

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/675

A61K 31/185

A61K 31/724

A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824930.8

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694713A

[22] 申请日 2003.9.4 [21] 申请号 03824930.8

[30] 优先权

[32] 2002.9.5 [33] IN [31] 809/MUM/02

[86] 国际申请 PCT/IN2003/000298 2003.9.4

[87] 国际公布 WO2004/022699 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.5.8

[71] 申请人 印度血清及疫苗有限公司

地址 印度塔纳

[72] 发明人 G·V·达塔里 S·A·派

S·H·里范卡 K·S·普拉韦恩

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘维升 李炳爱

权利要求书 3 页 说明书 15 页

[54] 发明名称 oxazaphosphorine 和美司钠的液态稳定组合物

[57] 摘要

本发明描述了用于肠胃外给药的低毒、稳定的含有 oxazaphosphorine 和美司钠的组合物。该方法主要要求将 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂加到醚化 β -环糊精的水溶液中,随后加入美司钠原型或其任选含有醚化的 β -环糊精的水溶液。优选的是,oxazaphosphorine 抗肿瘤剂是异环磷酰胺,醚化的 β -环糊精是 2-羟丙基- β -环糊精。

ISSN 1008-4274

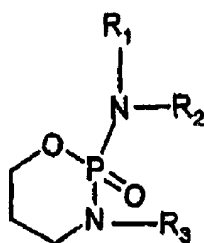
1. 制备低毒性、稳定的包含 oxazaphosphorine 的组合物的方法，其中组合物含有 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂、美司钠和醚化的 β -环糊精，该方法包括以下步骤：

5 i) 将 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂加到醚化的 β -环糊精水溶液中；

ii) 将美司钠原型或其任选包含醚化的 β -环糊精的水溶液加到步骤 I) 的 oxazaphosphorine 溶液中；和

iii) 混合得到的水溶液并任选用水补足体积。

10 2. 如权利要求 1 的方法，其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂为下式：



其中 R_1 、 R_2 和 R_3 中至少两个独立的为 2-氯乙基，剩下的 R 基是氢。

15 3. 如权利要求 2 的方法，其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂是环磷酰胺 ($R_1 = R_2 =$ 氯乙基 & $R_3 =$ 氢)。

4. 如权利要求 2 的方法，其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂是异环磷酰胺 ($R_1 = R_3 =$ 氯乙基 & $R_2 =$ 氢)。

20 5. 如前述任一权利要求的方法，其中使用的醚化 β -环糊精是羟丙基 β -环糊精 (HPBCD)。

6. 如权利要求 5 的方法，其中 HPBCD 的摩尔取代为约 0.5 到约 1.2。

7. 如前述任一权利要求的方法，其中组合物中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量为约 1mg/ml 到约 1000mg/ml。

25 8. 如权利要求 7 的方法，其中所述 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量为约 25mg/ml 到约 750mg/ml。

9. 如权利要求 8 的方法, 其中所述 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量为约 50mg/ml 到约 500mg/ml。
10. 如权利要求 9 的方法, 其中所述 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量为约 50mg/ml。
- 5 11. 如权利要求 9 的方法, 其中所述 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量为约 500mg/ml。
12. 如前述任一权利要求的方法, 其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂和美司钠的重量比在约 20:1 到 1:2 的范围内。
13. 如权利要求 12 的方法, 其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂
10 和美司钠的重量比在约 10:1 到 1:1 的范围内。
14. 如权利要求 13 的方法, 其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂和美司钠的重量比为 10:2。
15. 如权利要求 13 的方法, 其中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂和美司钠的重量比为 10:6。
- 15 16. 如前述任一权利要求的方法, 其中组合物中醚化 β -环糊精的含量为约 1%到约 60%w/v。
17. 如权利要求 16 的方法, 其中所述醚化 β -环糊精的含量为约 2.5%到约 40%w/v。
18. 如权利要求 17 的方法, 其中所述醚化 β -环糊精的含量为
20 约 5%到约 20%w/v。
19. 如前述任一权利要求的方法, 其中将一种或多种常规肠胃外添加剂加到权利要求 1 步骤 (i) 或权利要求 1 的步骤 (ii) 的水溶液中或水中以用来补足权利要求 1 步骤 (iii) 的体积。
20. 如前述任一权利要求的方法, 其中所述所得水溶液的混合物
25 通过无菌过滤器过滤灭菌。
21. 如权利要求 20 的方法, 其中将无菌过滤器中的滤出液无菌地填充到无菌容器中并密封填充的容器。
22. 如权利要求 1 的方法, 其基本如前文参照任意实施例所述。
- 30 23. 由前述任一权利要求的方法获得的含有 oxazaphosphorine 的稳定组合物。
24. 由前述任一权利要求的方法制备的含有

