

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 31/335
C07D305/14 A61P 35/00



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 97196934.5

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1165300C

[22] 申请日 1997.6.26 [21] 申请号 97196934.5
[30] 优先权
[32] 1996.6.28 [33] US [31] 08/672,594
[86] 国际申请 PCT/US1997/011503 1997.6.26
[87] 国际公布 WO1998/000128 英 1998.1.8
[85] 进入国家阶段日期 1999.2.1
[71] 专利权人 德克萨斯州立大学董事会
地址 美国得克萨斯州
[72] 发明人 B·S·安德森
审查员 豆波建

[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 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 10 页

[54] 发明名称 紫杉醇的非肠道稳定无毒制剂
[57] 摘要

本发明公开了稳定的和有效的紫杉烷类似物，
优选紫杉醇的制剂。该制剂包括药物的二甲基乙
酰胺和聚乙二醇溶液，该溶液在使用前用含水的脂
类乳剂稀释。该制剂作为非肠道药物对紫杉烷敏
感肿瘤是有效的。

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

1. 非肠道给药的药物组合物，包括紫杉烷类，二甲基乙酰胺，聚乙二醇和含水的脂类乳剂。
2. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述紫杉烷类是紫杉醇。
3. 权利要求 1 的药物组合物，其中紫杉烷类的浓度为 1 - 5mg/ml。
4. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述含水的脂类乳剂是大豆油乳剂。
5. 权利要求 1 的药物组合物，其中所述聚乙二醇的分子量为 400。
6. 权利要求 1 的药物组合物，进一步限定包括二甲基乙酰胺和聚乙二醇的比例为 1:3(v/v)。
7. 制备用于血管内给药的紫杉醇组合物的方法，包括以下步骤：
将紫杉醇溶解在二甲基乙酰胺中使浓度高达 100mg/ml；
以二甲基乙酰胺:聚乙二醇为 1:3(v/v)的比例将聚乙二醇加到紫杉醇溶液中以得到紫杉醇浓度高达 25mg/ml 的紫杉醇储备制剂；及
加入含水的脂类乳剂以得到紫杉醇浓度为 1 - 5mg/ml。
8. 用权利要求 7 的方法制备的药物组合物。
9. 权利要求 1 的药物组合物在制备用于治疗紫杉醇敏感肿瘤的药物中的用途。
10. 权利要求 9 的用途，其中所述肿瘤在患者中并且所述药物组合物经非肠道给药。
11. 权利要求 10 的用途，其中所述患者是人卵巢癌，乳腺癌，恶性淋巴瘤，肺癌或卡波济肉瘤的患者。
12. 权利要求 9 的用途，其中所述药物组合物以剂量为 135 - 250mg/m² 体表面给药。
13. 一种紫杉醇储备制剂，包括 25mg/ml 紫杉醇和 v/v 比例为 1:3 的二甲基乙酰胺:聚乙二醇。
14. 权利要求 13 的紫杉醇储备制剂，其中所述聚乙二醇的分子量为 400。

紫杉醇的非肠道稳定无毒制剂

本发明涉及用于治疗 and 抑制恶性肿瘤疾病的紫杉烷类似物制剂而没有使患者受到聚氧乙烯化蓖麻油或乙醇的副作用。

紫杉醇是近十年中进入临床试验最有希望的化学治疗药物。已经显示其对卵巢癌和乳腺癌的显著活性，并且目前正在进行对几种不同的恶性肿瘤的 II - III 期临床试验。所得结果说明该药物还对淋巴瘤和不同种类的白血病非常有价值。该药物使用已经受到限制是由于繁琐的提取方法，其唯一的起始原料是利用太平洋紫杉树的树皮。该缺点在某种程度上已经阻碍了从紫杉树树针和树皮中提取紫杉醇的技术的最近发展。还开发了从丰富来源的天然前体物质制备紫杉醇的半合成技术。尽管目前紫杉醇是通过非肠道给药，但是已经获得批准用于人的制剂仅有一种 (Bristol-Myers-Squibb(Taxol™) 提供)。该制剂含有 50 % (v/v) 乙醇，及 88 倍过量的聚氧乙烯化蓖麻油 (Cremophor® EL)，其具有诱发严重的副作用的可能性。所述紫杉醇制剂的急性和普通临床副作用是严重的：呼吸困难，低血压，血管水肿，全身性荨麻疹，及最显著的过敏性样反应，及致命危险。另外，高浓度 Cremophor® EL 会促进“塑化剂”的渗漏，即用于处理输注袋的生产中使用的化学品的泄漏和静脉注射管进入输注物，及患者受到未知化学品作用的风险（长期）。目前使用药物制剂的严重急性副作用的经验已经要求用苯海拉明，H₂ - 拮抗剂，甚至皮质类固醇类进行前驱用药。

因此，需要基于改变溶剂系统的紫杉烷类制剂。这将缓解危险的副作用并且提供用紫杉醇和相关紫杉烷类化合物的常规剂量治疗和高剂量化学治疗的药物。

本发明通过用无毒溶剂系统（基于提供改变的、可产生稳定药物制剂的可药用溶剂载体同时不使用 Cremophor® EL 和乙醇的共溶

解能力原则) 提供再配药物力求克服现有技术中的那些缺点。这些制剂经过血管内给药后显著调整了药物动力学/药化学并且也可以改变副作用范围, 因为, 例如目前使用的紫杉醇方案对于平均成年患者要求给予多达 20 - 30ml Cremophor® El。

本发明还广泛描述了用紫杉醇作为原型物质溶解非肠道使用的紫杉烷类似物的组合物和方法的发现。作为该发现的实例, 将紫杉烷类似物如紫杉醇溶解在作为第一载体的有机溶剂中, 即二甲基乙酰胺 (DMA) 或二甲亚砜 (DMSO) 中, 然后用第二溶剂, 如聚乙二醇 400 (PEG) 稳定后来 (最终) 于水性溶剂中稀释溶液中的药物。优选的最终溶剂是含水的脂类乳剂, 例如乳化的大豆油 (Intralipid™, 购自 Kabi-Pharmacia Inc., Stockholm, Sweden)。尽管这里所述实例利用具有平均分子量为 400 的聚乙二醇, 但是应当理解该 PEG 的分子量是在约 300 至约 10,000 之间变化。另外, 预期有效的其它助溶剂包括但不限于例如多种酰胺类, 其实例是 2-吡咯烷酮, 1-甲基-2-吡咯烷酮, 及其它含硫化合物如环丁砜, 四亚甲基噻砜和四亚甲基亚砜。这些试剂是可用于稳定紫杉烷化合物的双质子对极性惰性溶剂的所有实例, 尽管它们以前少有或没有被记录用作药物溶剂。

优选的脂类溶剂提供一些优点, 因为用作原型紫杉烷类似物的紫杉醇是高亲脂的并且含水的脂类乳剂的使用预期可稳定水性稀释液中的药物, 以便在超过 24 小时输注的治疗价值可以系统地和方便地体现而由于沉淀或降解损失药物活性。脂肪乳剂 (Intralipid) 容易得到并且已批准可用于常规非肠道营养载体。应当理解本领域中已知的其它脂类乳剂是无毒的及对人是低过敏的。类似可使用的脂类乳剂包括 Liposyn®, Soyacal® 和 Travemulsion®。

此外, 紫杉醇是光敏感的, 使用含水的脂类乳剂作为最终溶剂将提供输注药物时对光的保护。

已经证明本发明的一种紫杉醇制剂 (25mg/ml) 在室温可以稳定几个月。最终使用的制剂 (1 - 5mg/ml) 至少稳定 7 天, 并且用商购

制剂作为对照溶液测定对两种人白血病细胞系时，保留完全的细胞毒活性。而且其载体制剂在溶血测定中是无毒的。已经使用的另一个制剂证明在啮齿动物模型中以 3mg/kg 体重注射后紫杉醇的明显杀细胞浓度保持了数小时。因此，这里所述制剂提供了改变目前使用的紫杉醇、用于血管内输注治疗人和饲养动物恶性肿瘤疾病的可药用制剂，同时其比目前使用的临床制剂具有更大的效益及相当小的副作用。用本发明制剂可以治疗的恶性肿瘤疾病包括卵巢癌，乳腺癌，恶性淋巴瘤，肺癌或卡波济肉瘤。可以预测使用这些新的溶剂系统溶解其它（亲脂）紫杉烷类似物有利于这些非常活性的抗癌剂的临床研究。

本发明的优点包括：

1. 亲脂紫杉烷类似物的药物稳定和非肠道可接受的新型制剂，其可被用于治疗人和饲养动物的恶性肿瘤疾病。所得制剂是以药物助溶解的原则为基础，这是通常用于药物工业并且被 FDA 认可的原则；

2. 可与作为最终溶剂且临床可接受、水性非肠道输注液体混合的新制剂；

3. 在组织培养评价中保留完全细胞毒活性，且将人恶性肿瘤细胞系作为靶的新制剂；及

4. 根据与以前使用的制剂在大鼠模型中静脉给药后获得的药物动力学比较，血管内给药可接受的制剂。

本发明提供了紫杉烷类似物（例如紫杉醇）溶解在复合的、可药用液体载体中的组合物和方法，其避免使用聚氧乙烯化蓖麻油如 Cremophor[®] 或乙醇，以便该药物保留物理和化学稳定并且可以血管内给药而在预期有效显示临床杀肿瘤效果的药物剂量时没有由于不溶解药物和/或溶剂载体带来的毒性。

