1
硬脂酸镁	3.6:1	100.3	98.9
胶态二氧化硅	3.6:1	99.8	98.5

表 6.

阿仑特罗的稳定性(残渣率%)			
种类	混合比例	干燥	含水量(%)
骨化三醇+阿仑特罗	—	99.0	100.2
甘露糖醇	1:1	96.2	99.3
白糖	1:1	100.8	97.8
纤维乳糖 (Cellactose)	1:1	95.4	97.3
β -环糊精	1:1	100.2	98.4
聚乙烯吡咯酮	1:1	97.7	99.9
羟丙基甲基纤维素	1:1	98.2	96.1
羟丙基纤维素	1:1	75.7	85.2
十二烷基硫酸钠	5:2	100.4	99.7
低级取代羟甲基纤维素	5:2	98.1	98.7
交联羧甲基纤维素钠	5:2	100.0	97.4
交联羧甲基纤维素钙	5:2	98.0	97.1
交联聚乙烯吡咯酮	5:2	100.2	97.6
丁基化羟基甲苯	5:2	100.6	99.1
丁基化羟基苯甲醚	5:2	97.9	97.2
DL- α -生育酚	5:2	94.2	99.0
硬脂酸钙	5:2	95.4	98.3
硬脂酸镁	5:2	97.7	98.4
胶态二氧化硅	5:2	99.0	100.1

上面表 5 和 6 结果表明：甘露糖醇作为一种赋形剂，聚乙烯吡咯酮作为一种粘合剂，硬脂酸钙或硬脂酸镁作为一种润滑剂，分别在其指定的领域中具有优良的性能。起先，作为抗氧化剂的丁基化羟基甲苯和丁基化羟基苯甲醚，被认为影响骨化三醇的稳定性，但是另外的实验证实它们只是在分析水平影响骨化三醇，并且考虑到它们仅仅是微量，不会引起任何问题。结果，被加入药剂中的添加剂选择如下：甘露糖醇作为一种赋形剂，聚乙烯吡咯酮作为一种粘合剂，硬脂酸钙作为一种润滑剂，

丁基化羟基甲苯和丁基化羟基苯甲醚作为抗氧化剂，十二烷基硫酸钠作为一种吸收增强剂。

制剂实施例

将按照本发明的药剂制备成裸片、肠溶片、颗粒剂、肠溶颗粒剂、胶囊和肠溶胶囊的形式。

制剂实施例 1-3: 裸片的制备

按照下面表 7 中所示的组成和含量制备裸片。

首先，将 D-甘露糖醇加入由骨化三醇和乙醇组成的混合物中，然后加入乙醇、抗氧化剂和粘合剂。

与制备骨化三醇的步骤分开，将其他成分阿仑特罗、甘露糖醇、吸收增强剂混合，然后向其中加入乙醇和粘合剂。然后，将骨化三醇和阿仑特罗混合，并加入崩解剂和润滑剂，然后压片。

表 7.

种类		制剂实施例 (mg)		
		1	2	3
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	103.23	102.78	37.23
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	0.12	0.12	0.12
	丁基化羟基苯甲醚	0.12	0.12	0.12
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	3	3	3
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
缓释剂	羟丙基甲基纤维素	-	-	24
	甲基纤维素	-	-	48
崩解剂	交联羧甲基纤维素钠	6	6	-
吸收增强剂	十二烷基硫酸钠	-	0.45	-
润滑剂	硬脂酸钙	1	1	1

制剂实施例 4-6: 肠溶片的制备

除了用肠溶包衣溶液包覆制剂实施例 1-3 中制备的裸片外, 按照与上述制剂实施例 1-3 中相同的方法制备肠溶片, 其组份和含量显示在下表 8 中。

表 8.

种类		制剂实施例 (mg)		
		4	5	6
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	103.23	102.78	37.23
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	0.12	0.12	0.12
	丁基化羟基苯甲醚	0.12	0.12	0.12
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	3	3	3
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
缓释剂	羟丙基甲基纤维素	-	-	24
	甲基纤维素	-	-	48
崩解剂	交联羧甲基纤维素钠	6	6	-
吸收增强剂	十二烷基硫酸钠	-	0.45	-
润滑剂	硬脂酸钙	1	1	1
肠溶包衣剂	羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯	9.5	9.5	9.5
增塑剂	柠檬酸三乙酯	0.5	0.5	0.5

制剂实施例 7-9: 颗粒剂的制备

如下列表 9 所示制备颗粒剂。

首先, 将 D-甘露糖醇加入一种由骨化三醇和乙醇组成的混合物中, 然后加入乙醇、抗氧化剂和一种粘合剂。然后用一种常规的粉碎机将整个混合物粉碎成 14-35 目大小并在 40℃ 下干燥以获得骨化三醇颗粒。

与制备骨化三醇的步骤分开, 将其它成分阿仑特罗、甘露糖醇、吸收增强剂混合, 然后向上述混合物中再加入乙醇和一种粘合剂。然后用一种常规的粉碎机粉碎成 14-35 目大小并在 40℃ 下干燥以获得阿仑特罗颗粒。然后, 将骨化三醇颗粒和阿仑特罗颗粒混合, 并加入一种崩解剂和一种润滑剂, 然后压片。

表 9.