oxazaphosphorine 的稳定组合物。

25. 如权利要求 23 或权利要求 24 定义的含有 oxazaphosphorine 的稳定组合物在生产治疗恶性疾病的药物中的用途。

- 5 26. 一种治疗恶性疾病的方法，其包含给患有所述疾病的患者以有效量的如权利要求 23 或权利要求 24 定义的灭菌稳定的含有 oxazaphosphorine 的组合物。

oxazaphosphorine 和美司钠的液态稳定组合物

发明领域

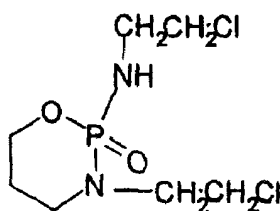
- 5 本发明涉及制备低毒性、稳定含水的即用 (ready-to-use) 的包含 oxazaphosphorine 的组合物的方法, 该组合物含有 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂、美司钠和醚化 β -环糊精。其特别但不唯一用于制备包含异环磷酰胺、美司钠和 2-羟丙基- β -环糊精 (此后称为“HPBCD”) 适于肠胃外给予人类和其它哺乳动物的组合物。本发
- 10 明更具体地涉及制备清澈含水低毒性的异环磷酰胺组合物, 该组合物包含异环磷酰胺、美司钠、HPBCD, 其在一段时间内是稳定的, 因此使得它们适于临床备用。

发明背景

- 15 用于治疗恶性疾病的两种主要药物是烷化剂和抗代谢药物。异环磷酰胺和环磷酰胺是属于烷化剂的 oxazaphosphorine 抗肿瘤药物, 而且应用广泛。

- 异环磷酰胺以稀释到低于 4% 的溶液通过注射或经输注静脉内给药, 并用于治疗各种实体瘤包括子宫颈、子宫内膜、肺、卵巢、睾丸
- 20 和胸腺瘤以及治疗肉瘤和治疗伯基特淋巴瘤。

异环磷酰胺被认可的名称是 3-(2-氯乙基)-2-[(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1, 3, 2-oxazaphosphorine-2-氧化物, 其以下式表示:

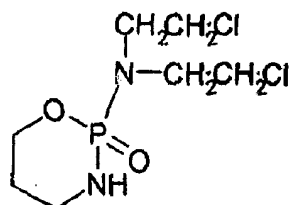


- 25 它是白色吸湿性结晶粉末, 具有 40°C 的低熔点。低于熔点时它也开始烧结。异环磷酰胺的这些特性使得它很难用于干粉无菌填充, 因

为必需要精确控制温度和湿度。此外，由于异环磷酰胺粉末要无菌地填入到灭菌容器内，因此必需要最大限度地提高警惕以保持产品的无菌状态。

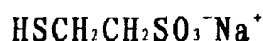
5 异环磷酰胺粉末在水中可以自由溶解。其水溶液对 pH 的变化敏感。

其它的 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂也面临类似的问题，例如环磷酰胺，其被认可的名称是 2-[二(2-氯乙基)氨基]四氢-2H-1,3,2-oxazaphosphorine-2-氧化物，其以下式表示：



10

oxazaphosphorine 抗肿瘤药对泌尿道是有毒的，并可以涉及肾以及膀胱。因此，建议将它们与 2-巯基乙磺酸盐尤其是美司钠联合给药。美司钠被认可的名称是 2-巯基乙磺酸钠，其以下式表示：