根据助溶解原则，优选制剂结合使用无水 N，N-二甲基乙酰胺（DMA），二甲亚砷（DMSO），和聚乙二醇-400（PEG）作为第一（储备）溶剂，其在第二/最终水性溶剂中混溶，这些第二溶剂的实例是标准盐水，5% 葡萄糖水溶液和水性大豆脂类乳剂

(**IntralipidTM**)。这些溶剂是其中紫杉烷类似物如紫杉醇单独或与其它药物结合使用时适当被溶解并且对于人给药是安全的载体的实例。

可以使用所述载体溶解紫杉醇的浓度范围在 0.1 至大于 25mg/ml 之间。预期该范围覆盖了治疗对这些药物敏感的恶性肿瘤时需要产生体内活性细胞毒浓度的给药剂量。因此,本发明将允许在用于治疗恶性肿瘤疾病的临床实践中引入紫杉醇和其它紫杉烷类似物而没有使患者受到 **Cremophor[®] EL**, 乙醇或其它不希望的溶剂的严重的和可能毒性的作用。

从广义上讲,本发明公开了极不溶于水的紫杉烷类似物如紫杉醇的血管内给药方法。该方法防止了药物的不好的肠道吸收以及避免了目前仅用的药物制剂中遇到的聚氧乙烯化蓖麻油和乙醇的严重系统性副作用。新的药物制剂的稳定性将延长非肠道输注,相反目前使用的制剂在临床接受的输注液体中缺乏延长的稳定性,因此预期会提高这些药物的治疗效果。

本申请中使用的缩写

ATCC; 美国组织培养中心, Rockvill,MD

Cremophor[®] EL; 聚氧乙烯化蓖麻油的商品名

DMA; 无水 N, N - 二降解乙酰胺

DMF; 二甲基甲酰胺

FDA; 美国联邦食品和药品管理署

HPLC; 高压液相色谱

HL - 60; 人骨髓白血病细胞系

IMDM; Iscove 改进的 **dulbecco** 培养基 (**GIBCO,Grand Island,New York,NY**)

IntralipidTM; 从大豆油制备的含水的脂类乳剂, 由 **Kabi-Pharmacia, Inc., Stockholm, Sweden** 销售用于非肠道营养

KBM-7/B5; 人骨髓白血病细胞系

MeOH; 甲醇

MTT; 3,[4,5-二甲基噻唑-2-基]2,5-二苯基四唑溴化喹

NCI; 国立癌症研究所

NH₄-乙酸盐; 乙酸铵

NS; 标准盐水 (150mM NaCl)

PBS; 磷酸盐缓冲盐水 (Dulbecco 配方, pH7.4)

PEG; 聚乙二醇 - 400

PG; 丙二醇

PTFE; 聚四氟乙烯 (过滤膜), Teflon™

RT; 室温 (22℃)

Sep Pak Vac1 cctC2™; 从 Waters Inc., Milford 得到的可处理萃取柱, MA SDS; 十二烷基硫酸钠

附图 1. 室温 (RT, 22℃) 和 4℃ 紫杉醇的 DMA: PEG (1: 3, v/v) 储备制剂的稳定性, 浓度 25mg/ml。在 4℃ 稳定性是与样品在 RT 储备记录的稳定性重叠的日期 (4.5 月)。

附图 2. 4℃, 室温 (RT, 22℃), 40℃ 和 60℃ 紫杉醇的 DMA: PEG (1:3, v/v) 储备制剂的加速稳定性研究, 浓度 25mg/ml。稳定性曲线用 4℃ 时样品获得, 并且在整个 60 天观察期与室温曲线 100% 重叠。

附图 3. 在 RT, 紫杉醇在 DMA/PEG(1:3,v/v)的最终使用制剂中的稳定性, 然后用 Intralipid 稀释至 1mg/ml, 和 5mg/ml。制备溶解紫杉醇的两种不同样品并且平行进行试验。

附图 4. 在稳定性研究中使用 HPLC 测定的紫杉醇浓度对曲线下面积 (AUC) 的标准曲线。制备类似标准曲线用于药理学研究。

附图 5A - 附图 5B 在附图 5A 中用 Waters μ Bondapak Phenyl 柱在稳定性研究中从 HPLC 获得色谱图实例。在附图 5B 中注射样品体积是 20 μ l, 附图 5C 使用 C₈Symmetry™ 柱, 注射体积是 20 μ l (附图 5B;1 μ g/ml, 附图 5C;10 μ g/ml)。HPLC 条件如下面实施例 1 所述。

附图 6. 没有(□)有(■)紫杉醇的 DMA:PEG:Intralipid 的最终使

用制剂的溶血潜力。

附图 7. 紫杉醇的 DMA:PEG:Intralipid 的使用制剂在 60 分钟药物暴露后用克隆基因鉴定评价对两种人细胞系 KBM-7/B5 和 HL-60 的细胞毒活性。将紫杉醇的商品制剂用作阳性对照。详细情况参见试验中实施例 2。

附图 8. 在 HPLC 前用如下面实施例 3 所述 SepPak 简柱提取的血浆样品的色谱图；a)空白血浆，b)用紫杉醇的新制剂 10 μ g/ml 形成峰值的血浆，及 c)从药理学研究中得到的可靠的色谱图，其中大鼠用 3mg/kg 药物注射。该血样注射 5 分钟后获得。

附图 9. 雄性 Sprague-Dawley 大鼠注射 3mg/ml 的紫杉醇的血浆浓度对时间的图（- Δ -新制剂，DMA:PEG:Intralipid）。用商品制剂注射作阳性对照（ $\square$ ）。

本发明提供了非肠道或血管内给予水溶性差的紫杉烷类似物的制剂，其中没有乙醇和聚氧乙烯化蓖麻油，其被用于改进对这些药物敏感的恶性肿瘤的控制。将这里所示实施例制剂用于人恶性肿瘤，例如人白血病细胞系 KBM-7/B5 和 HL-60 模型时，该制剂是有效的。以前的药物实践已经证明紫杉烷类如紫杉醇和 docetaxel 作为非肠道抗癌剂的用途，并且它们在体外试验以及临床试验中具有良好的、被完全证明的细胞毒性质（Rowinsky 等人，1990；Nicoletti 等人，1993；Rose，1993；Verweij 等人，1994；Rowinsky 等人，1993；Brown 等人，1991；Seidman 等人，1995；Chevallier 等人，1994）。

对于紫杉烷类似物用于治疗系统性恶性肿瘤来说非肠道给药是优选的方法。不幸的是，大多数这些药物在多数生理上可接受的水性溶剂（适合血管内给药）中具有极低的溶解性。用于商品紫杉醇制剂的溶剂系统是以乙醇和聚氧乙烯化蓖麻油的结合为基础的，其具有严重副作用的可能性。已经证明在该“标准”载体中的紫杉醇具有主要过敏样性质的急性副作用，有必要广泛采用苯海拉明，组胺 H₂ 拮抗剂及皮质类固醇类的前驱给药法（Weiss 等人，1990；TAXOL®(紫杉醇)）。已经证明了这里公开的以助溶解原则（Spiegel

和 Noseworthy, 1963; Yalkowsky 和 Roseman, 1981)为基础的制剂具有溶解紫杉烷类似物象紫杉醇的能力而没有影响其细胞毒性质。

优选的溶剂对于试验动物和人的建议浓度及使用的总剂量下给药时实际上是无毒的并且证明是安全的。实际上, 以前已经使用 DMA 用于溶解各种给药于人的药物活性成分 (U.S. Department of Health and Human Services, 1984; Weiss 等人, 1962; Kim, 1988)。PEG 的非肠道给药已经在猿模型中详细研究 (Lockard 等人, 1979), 并且也已经临床使用 PEG 作为治疗淋巴细胞白血病和淋巴瘤中的 L-天冬酰胺酶 (共价键) 载体 (Keating 等人, 1993)。DMSO 已经广泛用于临床药物, 最广泛用作冷冻保护剂在高剂量化学治疗和家族生血细胞移植前用于冷冻保存骨髓和祖先末梢血细胞 (Davis 和 Rowley, 1990; Gorin, 1992)。从使用这些稀释剂的经验说明没有严重的临床副作用。已经很好地建立了临床使用标准盐水 (NS), 葡萄糖水 (5-70%), 和含水的脂类乳剂的常规方法以校正液体和电解质平衡及供应非肠道营养。标准盐水和葡萄糖水广泛用于稀释各种非肠道使用的药物。尽管含水的脂类乳剂还没有发现广泛用作药物稀释剂, 但是这种应用已经建立 (Fortner 等人, 1975)。在啮齿动物模型中获得的数据证明建议的稳定的紫杉烷制剂将允许非肠道治疗系统性恶性肿瘤并且将提供 100% 生物利用度而没有使患者受到乙醇和 Cremophor® EL 的作用。紫杉醇经暂时静脉输注后, 明显达到血浆浓度, 并且在延长的时间里保持在抗肿瘤范围内, 该范围是对人恶性肿瘤细胞系的细胞毒活性研究的体外试验中建立的。特别地, 这里公开的紫杉醇使用制剂在 RT 化学稳定超过 1 星期, 并且其操作简单及提供了可靠和容易控制的具有药物 100% 生物利用度的剂量。