种类		制剂实施例 (mg)		
		7	8	9
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	961.47	961.02	361.47
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	1	1	1
	丁基化羟基苯甲醚	1	1	1
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	25	25	25
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
缓释剂	羟丙基甲基纤维素	-	-	200
	甲基纤维素	-	-	400
吸收增强剂	十二烷基硫酸钠	-	0.45	-
润滑剂	硬脂酸钙	5	5	5

制剂实施例 10-12: 肠溶颗粒剂的制备

除了用肠溶包衣溶液包覆制剂实施例 7-9 中制备的颗粒外, 按照与上述制剂实施例 7-9 中相同的方法制备肠溶片, 其组份和含量显示在下表 10 中。

表 10.

种类		制剂实施例 (mg)		
		10	11	12
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	751.87	751.42	271.87
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	0.8	0.8	0.8
	丁基化羟基苯甲醚	0.8	0.8	0.8
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	40	40	40
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
缓释剂	羟丙基甲基纤维素	-	-	160
	甲基纤维素	-	-	320
吸收增强剂	十二烷基硫酸钠	-	0.45	-
肠溶包衣剂	羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯	146.4	146.4	146.4
增塑剂	脂肪酸甘油酯	24.4	24.4	24.4
润滑剂	滑石	29.2	29.2	29.2

制剂实施例 13-15：胶囊的制备

如下列表 11 所示制备胶囊。

首先，将 D-甘露糖醇加入由骨化三醇和乙醇组成的混合物中，然后加入乙醇、抗氧化剂和粘合剂。然后用一种常规的粉碎机将整个混合物粉碎成 14-35 目大小并在 40℃ 下干燥以获得骨化三醇颗粒。

与制备骨化三醇的步骤分开，将其它成分阿仑特罗、甘露糖醇、吸收增强剂混合，然后向上述混合物中再加入乙醇和粘合剂。然后用一种常规的粉碎机粉碎成 14-35 目大小并在 40℃ 下干燥以获得阿仑特罗颗粒。然后，将骨化三醇颗粒和阿仑特罗颗粒混合，并加入一种崩解剂和一种润滑剂，然后装入胶囊。

表 11.

种类		制剂实施例 (mg)		
		13	14	15
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	182.07	181.62	67.07
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	0.2	0.2	0.2
	丁基化羟基苯甲醚	0.2	0.2	0.2
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	5	5	5
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
缓释剂	羟丙基甲基纤维素	—	—	40
	甲基纤维素	—	—	80
崩解剂	交联羧甲基纤维素钠	5	5	—
吸收增强剂	十二烷基硫酸钠	—	0.45	—
润滑剂	硬脂酸钙	1	1	1
胶囊	空胶囊 # 2 ¹⁾	64	64	64
2) SEOHEUNG 胶囊有限公司 (韩国) 的产品				

制剂实施例 16-18: 肠溶胶囊的制备

除了用肠溶包衣溶液包覆组份外, 按照与上述制剂实施例 13-15 中相同的方法制备肠溶颗粒剂并最后装入胶囊, 其组份和含量显示在下表 12 中。

表 12.

种类		制剂实施例 (mg)		
		16	17	18
主要成分	阿仑特罗	6.53	6.53	6.53
	骨化三醇	0.0005	0.0005	0.0005
赋形剂	D-甘露糖醇	178.07	177.62	63.07
抗氧化剂	丁基化羟基甲苯	0.2	0.2	0.2
	丁基化羟基苯甲醚	0.2	0.2	0.2
粘合剂	聚乙烯吡咯酮	10	10	10
溶剂	乙醇	适量	适量	适量
	羟丙基甲基纤维素	—	—	40
缓释剂	甲基纤维素	—	—	80
	交联羧甲基纤维素钠	5	5	—
崩解剂	十二烷基硫酸钠	—	0.45	—
肠溶包衣剂	羟丙基甲基纤维素邻	36.6	36.6	36.6
	苯二甲酸酯			
增塑剂	脂肪酸甘油酯	6.1	6.1	6.1
润滑剂	滑石	7.3	7.3	7.3
胶囊	空胶囊 # 1 ²⁾	77	77	77
2) SEOHEUNG 胶囊有限公司 (韩国) 的产品				

实验例 6：肠溶片的稳定性试验

将按照制剂实施例 5 制备的肠溶片，在一种加速条件下（40℃，相对湿度 75%）贮存两个月，并对片剂的稳定性进行检验三次，结果显示于下表 13 中。

在片剂稳定性的评价中，性质通过裸视观察评价，通过 HPLC 验证。骨化三醇和阿仑特罗的含量也通过 HPLC 测定。

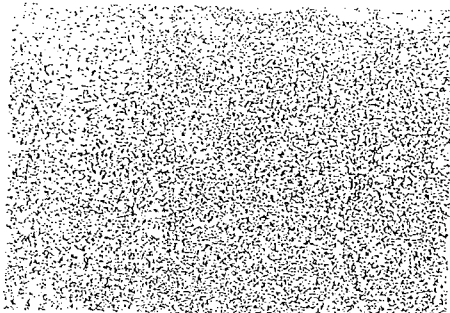
表 13.