15 美司钠有较高的水溶性。它能在用异环磷酰胺或环磷酰胺治疗的患者中预防泌尿道上皮毒性。在肾脏中美司钠二硫化物，美司钠的无活性代谢物被还原为游离的美司钠，其具有可与异环磷酰胺的代谢物反应的巯基基团，环磷酰胺，包括丙烯醛，被认为是在膀胱产生毒性作用的原因。

20 美司钠的静脉给药日剂量计算为等于异环磷酰胺总日剂量的 60%，当短时输注的异环磷酰胺的剂量低于 $2.5\text{g}/\text{m}^2/\text{天}$ 时，在给予每个剂量的异环磷酰胺前和 4 小时以及 8 小时后以 3 个大药丸的剂量给药 15 分钟。对于用于异环磷酰胺的连续输注，美司钠可以异环磷酰胺总剂量的 20% 的大药丸剂量给药，然后持续输注等于 40% 异环磷酰胺剂量的美司钠，在异环磷酰胺输注完成后持续 12 到 24 小时。

25

美司钠也可以以等于 60% 异环磷酰胺剂量的量持续输注给药。没有

临床数据能证实美司钠的剂量高于异环磷酰胺标准剂量的 60%W/W。对超过 2.5g/m² 的异环磷酰胺高剂量来说,需要制定美司钠的剂量方案以最大限度地对抗尿毒性。

粉末形式的可商购产品的缺点在于:

5 1. 当标准剂量大于 1g/天时,需要不止一个小瓶去重构,然后稀释至所需浓度。

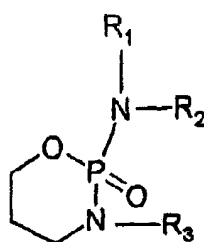
2. 在高剂量的异环磷酰胺治疗中,要求高达八个 1g 小瓶去重构并稀释到所需浓度。

10 3. 由于美司钠需要与异环磷酰胺同时给药,因此重构后异环磷酰胺要与美司钠混合。

许多实验室/发明者都试图制备能含有异环磷酰胺和美司钠的即用肠胃外给药的溶液以克服重构期间以及与美司钠混合期间使用异环磷酰胺带来的问题。

15 US-A-4959215 公开了稳定的异环磷酰胺-美司钠冻干物,其包括异环磷酰胺、0.05 到 1.0 重量份的美司钠和 0.1 到 17 重量份的己糖醇,通过冷冻干燥异环磷酰胺、美司钠和己糖醇优选甘露醇的水或水-醇溶液来制备。没有文献列举了任何环糊精。冻干物是物理稳定的,不变色。还要求保护与干燥填充的异环磷酰胺相比明显更高的溶出速率。

20 US-A-4952575 公开了包含 10 到 70%w/v 的下式 oxazaphosphorine 的溶解在 80 到 100% v/v 乙醇中的组合物:

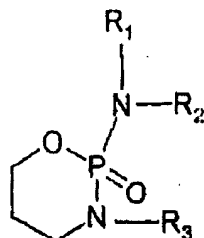


25 其中 R₁、R₂ 和 R₃ 中至少两个独立地为 2-氯乙基或 2-甲烷磺酰基氧乙基,任何其余的 R 基均选自氢、甲基和乙基。即使异环磷酰胺的降解已显示为最小化,但是使用如此高浓度的溶剂也会导致其它问题例

如挥发性、生产期间的操作、与血的互溶。由于乙醇是药理学活性物，因此其也可以影响人的异环磷酰胺醇溶液给药。

WO-A-9918973 公开了含有至少一个下式的 oxazaphosphorine 的液态稳定备用组合物：

5

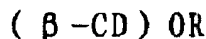


其中 R_1 、 R_2 和 R_3 独立地为甲基、乙基、2-氯乙基、2-甲烷磺酰基氧乙基或，除 R_3 为以外，为氢，以及 R_1 、 R_2 和 R_3 中至少两个为 2-氯乙基和/或 2-甲烷磺酰基氧乙基，