总之, 本发现通过在延长的时间里给药紫杉醇, 提供了用于治疗免疫危及患者的一些恶性肿瘤如卵巢, 乳腺癌和卡波皮肉瘤的改进方法和制剂。这些方法和制剂还提供了消除在亲脂试剂的制剂中使用乙醇和/或聚氧乙烯化蓖麻油的相关副作用的危险的优点。

以下实施例包括证明本发明的进一步优选方案。本领域技术人员应当理解公开在实施例中的这些技术遵循本发明人发现的代表性技术，在本发明实践中具有好的功能，因此可以认为其构成了本发明实践的优选方式。但是，根据本公开，本领域技术人员应当理解在具体公开实例中可以作出许多变化并且仍获得类似的结果而没有背离本发明的精神和范围。

实施例 1

非肠道给药的紫杉烷类似物

计算所需溶解性

根据从已知具有显著抗人肿瘤效力的剂量外推已经计算出紫杉醇的相关溶解性范围。已经用乙醇/**Cremophor**[®] EL 制剂（其是目前唯一经过 FDA 批准的非肠道制剂）进行了所有这些研究。目前使用的紫杉醇治疗方案的典型处方剂量范围为 135 - 250mg/m² 人体表面（Verweij 等人，1994；Rowinsky 等人，1993；Brown 等人，1991；Holmes 等人，1991；Seidman 等人，1995；**TAXOL**[®]（紫杉醇）。紫杉醇的临床最有效的给药方式还不知道。但是，很明显用延时输注方式，药物的神经病学副作用显著小于常用的短时（3 小时）输注。因此假定紫杉醇的临床最佳给药方式是延时输注，可能超过 24 小时，需要使用制剂在室温具有至少 36 - 48 小时所需稳定性以便进行常规处理。如果该剂量以浓度 1 - 5mg/ml 溶解，至少 10 - 25mg/ml 的储备制剂将优选进行适当稀释处理至相当宽范围的使用浓度，以使其可以容易在需要延长时间段内进行输注而不需要由于在输注物中的药物的物理或化学降解而重复交换输注液体。

提高在生理可接受的溶剂中的溶解性

测定在几种单个载体中的紫杉醇的溶解性。在 1 小时内将已知量的粉剂药物（从 Xechem Inc. New Brunswick, New Jersey 获得两个不同等分的纯化药物）在室温（22℃）不同溶剂中平衡 1 小时。然后除去等分部分并在 HPLC 预测定时间前在 MeOH 中稀释。根据紫杉醇在这些特定载体中的溶解性，根据助溶解原则通过混合不同溶

剂来提高（稳定）溶解性（**Spiegel 和 Noseworthy, 1963; Yalkowsky 和 Roseman, 1981**）。根据需要达到临床相关稳定储备制剂的上述溶解性的估计值，评价不同的溶剂系统。然后将这些储备制剂用“最终溶剂”稀释以产生完全稳定的临床使用制剂 1 – 5mg/ml，其可用于非肠道输注。从通常用于非肠道输注液体，NS，5% 葡萄糖水或非肠道可接受的含水的脂类乳剂（例如 **Intralipid**）之一（所有这些溶剂容易得到并且被批准用于非肠道给药）选择最终溶剂。

HPLC 测定

用于含蛋白和不含蛋白混合物的紫杉醇的低浓度溶液的多数精确和敏感检测系统是利用检测器在 uv 谱 227nm 进行吸收检测的 HPLC 测定，根据紫杉醇分子的固有吸收最大值选择数值。几个研究者以前已经研究了这种通用方法（**Rizzo 等人, 1990; Willey 等人, 1993; Sharma 等人, 1994; Eiseman 等人, 1994**）。

使用装有 **LDC 4000** 多溶剂输送系统TM和 **Water** 系统 717 加自动注射器TM的液体色谱系统。吸收检测器是 **LDC 3100** 可变波长检测器，其带有 **LDC** 型 **CI 4100** 全计算机化积分仪。所用柱开始是 **Waters μBondapakTM** 苯基柱，3.9x300mm，后来使用 **Waters CiSymmetryTM** 柱，3.9x150mm（**Millipore Corp., Marlborough, MA**）。等度流动相系统由 **NH₄-乙酸盐（20mM, pH5.0）/乙腈/MeOH**（体积比 50:40:10）组成。除非另有说明，所有化学品是 HPLC 级。流速是 1.0ml/分钟，记录图速度是 5mm/分钟。分析系统由（**Rizzo 等人, 1990; Willey 等人, 1993; Sharma 等人, 1994; Eiseman 等人, 1994**；未公开方法：**Courtesy of Xechem Inc., Newark, New Jersey**，和从公开的方法，**courtesy of Dr. T. Madden, Department of Pediatris, UT MD Anderson Cancer Center**）建立。

内源性血浆（蛋白）色谱峰的形状受药理学研究中 HPLC 洗脱剂的干扰。因此，加入使用 **Sep Pak Vac 1 cc tC2** 提取处理柱（**Waters Cororation Inc., Miford, MA**）的提取/纯化步骤。这些可以自由使用的提取处理柱的使用条件是 1ml MeOH 和具有 500μl MeOH:水

(85:15,v/v)的1ml 水为流动相。然后用上述 HPLC 分析洗脱液。

紫杉醇溶解性

评价在适合人给药的水混溶生理上可接受载体中溶解紫杉醇的几种方法。除了水性溶剂 NS, 5% 葡萄糖水和水性大豆脂类乳液 (Intralipid) 外, 检测参选溶剂包括 DMA, DMSO, PEG, 和 PG。DMA 和 DMSO 是最好的首选溶剂, 此时, 如所预计, 紫杉醇在多数水性溶剂中不溶 (表 1)。只有用 DMA 和 DMSO 时其溶解度超过 10mg/ml。实际上, 这两种溶剂都使紫杉醇浓度超过 100mg/ml 并且该药物在 RT 及溶液中保持稳定 4 小时以上。但是, 尽管紫杉醇能溶解在 DMA 和 DMSO 中至少 100mg/ml, 但是药物在该溶剂中约 12 小时内开始降解。由于考虑 DMSO 可能与紫杉烷类进行化学反应, 多数研究强调如何用助溶剂方法稳定溶解在 DMA 中的紫杉醇 (Spiegel 和 Noseworthy, 1963; Yalkowsky 和 Roseman, 1981)。研究了几种助溶剂的结合; 加入 PEG 使 25mg/ml 溶液稳定 (附图 1 和附图 2), 当将该储备溶液进一步用含水的脂类乳剂稀释为 1mg/ml 或 5mg/ml 时, 所得“使用制剂”在 RT 至少稳定 7 天 (参见附图 3)

HPLC 测定

从 HPLC 测定得到的实际紫杉醇色谱实例如附图 4 和附图 5。在该专门研究中, 从用在水性 DMA/PEG/脂类“使用”溶剂中的药物的稳定性研究中分析药物。在上述条件下利用 μ Bondapak 苯基柱的保留时间是 17-18 分钟。经过比较其它方法后, 用 C₈Symmetry 柱替代 μ Bondapak 苯基柱, 其给出相同的回收和灵敏性数据, 但是具有更好的分辨率和仅 10.3-11.3 分钟的保留时间。该测定在 10ng/ml-50.0 μ g/ml 无蛋白溶液中是线性的, 即各种溶剂系统用于制剂-可行性和稳定性研究中。该测定一致产生了高回收、准确和低于约 5ng/ml 灵敏限。该技术是标准化的并且用于所有没有修正的稳定性研究。对于药理学研究, 色谱中内源性血浆蛋白峰的出现需要加入提取/纯化步骤。该提取用 Waters Sep Pak Vac 1 cc tC₂ 提取柱进行。血浆分析结果参见实施例 3。

实施例 2

体外稳定性和其它性质，优选制剂溶解性研究

在 RTF 将粉状过量的紫杉醇加到 DMA，DMSO，PEG，和 PG 中。将每个混合物放在暗环境中并且凭视觉检查溶解现象达 1 小时。在不同间隔时间取出 1ml 样品并用装有联合注射器的 0.45 μ m PTFETM膜过滤器（Whatman Inc., Clifton, NJ）过滤，适当稀释后用 HPLC 测定紫杉醇的浓度。

各种紫杉醇制剂的稳定性

为了研究各种非肠道制剂的物理和化学稳定性，进行以下 3 项研究：

(a) 将紫杉醇以浓度 100mg/ml 溶解在 DMA 中（“第一储备溶液”）并且在 4℃、22℃、40℃和 60℃培养。用 HPLC 测定溶解后立即取出的样品和逐渐增加时间间隔直到 48 小时后取出的样品的紫杉醇浓度。

(b) 用 PEG（1:3,v/v，DMA/PEG），或脂类乳液（1:10 或 1:100, v/v，DMA:脂肪乳剂）稀释 DMA - 紫杉醇混合物产生药物储备浓度范围为 10-25mg/ml。