试验项目	第一次试验		第二次试验		第三次试验	
	开始	两个月后	开始	两个月后	开始	两个月后
描述	白色圆形薄膜包衣片	白色圆形薄膜包衣片	白色圆形薄膜包衣片	白色圆形薄膜包衣片	白色圆形薄膜包衣片	白色圆形薄膜包衣片
鉴定	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性	阳性
骨化三醇含量(%)	109.6	109.5	110.8	109.1	109.8	109.8
阿仑特罗含量(%)	99.8	98.9	100.3	99.3	100.0	99.8

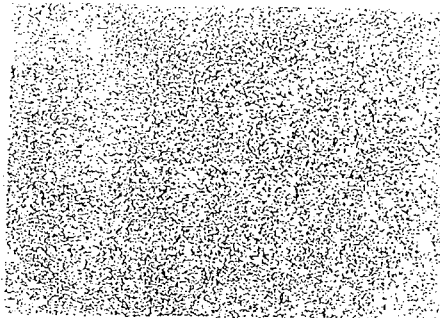
显示于表 13 的结果表明：在室温和加速条件下，该药片在持续两个月的稳定性试验中均保持稳定。

图 1

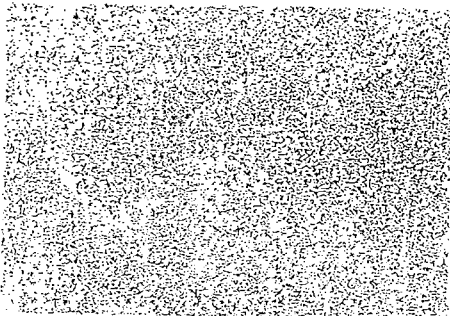
(A)



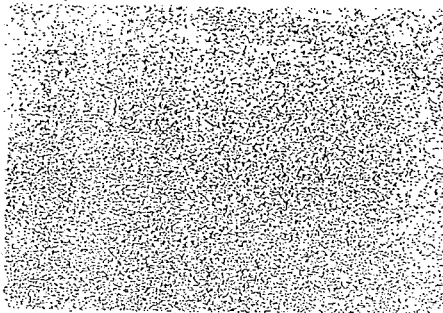
(B)



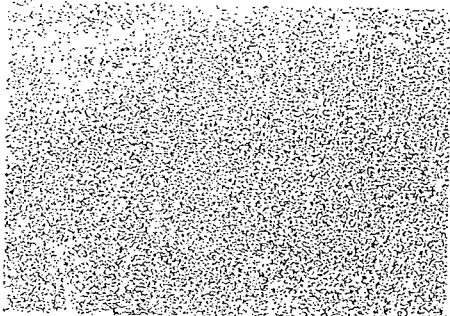
(C)



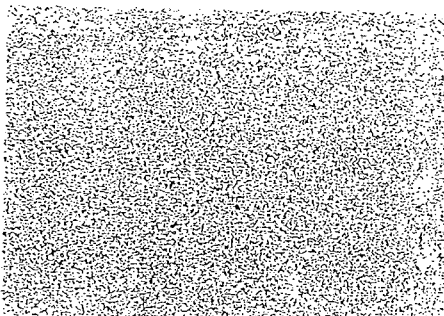
(D)



(E)



(F)



(G)