10 其中组合物包含在药学上有很好的耐受性的化合物，其在水溶液中形成氯离子。我们独立声明的是，组合物可包括环糊精，优选 α -环糊精，或者其乙氧基化衍生物作为紧张性调节剂，和美司钠，但没有示例表明有任何组合物包含了 β 环糊精或美司钠。

15 US-A-4879286 公开了能稳定贮存中环磷酰胺液态瘤消解制剂，其中环磷酰胺被制成位于载体中的备用稀释溶液，载体包含 50 到 100% 选自丙二醇、聚乙二醇和甘油的有机多元醇以及 0 到 50% 的水。制剂可以和醇联用，例如 10 到 30% 乙醇（基于制剂总重计）。

20 US-A-6407079 公开了水溶性很小或水不溶性药物的水溶性和稳定性能通过化合物与部分醚化的下式 β -环糊精的包含体制剂得到改善：



其中 R 是羟烷基，任选一些是烷基，

其水溶性大于每 100ml 水 1.8g。优选 R 选自羟乙基、羟丙基或二羟丙基。该专利披露了环糊精用于溶解水溶性很小/水不溶性药物的用途，没有表明它对水溶性物质像异环磷酰胺和美司钠的有效性。

25 US-A-4727064 公开了亲脂性药物能通过将药物溶解在水溶性环糊精衍生物固有的无定形混合物中形成溶解的环糊精/药物复合物而

被稳定，任选冻干或蒸发得到的溶解复合物以提供粉末形式的固态环糊精/药物复合物。环糊精衍生物的示例性混合物有用例如环氧丙烷、乙二醇、碘乙酰胺、氯醋酸酯或 2-二乙氧氯乙烷通过非选择性烷基化 α -、 β -或 γ -环糊精得到的物质。环糊精能被羟烷基羧酰胺、二乙氧乙基、羧甲基或羧酰胺甲基 (rboxamidomethyl) 和示例性环糊精包括羟丙基- β -环糊精取代。该专利没有暗示环糊精对水溶性物质像异环磷酰胺和美司钠的用途。

WO-A-0139749 披露了具有延长甜味的固态制剂形式的快速溶解药物组合物，其包括 (a) 至少一种药物，(b) 至少一种水溶性糖，(c) 至少一种常规快速释放形式的非糖甜味剂和 (d) 至少一种粘膜粘性 (mucoadhesive) 缓慢释放形式的非糖甜味剂。示例性药物包括异环磷酰胺和美司钠，示例性粘膜粘性剂包括环糊精。没有任何包含异环磷酰胺、美司钠和环糊精中的二个或多个物质的组合物实例。

由于美司钠要求与异环磷酰胺的每个剂量同时给予，因此本发明的一方面是，将异环磷酰胺和美司钠组合在同一个组合物中以避免分开给予美司钠的不便。本发明的另一个方面是将异环磷酰胺和美司钠与 HPBCD 组合得到稳定的组合物，这样产品就很易于销售并且便于使用而没有重构的步骤并减少了操作。令人惊奇的是，本发明的方法，其中组合了异环磷酰胺、美司钠和 HPBCD，也产生了具有低毒性的组合物。

本发明的主要目的在于由此研制出制备低毒性、稳定的异环磷酰胺组合物的方法，其中组合物包含异环磷酰胺、美司钠和 HPBCD，有或没有常规的肠胃外添加剂，其克服了现有技术中的所有不利之处，形成了适于人类和哺乳动物通过肠胃外给药的组合物。

发明简述

因此，本发明涉及制备低毒性、稳定的包含 oxazaphosphorine 的组合物的方法，其中组合物包含 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂、美司钠和醚化 β -环糊精；该方法包括以下步骤：

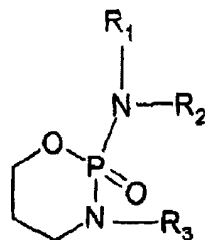
i) 将 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂加到醚化 β -环糊精的水溶液中；

ii) 将美司钠或其水溶液 (任选包含醚化的 β -环糊精) 加到步骤

- i) 得到的 oxazaphosphorine 溶液中；和
 iii) 混合得到的水溶液，和任选用水补足体积。

本发明实施方案的详细描述

- 5 本发明使用的 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂是下式所示的物质：



- 其中 R_1 、 R_2 和 R_3 中至少两个独立地为 2-氯乙基，剩下的 R 基是氢。
 更优选的是，oxazaphosphorine 抗肿瘤剂是环磷酰胺 ($R_1=R_2=$ 氯乙基
 10 $\&R_3=$ 氢) 或特别是异环磷酰胺 ($R_1=R_3=$ 氯乙基 $\&R_2=$ 氢)。