(c) 用标准盐水或 5% 葡萄糖水稀释 DMA - 紫杉醇混合物产生药物储备浓度为 1mg/ml 和 5m/ml。

混合后、每小时（共 8 小时）、逐渐增加时间间隔多于 10 天后根据在各个溶剂中降解的起始速度立即用 HPLC 分析各种制剂。

不同的第一溶剂药物的溶解度显著不同。仅 DMA 和 DMSO 提供了如上所述超过 100mg/ml 的溶解度，优选 DMA 作为第一溶剂进一步研究。

为了降低在最终使用制剂中 DMA 的浓度及改进其药物的货架寿命，研究将 PEG 作为助溶剂。PEG 的使用将使水性载体进一步稀释而没有药物沉淀和快速的化学降解，即使药物的“储备”浓度高达 25mg/ml。另外，在全溶剂系统中低的总 DMA 浓度预期比已经用于第一溶解步骤中高的 DMA 或 DMSO 浓度产生更低的最终使用制

剂的溶血可能性。

渗透压的测定

用微-渗透压计型号 3moplus osmometer(Advanced Instruments Inc., Needham Heights, MA)测定渗透压。该仪器用 AdvansTM 内部校正标准(Advanced Instruments Inc.)在范围 500 - 2000mOsm/kg 内校正。将使用溶液放在试验试剂盒的样品池中并且在 mOsm/kg 单位平衡后记录渗透压读数。每个载体(没有紫杉醇)进行一式三份测定,加入紫杉醇进行六次测定。

使用双尾 t 检验评价有和没有紫杉醇的各种载体制剂的渗透压差别(Mann and Whitney, 1947)。两组的方法差别认为差别显著($P \leq 0.05$)。

体外溶血研究

使用 Parthasarathy 等人的方法检测选择的几个制剂的溶血可能性并且构建如(Parthasarathy 等人, 1994)所述最佳制剂的 LD₅₀ 值。将肝素化的血与等体积 Alsever 溶液混合。将该混合物用 PBS 洗涤两次然后制备 10% (v/v)红细胞/PBS 溶液并与增量的有或没有加入紫杉醇的全溶解系统混合。然后将这些混合物在 37℃ 培养 4 小时。培养结束后,将细胞在 Eppendorf 微离心机以 10,000 × g 粒化并用分光光度仪在 550nm 测定上清液(即溶血)中释放的血红蛋白。测定相对于已经用低渗储备液完全溶解的血红蛋白的参考溶液的最大溶解。如(Parthasarathy 等人, 1994)所述评价“最佳”最终制剂的溶血能力并将数据用健康细胞部分对 ln(总体积百分比)作图。总体积百分比定义为用血液稀释后混合物中载体的体积百分比。做这个是为了刺激非肠道给药后血流中每个药物的稀释。健康红细胞定义为有或没有紫杉醇的溶剂载体混合物进入细胞内后能保留其血红蛋白的那些红细胞(Parthasarathy 等人, 1994)。

体外紫杉醇的细胞毒性

用已经公开的细胞毒性测定方法,“MTT”(Hansen 等人, 1989; Andersson 等人, 1995), 及克隆基因测定方法(Andersson 等人,

1994)测定所选择的有和没有紫杉醇的溶剂系统对两个人骨髓白血病细胞系 HL-60 (Gallagher 等人, 1979) 的细胞毒潜力。将在补充 10% 胎牛血清的 Iscove 改进的 Dulbecco 培养基(IMDM)中的 HL-60 或 KBM-7/B5 细胞在 37℃ 培养 60 分钟。24 小时后向每个样品中加入 25μl MTT 溶液 (5mg/ml) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 并在 37℃ 再培养 2 小时, 加入 100μl 萃取缓冲液[萃取缓冲液: 37℃ 20%(w/v) SDS 溶解在 DMF 和去离子水(1:1)溶液中至饱和; pH4.7]。在 37℃ 培养过夜后, 在 570nm 用 Titer-Tech™ 96-well multi-scanner™ 测定萃取缓冲液作为校正空白的光密度。用暴露于上述溶剂±紫杉醇的样品和已经只在 PBS 进行平行培养的细胞的基本反应性的比色差异测定细胞毒性。所有测定进行一式三份。或者, 培养 60 分钟后, 用冰冷却的 PBS(pH7.4)洗涤细胞并再悬浮在具有 20% 胎牛血清和 0.3% 琼脂作为粘性载体的 IMDM 中。在 37℃ 培养 7 天后, 在转化相对照显微镜下计数>50 细胞的克隆并如(Andersson 等人, 1994)建立存活曲线。

平衡溶解性测定

紫杉醇的最大平衡溶解性>100mg/ml 是在 DMA 和 DMSO 中及 RT 在 1 小时内获得的。该溶解性将分别使用 PEG-400, PG, NS, Intralipid, 和 5% 葡萄糖水, 而不产生任何显著的溶解药物浓度(表 1)。因此不认为这些溶剂可作为第一溶剂用于研究。在 DMA 和 DMSO 中, 紫杉醇在 RT 下至少完全稳定 4 小时, 但是, 在 RT 下延长暴露后预期 DMSO 的硫基团可能与紫杉烷结构反应。因此, 无水 DMA 有利作为第一溶剂。当在 DMA 中紫杉醇溶解性达到 >100mg/ml 时, 在 RT 下储备过夜后, 药物开始慢慢降解。为了稳定药物, 研究几种助溶剂。当 PEG 与 DMA 结合使用时, 在 4℃ 和 RT 下研究真正稳定性寿命, 在 4.5 个月内没有产生明显的降解(附图 1)。

各种制剂的稳定性研究

在不同溶剂制剂中溶解的紫杉醇的温度依赖稳定性研究如下: 将药物以 100mg/ml 溶解在 DMA, 加入 PEG(1:3,v/v)后, 最终紫杉醇

浓度为 25mg/ml。将不同等分在 4℃, 22℃, 40℃, 和 60℃ 储备 (附图 2)。溶解和在各种间隔多达超过 50 天后立即用 HPLC 分析不同样品的等分部分。储备在 4℃, RT, 和 40℃ 的药物样品在前 60 天观察中没有显示任何显著的降解。在 60℃ 的样品在前 6 小时观察中有约 10 - 15% 的损失, 之后超过 6 星期内没有明显的进一步降解。该研究结果认为该药物在这种储备制剂中在升高温度下也是稳定的。

当 NS 或 5% 葡萄糖水用作最终溶剂时, 在 4 - 6 小时内发生明显降解。相反, 当含水的脂类乳剂用作最终溶剂载体时, 所得 1mg/ml 和 5mg/ml 溶液在 4℃ 和 RT 下稳定 1 星期, 参见附图 3。

渗透压

药理学活性物质的非肠道制剂需要与血液等渗。如果药物/溶剂是通过 (中心) 静脉管输注并且逐渐在大量血液体积中稀释, 可以使用高渗输送系统。目前制剂之一的渗透压如表 2 所示。有和没有紫杉醇的第一 DMA/PEG - 储备制剂是非常高渗的; 与人血液 280 - 295mOsm/kg 比较, 估计其渗透压超过 4,000mOsm/kg。相反, DMA/PEG/ 紫杉醇与 Intralipid 的混合物很接近渗透压。通过加入 1ml/mg(<5%) 紫杉醇没有明显改变该整个载体的渗透性。

溶血

如附图 6 所示, 当使用没有或加入紫杉醇的整个载体时, 使用制剂显示了低引起溶血能力。紫杉醇依赖性溶解在药物浓度 (高达和超过 50µg/ml) 背景以上几乎不明显。在不同的研究中特定紫杉醇溶血高度重复出现。用有或没有紫杉醇的全使用 - 载体的不同研究的详细情况概括在附图 6 中。DMA/PEG/Intralipid™ 制剂具有非常低的溶血倾向。

紫杉醇细胞毒性的体外试验

将 HL - 60 和 KBM - 7/B5 骨髓细胞暴露在增加有和没有加入药物浓度的体积比例的 DMA/PEG/Intralipid 的最终使用载体中, 并且用紫杉醇的 Cremophor®EL/乙醇制剂作为阳性对照。这些溶剂系统

对用 MTT 的这些研究中或克隆基因测定中的细胞系没有任何可检测细胞毒性。当将紫杉醇加到每个溶剂系统中时，对于两种制剂观察到浓度依赖细胞毒性(参见附图 7, 由克隆基因测定中获得的数据；由 MTT 测定获得了类似肯定的数据)。与标准制剂比较，该药物似乎在检测新制剂中至少保留相等的细胞毒性。

实施例 3

血浆中紫杉醇定量分析和体内紫杉醇药理学

血浆中紫杉醇的定量提取

将鼠血浆 (500 μ l) 与不同量的紫杉醇 (在<3%的最终体积中) 混合以产生 0.05-3.0 μ g/ml 的药物浓度 (得自药物浓度 5mg/ml 的 DMA/DMSO/Intralipid 的紫杉醇储备使用溶液)。如上所述，从血浆样品中提取药物。将 500 μ l 血浆装入已经先后用 1 ml MeOH 和 1 ml 水预处理的 Sep Pak Vac 1 cc - tC2 柱上。接着依次用 1 ml 水和 1 ml MeOH: 水(1:3,v/v)洗涤样品，然后用 500 μ l MeOH: 水(85:15,v/v)洗脱。如上所述用 HPLC 分析洗脱液并在 227nm 用分光光度法检测紫杉醇。从鼠血浆峰值药物浓度 10 μ g/ml 计算紫杉醇回收率是 87 $\pm$ 3 %。在间隔 10ng/ml - 50 μ g/ml 的测定是线性的，检测限为 5ng/ml。