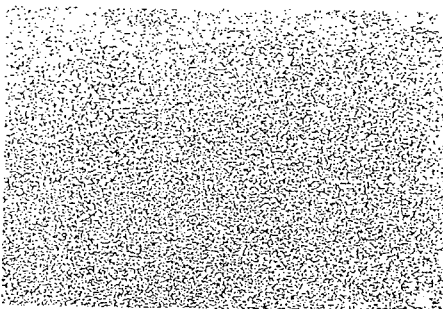


图 2

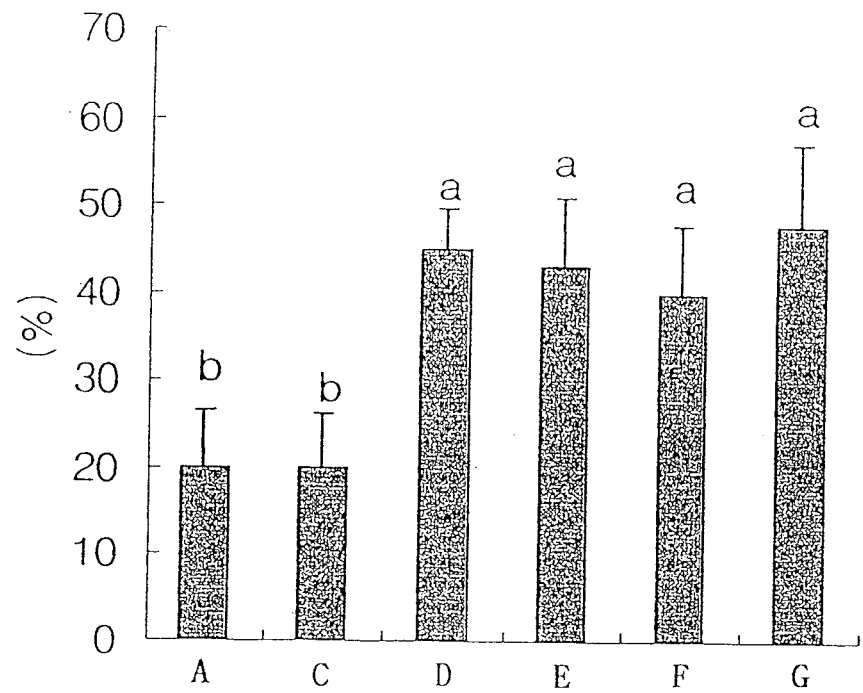
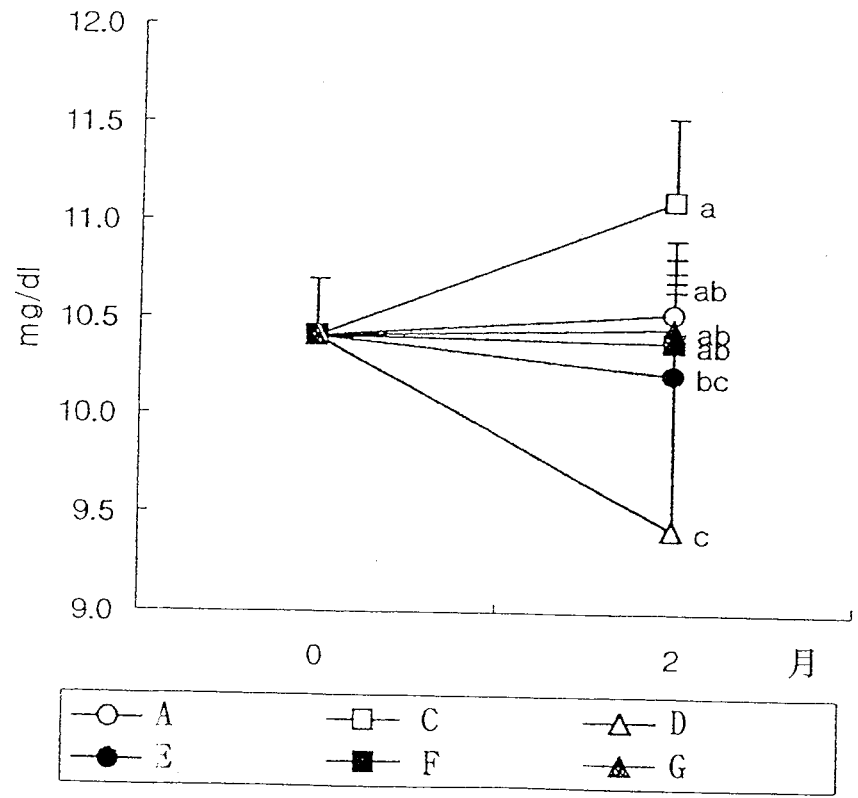