- 醚化的 β -环糊精优选具有至少一些被羟烷基醚化的羟基，且任选
 其它羟基用烷基醚化，水溶性大于约 1.8g/100ml 水。优选的羟烷基是
 羟乙基、二羟丙基或尤其是羟丙基，烷基（如果存在的话）是甲基或
 乙基。羟烷基的摩尔取代 (MS)（以每脱水葡萄糖单元的烷基化羟基氧
 15 化物的摩尔数计算）适宜为约 0.05 到约 10，优选约 0.2 到约 2，尤
 其是约 0.5 到约 1.2。

组合物中 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂的含量通常为约 1mg/ml 到
 约 1000mg/ml，优选约 25mg/ml 到约 750mg/ml，更优选约 50mg/ml 到
 约 500mg/ml。

- 20 oxazaphosphorine 抗肿瘤剂与美司钠的比例通常在约 20:1 到约
 1:2 的范围内（基于重量），优选在约 10:1 到约 1:1 的范围内（基于
 重量）。

组合物中醚化 β -环糊精的含量通常为约 1%到约 60% w/v，优选约
 2.5%到约 40% w/v，更优选约 5%到约 20% w/v。

- 25 常规的肠胃外添加剂可以存在于水溶液中，将 oxazaphosphorine
 抗肿瘤剂加到其中和 / 或加到加入了美司钠的水溶液中。这些添加剂

也可以以水溶液的形式在将美司钠加到 oxazaphosphorine 溶液前或补足体积前分别加入。这样的添加剂可以是例如通常用于水性肠胃外组合物中的缓冲剂、等渗稀释剂、抗结晶剂、螯合剂或抗氧化剂。

5 缓冲剂选自药学上可接受的缓冲系统，例如磷酸盐缓冲剂、柠檬酸盐缓冲剂、甘氨酸缓冲剂，其包含常用化合物或化合物的混合物，其中化合物选自柠檬酸、柠檬酸钠、柠檬酸钾、甘氨酸、磷酸、磷酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸钾、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、氢氧化钠、氢氧化钾、盐酸。优选使用的缓冲剂是磷酸二氢钠和磷酸氢二钠的混合物。

10 混合水溶液，优选通过强力搅拌混合，得到的溶液一般通过无菌过滤器过滤灭菌。优选的是，溶液连续通过 2μ 和 0.2μ 的过滤器过滤或仅通过 0.2μ 的过滤器过滤。

一般，将滤出液无菌地加到无菌容器中例如小瓶、安瓿、塑料容器并对填充容器进行封口。

15 现在将通过实施例的方式对本发明进行说明。这些实施例仅仅是说明的方式，其并不对发明范围产生任何限制。

这些实施例中使用的异环磷酰胺是遵照 US 药典说明书记载的注射级药物。这些实施例中使用的美司钠是注射级的。使用的羟丙基 β -环糊精 (HPBCD) 由 Wacker Chemie 生产，每葡萄糖单元烷基取代度为
20 0.5 到 1.2 之间。使用的装置是常规类装置；整个过程都在受控的环境区域中进行。这些实施例中使用的水是遵照“注射用水”说明书中记载的注射级用水。这些实施例中使用的所有其它添加剂都是注射级的。

25 实施例 I:

	1. 异环磷酰胺	10g
	2. 美司钠	2g
	3. HPBCD	40g
	4. 磷酸氢二钠	0.1g
30	5. 磷酸二氢钠	0.06g
	6. 水	q. s. 到 200ml

将称量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶在 160ml 水中，加入称量的 HPBCD 并在搅拌下缓慢溶解。把得到的 HPBCD 溶液分为两等份。