鼠的非肠道紫杉醇

对于体内研究，使用体重 250 - 300g 雄性 Sprague-Dawley 鼠。这些鼠从 Houston Texas 的 Harlan-Sprague-Dawley 当地饲养工厂得到。这些动物运到 MD Anderson 癌症中心后至少使其适应 3 - 4 天环境变化。在药理学研究之前和期间所有动物可自由喂养和龙头给水。用慢速静脉注射 Cremophor[®]EL 为主制剂 (其在缺乏药理学前驱给药法下没有致死过敏性样反应) 测定的最高剂量为 3mg/ml 剂量。当使用 Cremophor[®]EL 为主制剂，但是没有使用本文公开的制剂时，注射 5mg/kg 体重和 10mg/kg 体重会导致过敏性突然死亡。

对于体内药理学研究，将紫杉醇在 DMA/DMSO 中制成 25mg/ml 储备药物浓度的制剂，然后用 Intralipid 稀释使该剂量 (3.0mg/kg) 能通过尾静脉注射以最大体积 0.5ml 注射给药。与上市紫杉醇制剂

(TAXOL[®](紫杉醇))的制造商建议相反,在本研究中没有对动物使用药理学前驱给药法。这避免了诱发能改变药物代谢/消除的微粒体肝酶的可能影响和影响(最后部分)血浆浓度曲线。由于相同理由,没有麻醉所有动物并且仅在药物注射期间进行物理限制。注射使用-制剂的药物浓度在使用前由 HPLC 确定。在药物输注前(用于空白血浆),及注射测定紫杉醇血浆浓度的 5 分钟至 24 小时选择时间点,用肝素化管通过心脏穿刺在光 CO₂ 麻醉下抽取血样 0.5-1.0ml。将血液以 1,000 × g 离心 10 分钟并分离血浆及储备在 -80℃ 直到提取和如上上述用 HPLC 分析。

血浆中紫杉醇和体内药物药理学

用 Sep Pak Vac 1 cc tC₂ 柱从具有 MeOH 的血浆中提取药物对于避免内源性血浆成分的干扰和回收最大量药物是必要的。空白血浆、紫杉醇-峰值血浆,和从目前药物动力学研究中血浆样品提取后获得的一个实例的实际色谱如附图 8 所示。在该系统中紫杉醇的保留时间是 10.3-11.3 分钟。当鼠血浆体外具有药物峰值 10μg/ml 时,用上述方法紫杉醇的回收率是 87±3%。当从血浆样品在 10ng/ml - 50μg/ml 范围进行药物提取后该测定是线性的。当色谱图中以 200μl 注射时,敏感限约 5ng/ml。预期通过使用 2ml 较大体积注射环系统和通过在较小体积中蒸发/重配 500μl 洗脱液可以改进这种敏感性。在浓度范围 10ng/ml 至 1,000ng/ml 中制备用于药理学研究的标准曲线并且在血浆紫杉醇浓度和峰 AUC 值之间获得好的相关性。

数据说明将新的紫杉醇制剂可产生与注射相同剂量 3mg/ml 体重的市购制剂至少相同的血浆浓度(附图 9)。

总之,本实施例说明用紫杉醇作为原型化合物成功设计了紫杉烷类似物的药用稳定制剂。如啮齿动物模型所示,该最佳溶剂系统是生理相容并具有好的耐受的血管内给药和可忽略的急性溶剂系统毒性。给鼠血管内注射一种制剂(3.0mg/ml,类似于 200mg/m²体表面),在几小时内达到血浆浓度,保持紫杉醇细胞毒浓度。应当注意,在该研究中,对于使用-制剂,使用含 Intralipid 的 1:3 DMA 和 PEG

混合物作为“最终”溶剂的制剂。

用优选的最终使用 - 制剂，DMA/PEG/Intralipid 获得的数据明确证明在临床治疗恶性疾病中引入这种非肠道紫杉烷（紫杉醇）制剂的可行性，和预期达到的细胞毒活性及溶剂载体低的或可忽略的对正常器官的毒性。特别地，现在可以完全避免至少部分与使用大量注射 Cremophor®EL 和乙醇相关的严重的威胁生命的过敏性反应的可能性。这些新的溶剂系统预期不仅明显减少溶剂系统毒性的危险，而且使有机溶剂可能加强紫杉烷如紫杉醇有关的临床副作用的危险降至最小，及方便延长给药的处理和精确评价。

结论

已经发明了用于亲脂性紫杉烷类似物如紫杉醇的稳定及可药用的制剂的血管内给药的新载体。已经开发了敏感的和特定的 HPLC 测定，其可重现定量紫杉醇浓度低至 10 - 50ng/ml。类似地，开发了提取技术以重复回收从血管内给药后得到的血浆样品中的紫杉醇。开始了新的非肠道配伍载体的稳定性研究以选择用于溶血可能性和体外细胞毒活性研究的最好制剂。因此，一种稳定的新制剂可以以 3.0mg/kg 体重非肠道注射给鼠。从所得结果看出，高药物浓度可以在鼠模型中静脉注射新制剂后获得。此外，该制剂产生血浆药物浓度和在血浆浓度对时间曲线下的面积（明显是细胞毒范围内）。现在可以研究含有紫杉烷类如紫杉醇的这些最稳定的、低毒性载体用于非肠道治疗转移性癌症。最后，将进行有效的紫杉醇和其它紫杉烷类似物对恶性肿瘤疾病的临床研究。

表 1
紫杉醇在各种溶剂中的溶解性

溶剂	实验次数	溶解性, mg/ml
DMA	3	>200
DMSO	1	>100
丙二醇	1	不溶 ^a
PEG	1	不溶
标准盐水	1	不溶
5% 葡萄糖	1	不溶
Intralipid TM	1	不溶

^a 不溶这里被定义为在室温 60 分钟后溶解度<0.1mg/ml。

表 2
一种新紫杉醇制剂的渗透压

溶液	n ^a	渗透压, mOsm/kg (±S.D.)
新储备制剂 DMA:PEG(1:3)	1	>4,000 ^b
新使用制剂 仅载体 ^c ,	3	568±10
新使用制剂 ^d , 含紫杉醇的载体	3	592±110
5% 葡萄糖水	3	286±12
标准盐水	3	233-238
血液	8	280-295
水	3	3

n^a, 独立观察的数量

^b, 该实验数据可能是人工的; 渗透压计使用冷冻点降低, 其可能不真正反应生理条件下有机溶剂的物理性质

^c, 该制剂是在本文中所述 DMA: PEG: Intralipid 使用 - 制剂

^d, 制剂是上述使用 - 制剂, 紫杉醇浓度是 1.0mg/ml

根据优选的实例, 已经描述了本发明组合物和方法, 本领域技术人员将明白在不背离本发明概念、精神和范围情况下, 各种变化可以用于这里所述的组合物、方法和方法步骤和后续步骤中。相信对于本领域技术人员来说明显的所有这些类似的替代和改变将在后面权利要求中定义的本发明的精神、范围和概念之内。

参考文献

下列参考文献 (提供典型方法或对此处所述内容的其它详细补充) 在此特别引作参考。

Andersson BS, Beran M, Pathak S, Goodacre A, Barlogie B, McCredie KB, "Ph-Positive Chronic Leukemia with Near-Haploid Conversion In Vivo and Establishment of a Continuously Growing Cell Line with Similar Cytogenetic Pattern", 《癌症遗传学和细胞遗传学》(Cancer Genetics and Cytogenet, 24:335-43, 1987。

Andersson BS, Collins VP, Kruzeck R, Larkin DW, Childs C, Ost A, Trujillo JB, Beran M, Freiech EJ, Siciliano M and Deisseroth AB, "KBM-7; Human Myeloid Leukemia Cell Line with Double Philadelphia Chromosomes but Lacking Normal BCR and c-ABL Transcripts", 《白血病》(Leukemia), 9:2100-2108, 1995。

Andersson BS, Mroue M, Britten RA, Murray D, "The Role of DNA Damage in the Resistance of Human Chronic Myeloid Leukemia Cells to Cyclophosphamide Analogs", 《癌症研究》(Cancer Research), 54:5394-5400, 1994。

Andersson BS, Sadeghi T, Siciliano M, Legerski R, Murray D, "Nucleotide Excision Repair Genes as Determinants of Cellular

Sensitivity to Cyclophosphamide Analogs”, 《癌症的化学疗法和药理学》 (Cancer Chemother and Pharmacol), In Press, 1995。

Brown T, Havlin K, Weiss G, Gagnola J, Koeller J, Rizzo J, Craig J, Phillips J, von Hoff D, “A Phase I Trial of Taxol Given by a 6-Hour Intravenous Infusion”, 《临床肿瘤学杂志》 (J. Clin. Oncology), 9:1261-1267,1991。

Chevallier B, Fumoleau P, Kerbrat P, Dieras V, Roche H, Krakowski I, Azli N, Bayssass M, Lentz MA, Van Glabbeke M, “Docetaxel is a Major Cytotoxic Drug for the Treatment of Advanced Breast Cancer: A Phase II Trial of the Clinical Screening Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer”, 《临床肿瘤学杂志》 (J. Clin. Oncol.), 13:314-322,1994。