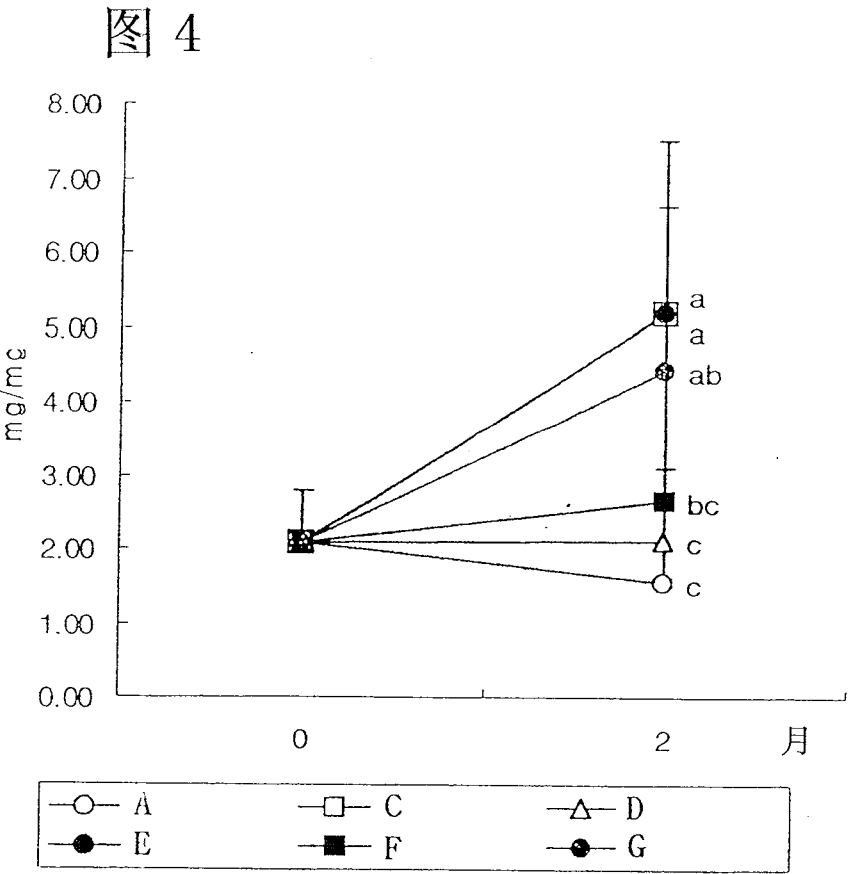
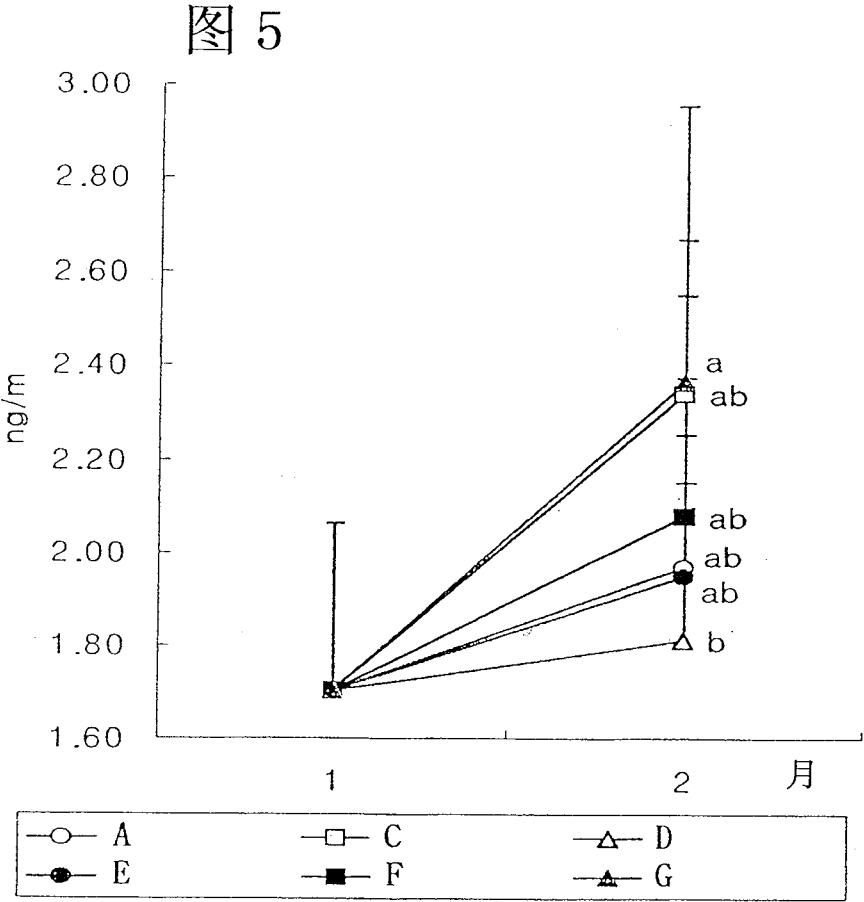
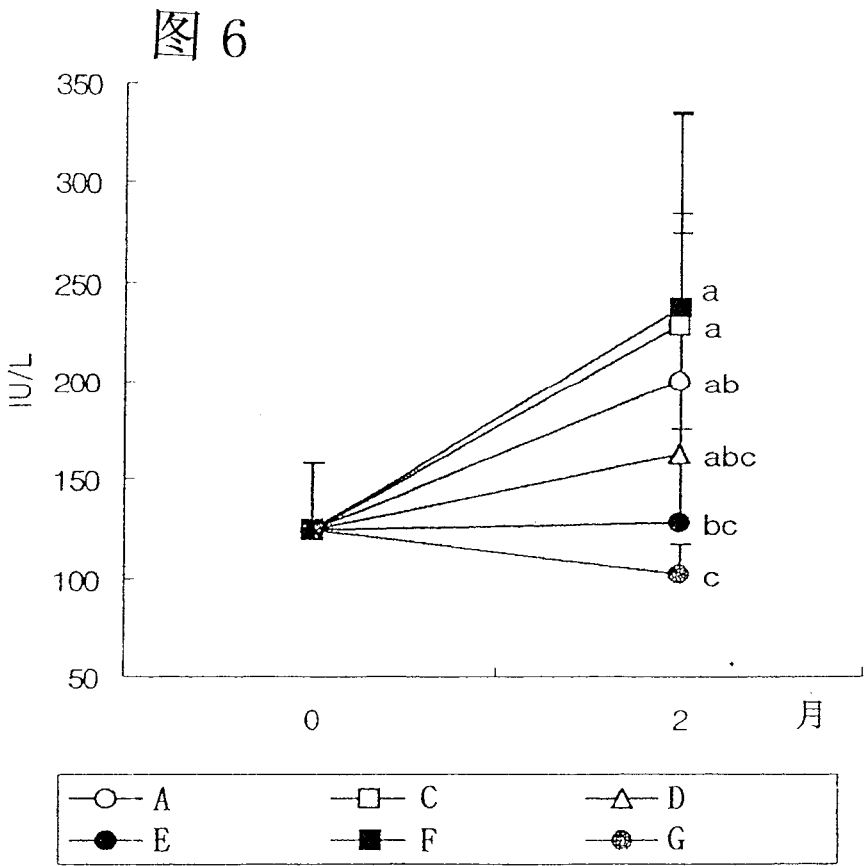