在搅拌下将称量的异环磷酰胺逐渐加入到一份缓冲 HPBCD 溶液中并很好地混合。

5 在搅拌下将称量的美司钠逐渐加入到另一份缓冲 HPBCD 溶液中并很好地混合。

将以上制备的美司钠溶液加入到异环磷酰胺溶液中。一起混合得到的溶液。加水至 200ml。产品通过 0.2 μ 过滤器过滤，无菌下填充到灭菌玻璃瓶中。在无菌条件下用涂有 Teflon™ 的灭菌橡胶塞封闭玻璃瓶，并用轻拍式封口物（filp off seals）进行密封。

10

通过高效液相色谱（HPLC）分析该实施例得到的组合物中异环磷酰胺的含量和美司钠的含量，发现其含有 52.92mg/ml 异环磷酰胺和 10.2mg/ml 美司钠。组合物的 pH 为 6.86。

15 **实施例 II:**

在小鼠中对实施例 I 获得的组合物进行急性毒性研究。一种常规制剂，由 M/s. German Remedies 生产的 Holoxan™，在制造商的指导下重构，并在与美司钠（相当于异环磷酰胺含量的 20%）混合后用作对照。用 5%葡萄糖注射液对两个药物溶液进行适当的稀释，静脉给药。

20 将 500mg/kg、700mg/kg 和 900mg/kg 体重剂量的异环磷酰胺给三组不同的动物给药，每组有八只动物。

连续观察动物 14 天，记录 3 天和 7 天末时的死亡率。

我们观察到，实施例 I 组合物的 LD₅₀ 剂量高于常规制剂。

实施例 I 组合物			常规制剂		
死亡率 (%)			死亡率 (%)		
剂量 (mg)	3 天	7 天	剂量 (mg)	3 天	7 天
500	0	0	500	50	75
700	0	50	700	100	100
900	75	100	900	100	100
LD ₅₀	700-900	700	LD ₅₀	500	<500

以上数据清楚地表明实施例 I 组合物比常规制剂的毒性低。

实施例 III:

- | | | |
|---|----------|---------------|
| 5 | 1. 异环磷酰胺 | 10g |
| | 2. 美司钠 | 2g |
| | 3. HPBCD | 20g |
| | 4. 磷酸氢二钠 | 0.1g |
| | 5. 磷酸二氢钠 | 0.06g |
| | 6. 水 | q. s. 到 200ml |

10

将称量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶在 160ml 水中，加入称量的 HPBCD 并在搅拌下缓慢溶解。

在搅拌下将称量的异环磷酰胺逐渐加入到缓冲的 HPBCD 溶液中并混合 3 小时。

- 15 3 小时后，在搅拌下将称量的美司钠逐渐加入到缓冲的异环磷酰胺溶液中。加水至 200ml 并通过 0.2 μ 过滤器过滤，无菌下填充到灭菌玻璃瓶中。在无菌条件下用涂有 Teflon™ 的灭菌橡胶塞封闭玻璃瓶，并用轻拍式封口物进行密封。

20 实施例 IV:

- | | | |
|----|----------|---------------|
| | 1. 异环磷酰胺 | 10g |
| | 2. 美司钠 | 2g |
| | 3. HPBCD | 80g |
| | 4. 磷酸氢二钠 | 0.1g |
| 25 | 5. 磷酸二氢钠 | 0.06g |
| | 6. 水 | q. s. 到 200ml |

用上述含量的组分重复实施例 I 的步骤。

实施例 V:

- | | | |
|----|----------|-----|
| 30 | 1. 异环磷酰胺 | 10g |
| | 2. 美司钠 | 6g |
| | 3. HPBCD | 20g |

4. 磷酸氢二钠 0.1g
5. 磷酸二氢钠 0.06g
6. 水 q. s. 到 200ml

用上述含量的组分重复实施例 I 的步骤。

5

实施例 VI:

1. 异环磷酰胺 10g
2. 美司钠 16g
3. HPBCD 20g
- 10 4. 磷酸氢二钠 0.1g
5. 磷酸二氢钠 0.06g
6. 水 q. s. 到 200ml