Davis JM and Rowley SD, “Autologous Bone Marrow Graft Processing. In: 《骨髓移植方法》 (Processing of Bone Marrow for Transplantation), Sacher Ra, McCarthy LJ, Smit Siblinga Cth, American Association of Blood Banks, Arlington VA pp.41-62, 1990。

Eiseman JL, Eddington ND, Leslie J, MacAuley C, Sentz DL, Zuhowski M, Kujawa JM, Young D, Egorin MJ, “Plasma Pharmacokinetics and Tissue Distribution of 紫杉醇 在 CD₂Fl 小鼠中的血中药代和组织分布”, 《癌症的化学疗法和药理学》 (Cancer Chemother. and Pharmacol.), 34:465-471, 1994。

Fortner CL, Grove WR, Bowie D, Walker MD, “Fat Emulsion Vehicle for Intravenous Administration of an Aqueous Insoluble

Drug”, 《美国医院药理学杂志》 (Am. J. Hosp. Pharm.), 32:582-84, 1975。

Gallagher R, Collins S, Trujillo J, McCredie KB, Ahearn M, Tsai S, Anlakh GS, Ting R, Ruscetti F, Gallo R, “Characterization of Continuously Differentiating Myeloid Cell Line (HL-60) from a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia”, 《血液》 (Blood), 54:254-68, 1979。

Gorin NC, “Cryopreservation and Storage of Stem Cells. In: 《骨髓和血统细胞处理》 (Bone Marrow and Stem Cell Processing): A Manual of Current Techniques”, Areman EM, Deeg JH, Sacher RA, pp 292-362, 1992。

Hansen MB, Nielsen SE, Berg K, “Re-Examination and Further Development of a Precise and Rapid Dye Method for Measuring Cell Growth/Cell Kill”, 《免疫学方法杂志》 (J. Immunol. Methods), 119:203-210, 1989。

Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN, “Phase II Trial of Taxol, An Active Drug in the Treatment Breast Cancer”, 《国家癌症研究所杂志》 (J. National Cancer Institute), 83:1797-1805, 1991。

Keating MJ, Holmes R, Lerner S, Ho DH, “L-Asparaginase and PEG Asparaginase-Past, Present and Future”, 《白血病和淋巴瘤》 (Leukemia and Lymphoma), 10:153-57, 1993。

Kim SN, “Preclinical Toxicology and pharmacology of Dimethylacetamide with Clinical Notes”, 《药物代谢综述》 (Drug

Metab. Rev.), 19:345-368,1988.

Lockard JS, Levy RH, Congdon WC, DuCharme LL, “Efficacy and Toxicity of the Solvent Polyethylene Glycol 400 in Monkey Model”, 《癫痫》 (Epilepsia), 20:77-84,1979.

Mann HB and Whitney DR, “On a Test Whether One of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other”, 《年度数学统计》 (Ann. Math. Statist.) 18:50-60, 1947.

Nicoletti MI, Lucchini V, Massazza G, Abbott, BJ, D’Inacici M, and Giavazzi R, “Antitumor Activity of Taxol (NSC-125973) in Human Carcinomas Growing in the Peritoneal Cavity of Nude Mice”, 《肿瘤学分析》 (Annals of Oncology), 4:151-155, 1993.

Parthasarathy R, Sacks PG, Harris D, Brock H, Metha K, “Interaction of Liposome Associated All-Trans-Retinoic Acid with Squamous Carcinoma Cells”, 《癌症的化学疗法和药理学》 (Cancer Chemother. and Pharmacol.), 34:527-34, 1994.

Rizzo J, Riley C, von Hoff D, “Analysis of Anticancer Drugs in Biological Fluids: Determination of Taxol with Application to Clinical Pharmacokinetic”, 《药物学生物医学分析》 (Pharmaceut. Biomed. Anal.), 8:159-164, 1990.

Rose WC, “Taxol-Based Combination Chemotherapy and Other In Vivo Preclinical Antitumor Studies”, 《国家癌症研究所专题文章》 (Monogr National Cancer Institute), 15:47-53, 1993.

Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehover RC, “Taxol: A Novel

Investigational Antimicrotubule Agent”，《国家癌症研究所杂志》(J. National Cancer Institute), 82:1247-1259,1990。

Rowinsky EK, Mcguire WP, Donehower RC, “The current Status of Taxol. In: Principles and Practice of Gynecologic”, Hoskins WJ, Perez CA, Young RC(Eds), 《现代肿瘤学》(Oncology Updates), J.B. Lippincott Company Philadilphia, PA, 1993。

Seidman AD, Reichman BS, Crown JPA, Yao T-J, Currie V, Hakes TB Hudis CA, Gilewski TA Baselga J, Forsythe P, Lepore J, Marks L, Fain K, Souhrada M, Onetto N, Arbuck S, Norton L, “Taxol as Second Subsequent Therapy for Metastatic Breast Cancer: Activity Independent of Prior Anthracycline Response”，《临床肿瘤学杂志》(J. Clin. Oncol.), 13:1152-1159,1995。

Sharma A, Conway WD, Straubinger RM, “Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Taxol in Mouse Plasma”，《色谱杂志》(J. Chromatography B), 655:315-319,1994。

Spiegel AJ, and Noseworthy MN, “Use of Nonaqueous Solvents in Parenteral Products”，《药物科学杂志》(J. Pharm. Sci.) ,52:917-927,1963。

TAXOL[®](紫杉醇) for injection concentrate. Product insert label from Mead-Johnson, a subsidiary of Bristol Meyers Squibb, Inc..

U.S. Department of Health and Human Service: NCI 研究的药物。NIH 出版 No. 84-2141,1984。

未公开的方法: Courtesy of Xechem Inc., Newark, New Jersey。

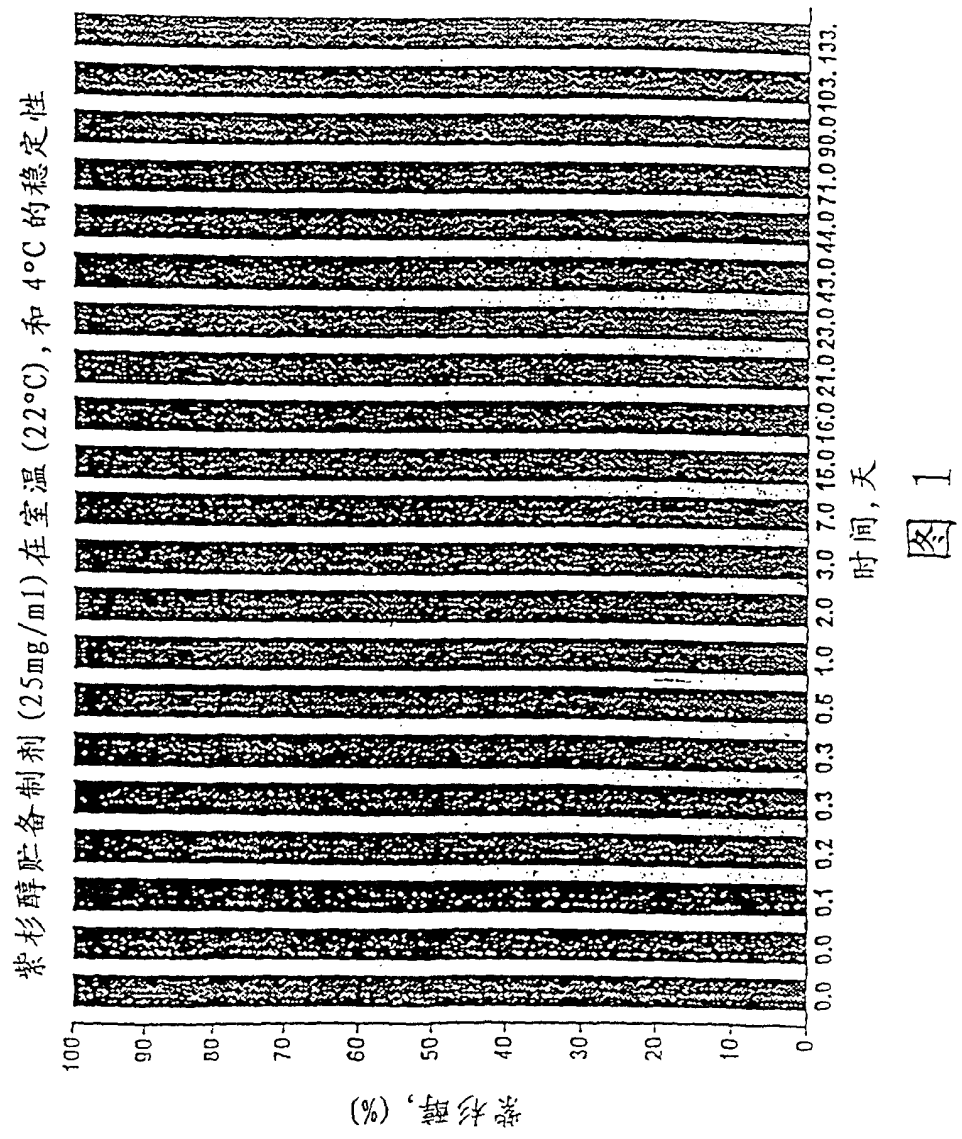
Verweij J, Clavel M, Chevalier B, “Paclitaxel (TaxolTM) and docetaxel (TaxotereTM) “Not Simply Two of a Kind”, 《肿瘤学分析》 (Annals of Oncology), 5:495-505,1994。