图 3









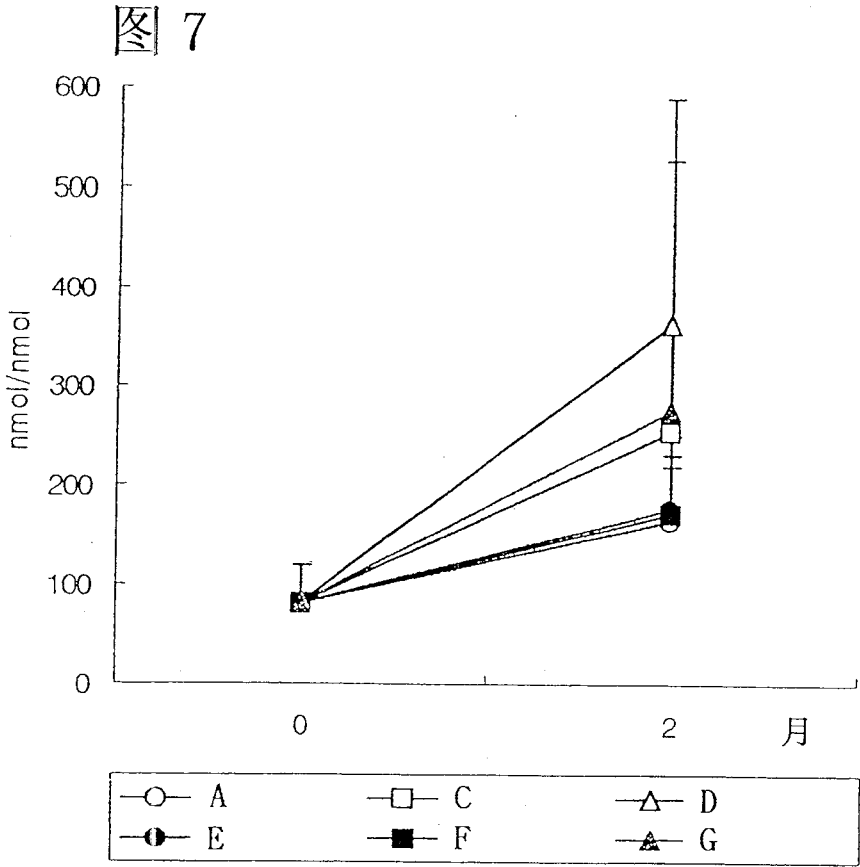


图 8

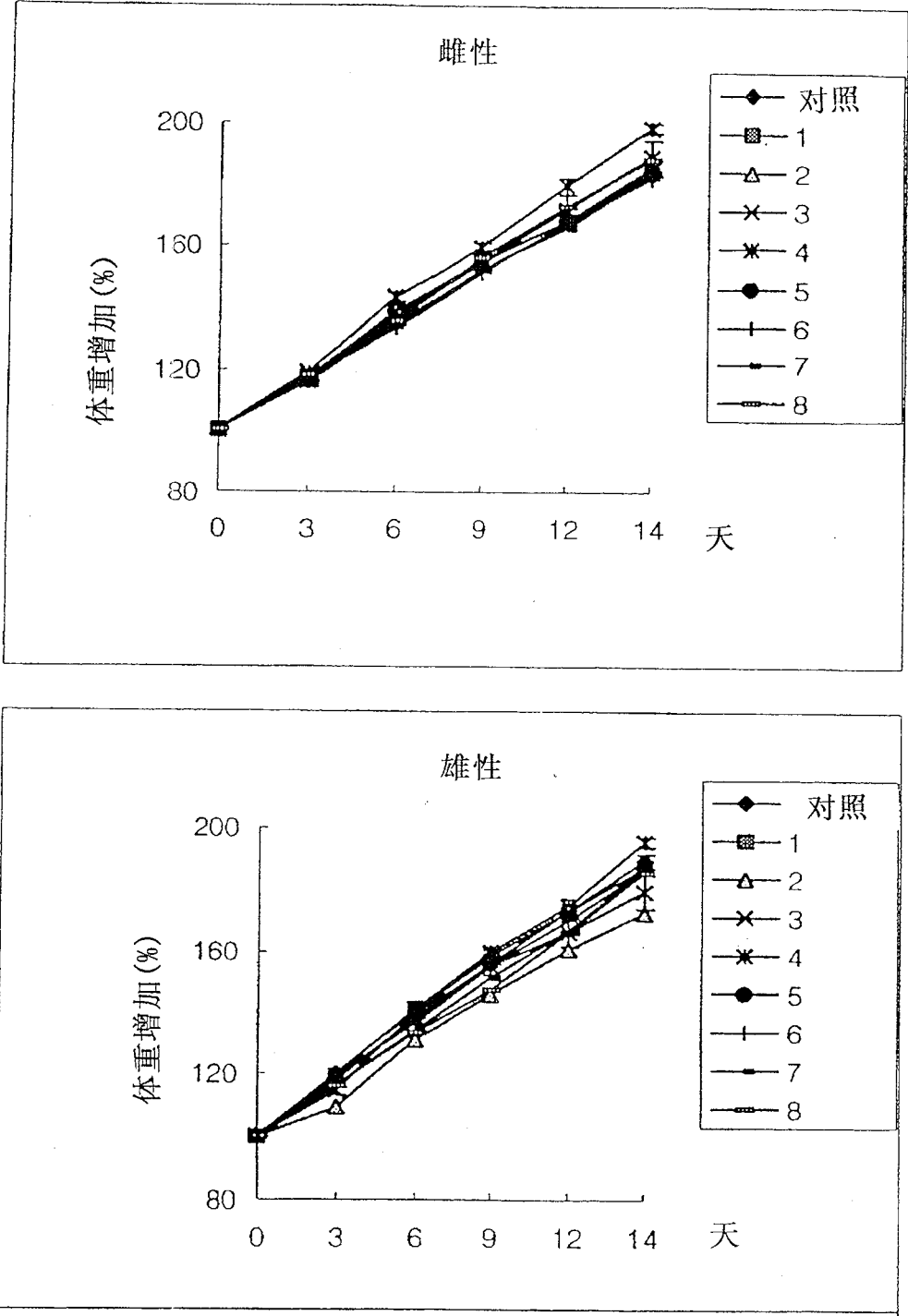