用上述含量的组分重复实施例 I 的步骤。

15

实施例 VII:

1. 异环磷酰胺 100g
2. 美司钠 20g
3. HPBCD 10g
4. 水 q. s. 到 200 ml

20 将称量的 HPBCD 溶解在 20ml 水中。搅拌下将异环磷酰胺逐渐加到 HPBCD 溶液中。继续混合直至得到清亮的溶液。搅拌下将美司钠缓慢加到得到的异环磷酰胺溶液中很好地混合直至美司钠完全溶在溶液中。用水将体积调至 200ml。

25 分析该实施例中所得组合物异环磷酰胺和美司钠的含量，发现包含 497.88mg/ml 异环磷酰胺和 98.73mg/ml 美司钠。

实施例 VIII:

1. 异环磷酰胺 100g
2. 美司钠 60g
- 30 3. HPBCD 10g
4. 水 q. s. 到 200 ml

将称量的 HPBCD 溶解在 20ml 水中。搅拌下将异环磷酰胺逐渐加到

HPBCD 溶液中。继续混合直至得到清亮的溶液。搅拌下将美司钠逐渐加到得到的异环磷酰胺溶液中并很好地混合直至美司钠完全溶在溶液中。用水将体积调至 200ml。

分析该实施例中所得到组合物的异环磷酰胺和美司钠的含量，发现包含 492.02mg/ml 异环磷酰胺和 296.18mg/ml 美司钠。

实施例 IX:

- | | | |
|----|-------------|---------------|
| 1. | 异环磷酰胺 | 100g |
| 2. | 美司钠 | 60g |
| 10 | 3. HPBCD | 10g |
| | 4. 磷酸氢二钠 | 0.8g |
| | 5. 磷酸二氢钠 | 0.44g |
| | 6. 乙二胺四乙酸二钠 | 0.01g |
| | 7. 水 | q. s. 到 200ml |

15 将 HPBCD 溶解在 200ml 水中。然后在搅拌下逐渐将异环磷酰胺加到 HPBCD 溶液中。继续混合直至得到清亮的溶液。在搅拌下将美司钠逐渐加入得到的异环磷酰胺溶液中。将乙二胺四乙酸二钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶解在 10ml 水中，并加入到异环磷酰胺-美司钠溶液并很好地混合。用水将体积调至 200ml。

20

实施例 X:

- | | | |
|----|-------|----------------|
| 1. | 异环磷酰胺 | 180g |
| 2. | 美司钠 | 36g |
| 3. | HPBCD | 10g |
| 25 | 4. 水 | q. s. 到 200 ml |

用上述含量的组分重复实施例 VIII 的步骤。

实施例 XI:

- | | | |
|----|----------|------|
| 1. | 异环磷酰胺 | 10g |
| 30 | 2. 美司钠 | 2g |
| | 3. HPBCD | 20g |
| | 4. 磷酸氢二钠 | 0.1g |

5. 磷酸二氢钠0.06g
6. 水q. s. 到 200ml
- 将称量的磷酸氢二钠和磷酸二氢钠溶解在 160ml 水中，加入称量的 HPBCD 并在搅拌下缓慢溶解。在搅拌下将称量的异环磷酰胺逐渐加
- 5 到缓冲的 HPBCD 溶液中并混合 3 小时。
- 在搅拌下将称量的美司钠逐渐加到上述异环磷酰胺溶液中并很好地混合。
- 用水将体积调至 200ml。产品通过 0.2 μ 过滤器过滤，无菌下填充到灭菌玻璃瓶中。在无菌条件下用涂有 Teflon™ 的灭菌橡胶塞封闭玻
- 10 璃瓶，并用轻拍式封口物进行密封。
- 分析该实施例中所得组合物异环磷酰胺和美司钠的含量，发现包含 51.2mg/ml 异环磷酰胺和 10mg/ml 美司钠。组合物的 pH 为 7.05。