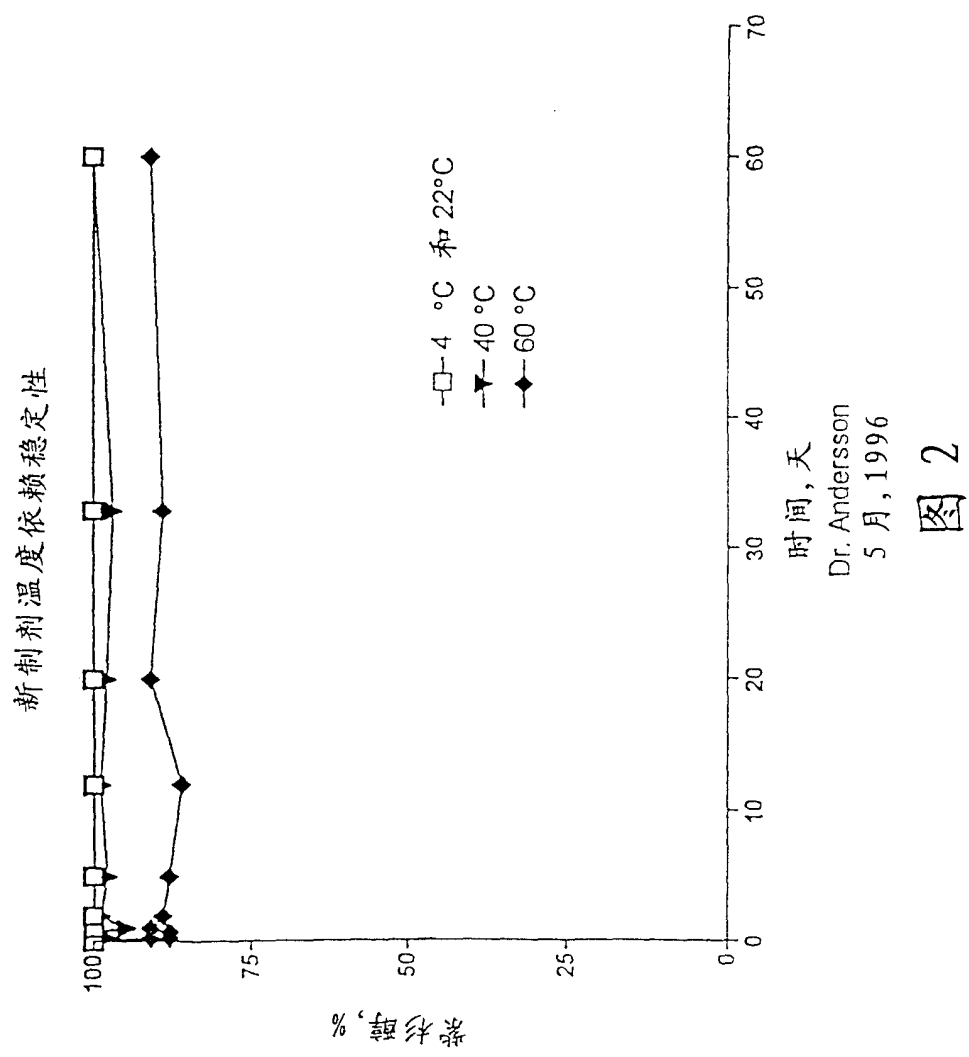
Weiss AJ, Jackson LG, Carabasi RA, Mancall EL, White JC, “二甲基乙酰胺的 I 期研究”, Cancer Chemother Rep., 16:477-85, 1962。

Weiss R, Donehower RC, Wiernick PH 等人, “Hypersensitivity Reactions from Taxol”, 《临床肿瘤学杂志》 (J. Clin. Oncology), 8:1263-1268, 1990。

Wiley TA, Bekos EJ, Gaver RC, Duncan GF, Tay LK Beijnen, Framen RH, “High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Quantitative Determination of Paxlitaxel (Taxol[®]) in Human Plasma”, 《色谱杂志》 (J. Chromatography), 621:231-238,1993。

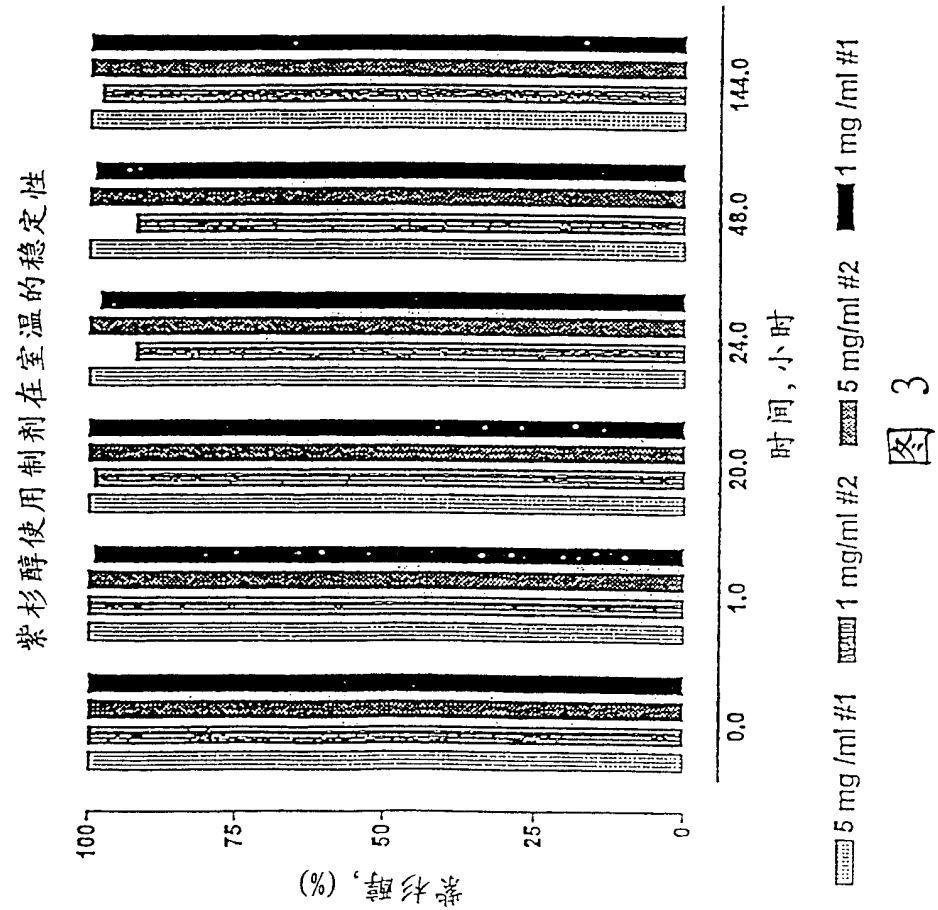
Yalkowsky SH and Roseman TJ, “Solubilization of Drugs by Cosolvents. In: 《药物溶解技术》 (Techniques of Solubilization of Drugs”, Marcel Dekker Inc., New York NY, pp 91-134, 1981。