图 9

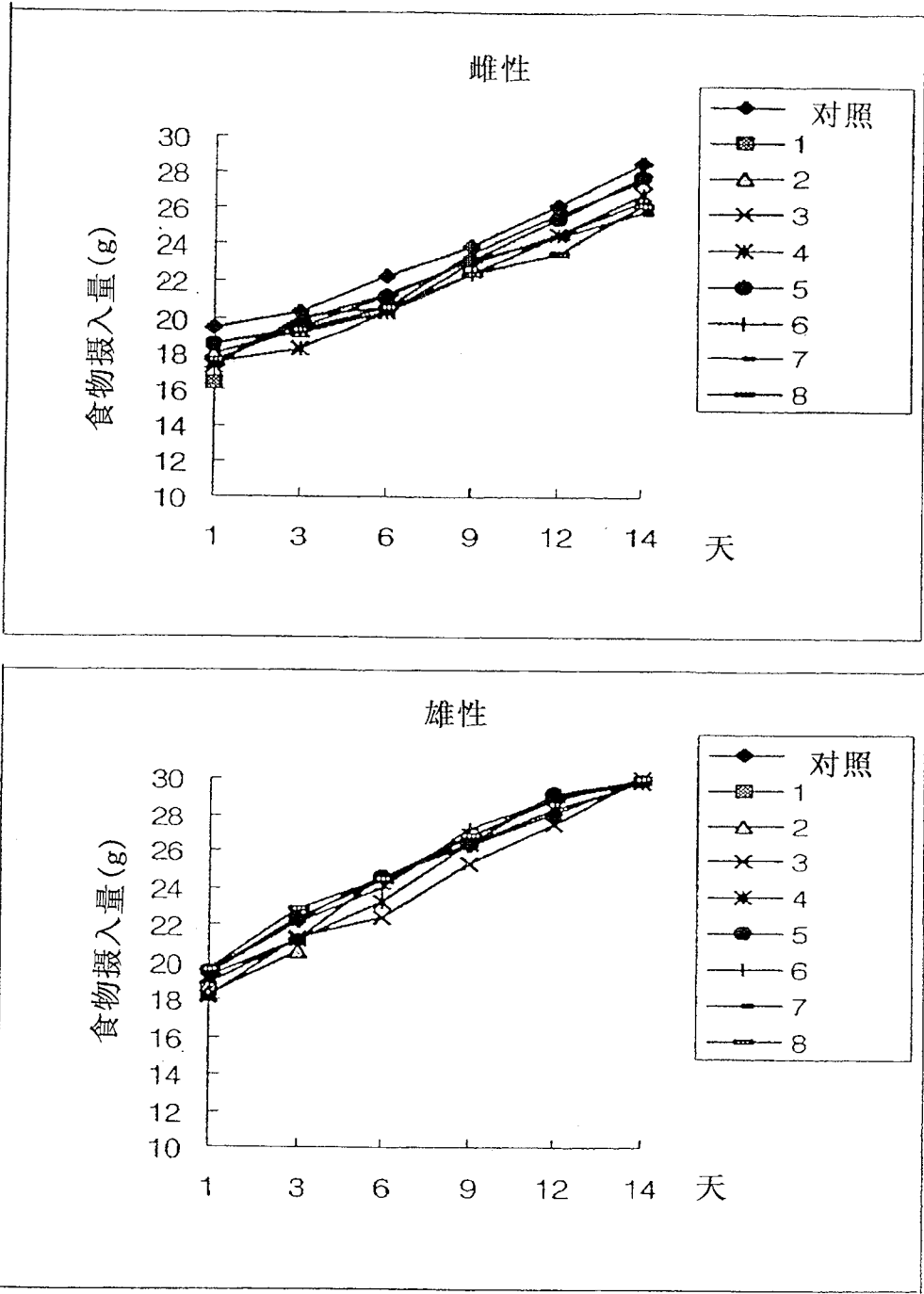


图 10