- 实施例 XII:
- 15 在大鼠中对实施例 XI 所得组合物和 M/s. German Remedies 生产的常规制剂 Holoxan™ 进行出血性膀胱炎研究来评价膀胱毒性。
- 实验细节如下:
- 所用动物: 任意性别的 Wistar 大鼠
- 动物的重量范围: 100-150gm
- 20 组数: 5
- 每组的动物数: 2
- 环境适应性 (Acclimatization): 在控制温度和湿度的实验条件中一周。
- 25 实验物质: 异环磷酰胺和美司钠注射液
- 特性 (identity): 实施例 XI 组合物
- 描述: 清亮无色的溶液
- 给药途径: 静脉内
- 30 对照物: Holoxan™
- 特性: 异环磷酰胺注射液 U. S. P
- 批号: G 220

- 生产日期 : 2001 年 10 月
 有效期 : 2003 年 9 月
 描述 : 用于用水重构用于注射的干燥粉末
 强度 : 40mg/ml, 在重构液中
 5 生产商 : German Remedies Limited.
 给药途径 : 静脉内

研究设计

- 将动物分为五组, 每组两只。给动物注射表 1 详细说明了异环磷
 10 酰胺制剂。

表 1: 异环磷酰胺制剂的剂量

组号	制剂	剂量 (mg/kg 体重)	
		异环磷酰胺	美司钠
1	Holoxan	400	80
2	Holoxan	500	100
3	实施例 XI	400	80
4	实施例 XI	500	100
5	葡萄糖注射液	-	-

- 通过静脉内途径对所有的动物进行注射。注射后 24 小时将动物处
 15 死。收集所有动物的泌尿膀胱并用 10% 富尔马林固定 48 小时。制备组
 织病理学载玻片用于显微检测。

评价: 表 2 给出了出血性膀胱炎的分级模式

表 2: 出血性膀胱炎的分级模式

分级	分数
正常	0 (N)
弱出血性膀胱炎	1+
有或没有非典型上皮 (epithelial atypia) 的 中等出血性膀胱炎	2+
带有或没有非典型上皮的重度出血性膀胱炎	3+

观察：表 3 描述了对两种异环磷酰胺制剂的出血性膀胱炎的评价结果。

表 3: 评价用于出血性膀胱炎的两种异环磷酰胺制剂

动物序号	制剂	剂量 (mg/kg)		分数
		异环磷酰胺	美司钠	
1	Holoxan	400	80	1+
2	Holoxan	400	80	1+
3	Holoxan	500	100	1+
4	Holoxan	500	100	2+
5	实施例 XI	400	80	N
6	实施例 XI	400	80	N
7	实施例 XI	500	100	N
8	实施例 XI	500	100	N
9	葡萄糖	-	-	N
10	葡萄糖	-	-	N

5

讨论:

用 400mg/kg 和 500mg/kg 剂量的 Holoxan 处理的动物出现了出血性膀胱炎而实施例 XI 组合物没有出现出血性膀胱炎。

结论:

10 以上发现结论性地证明实施例 XI 组合物比 Holoxan™ 制剂的毒性低。

实施例 XIII:

对实施例 1 得到的组合物进行稳定性研究。数据如下:

贮存条件	描述	异环磷酰胺含量
最初	清亮、无色的液体	51.2mg/ml
2℃-8℃ - 3M	清亮、无色的液体	50.06mg/ml
2℃-8℃ - 3M	清亮、无色的液体	50.33mg/ml

15

结论:

以上证明了异环磷酰胺在实施例 XI 中获得的组合物中是稳定的, 当在 2℃ 到 8℃ 下贮存时不发生降解, 而重构的常规制剂据报告在冷冻下能稳定 3 到 6 个星期。

5

本发明的优点:

1. 本发明的组合物是即用、稳定和低毒的。
2. 制备注射给药的异环磷酰胺和美司钠水溶液为处理细胞毒药物提供了便利, 因为不需要粉末制剂的重构。
- 10 3. 在 10ml 小瓶中异环磷酰胺的含量能够提高到 10g, 而一般销售的包装物为 1 到 2g。这在给药期间减少了操作容器的数量。

不需要与美司钠额外混合的步骤, 因为本发明的组合物被制成了含有美司钠的异环磷酰胺溶液。