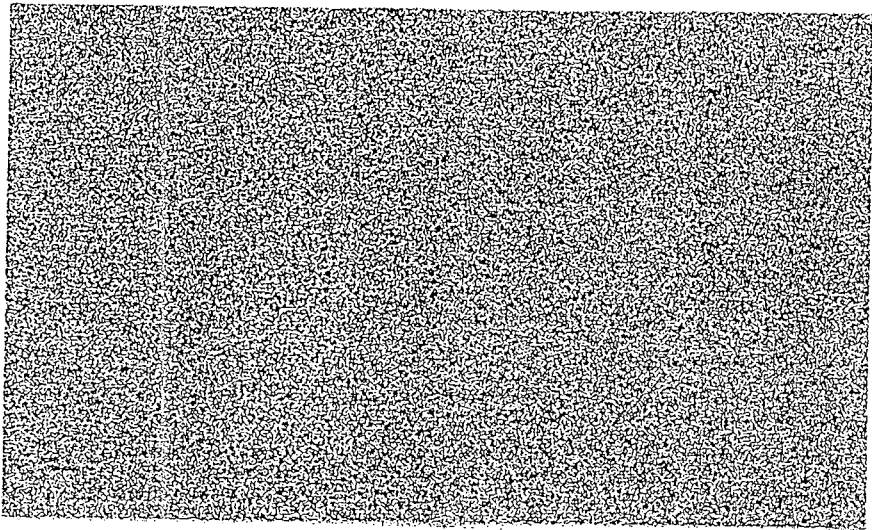


图 11

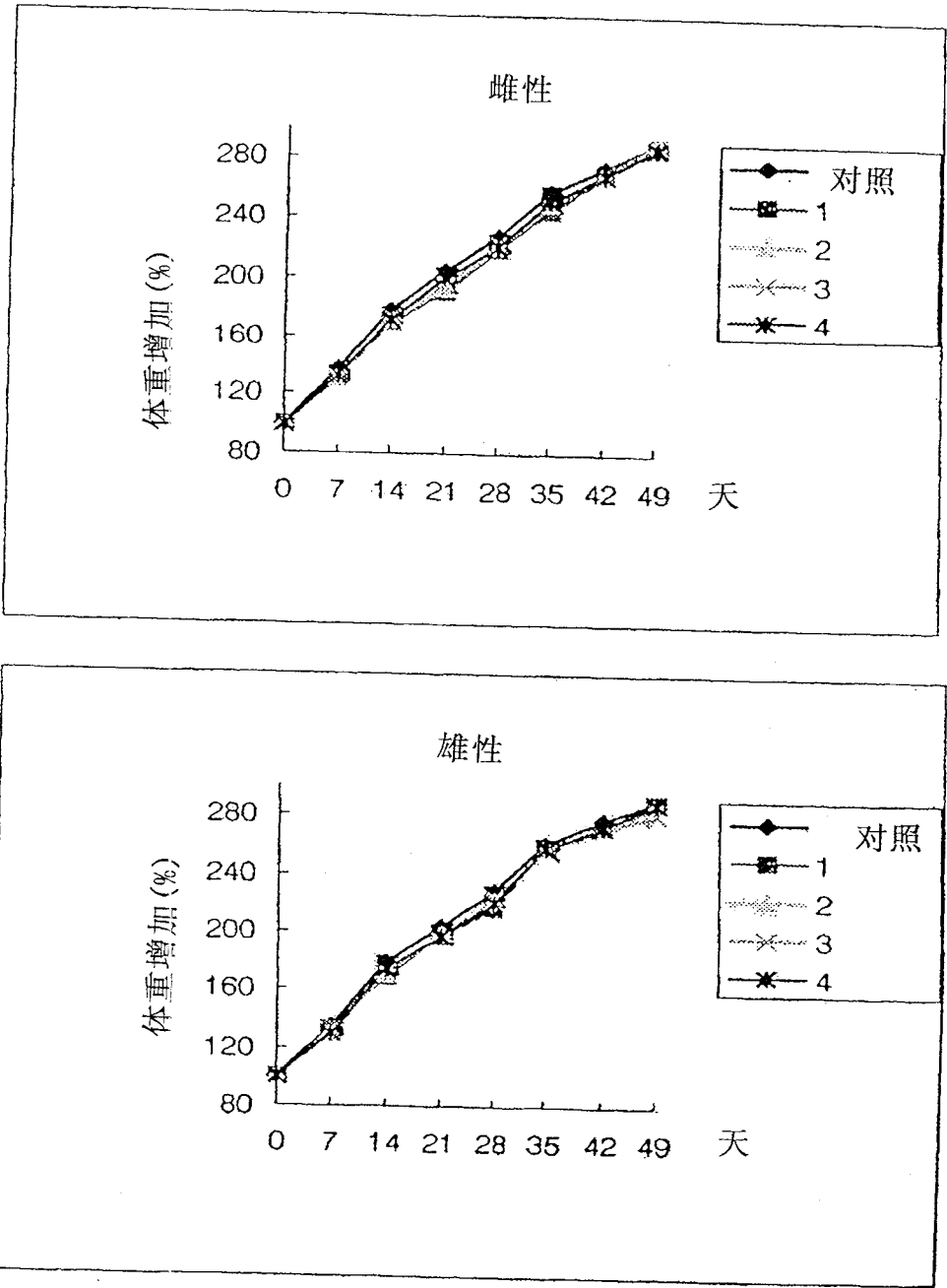


图 12