Dr. Andersson
5 月, 1996

图 2



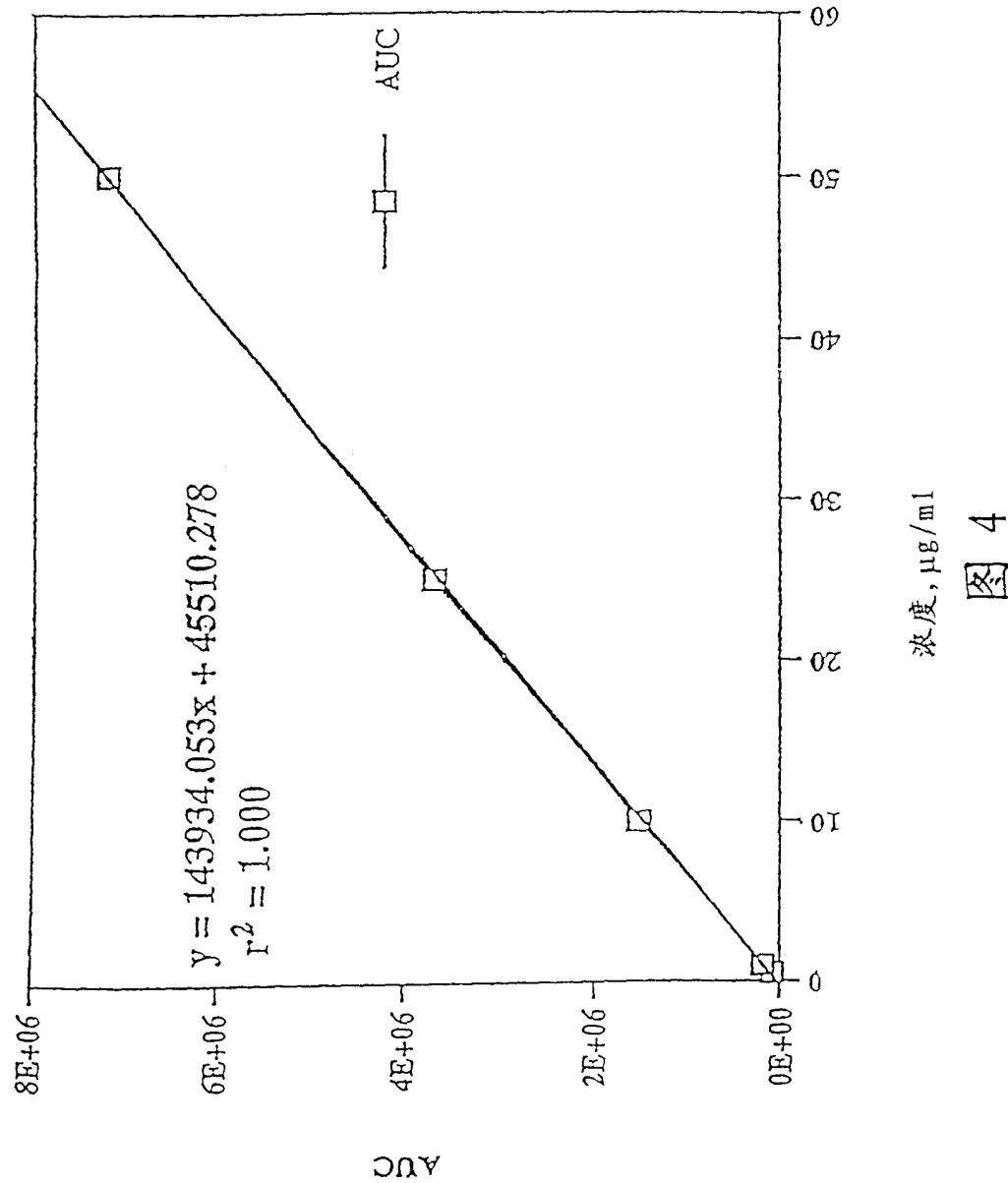


图 4

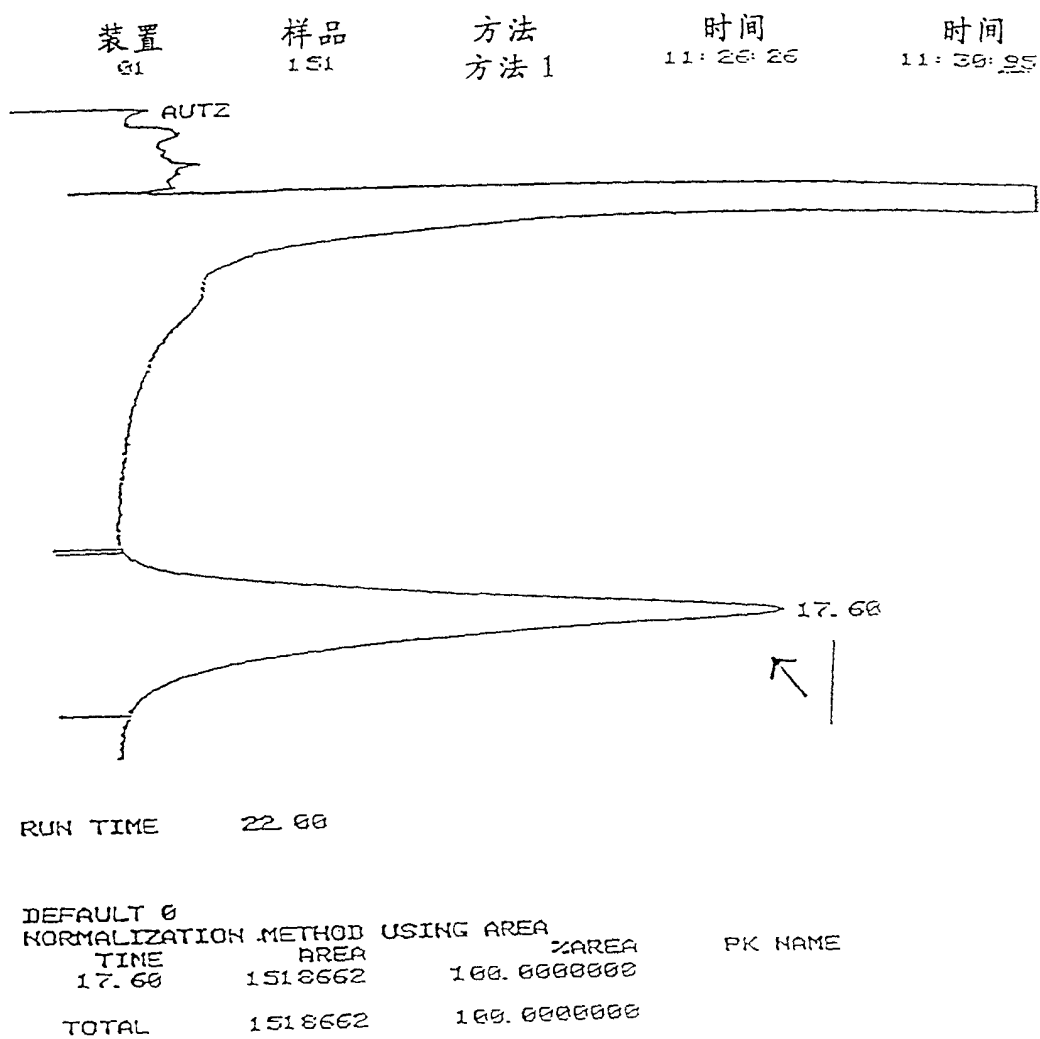


图 5A

图 5B

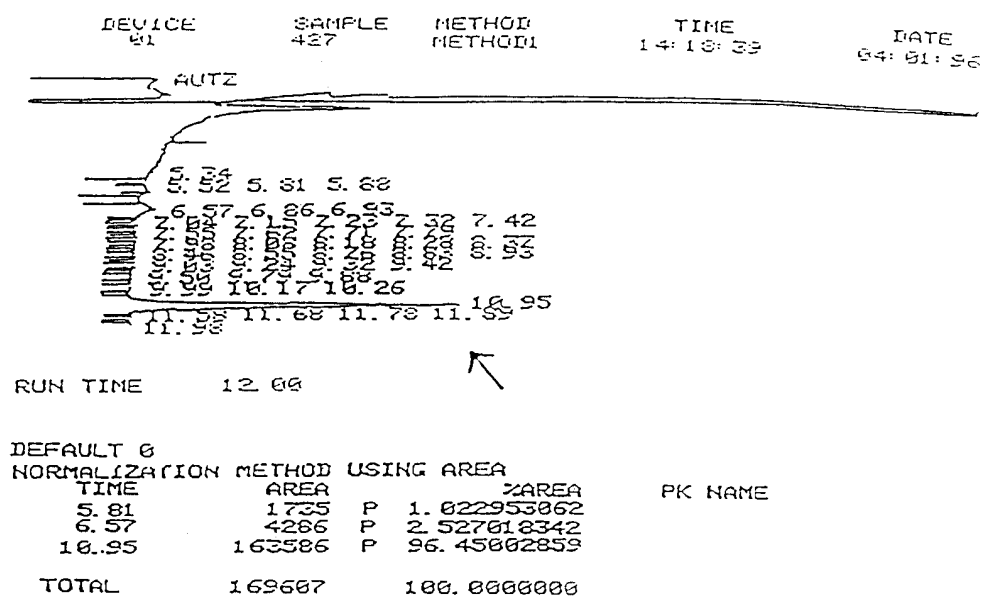
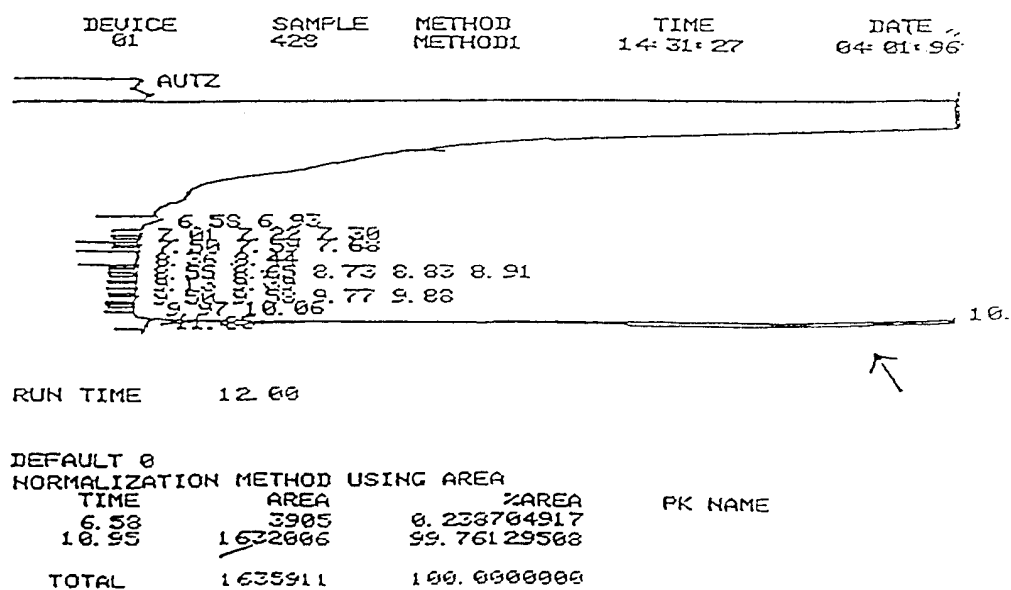


图 5C



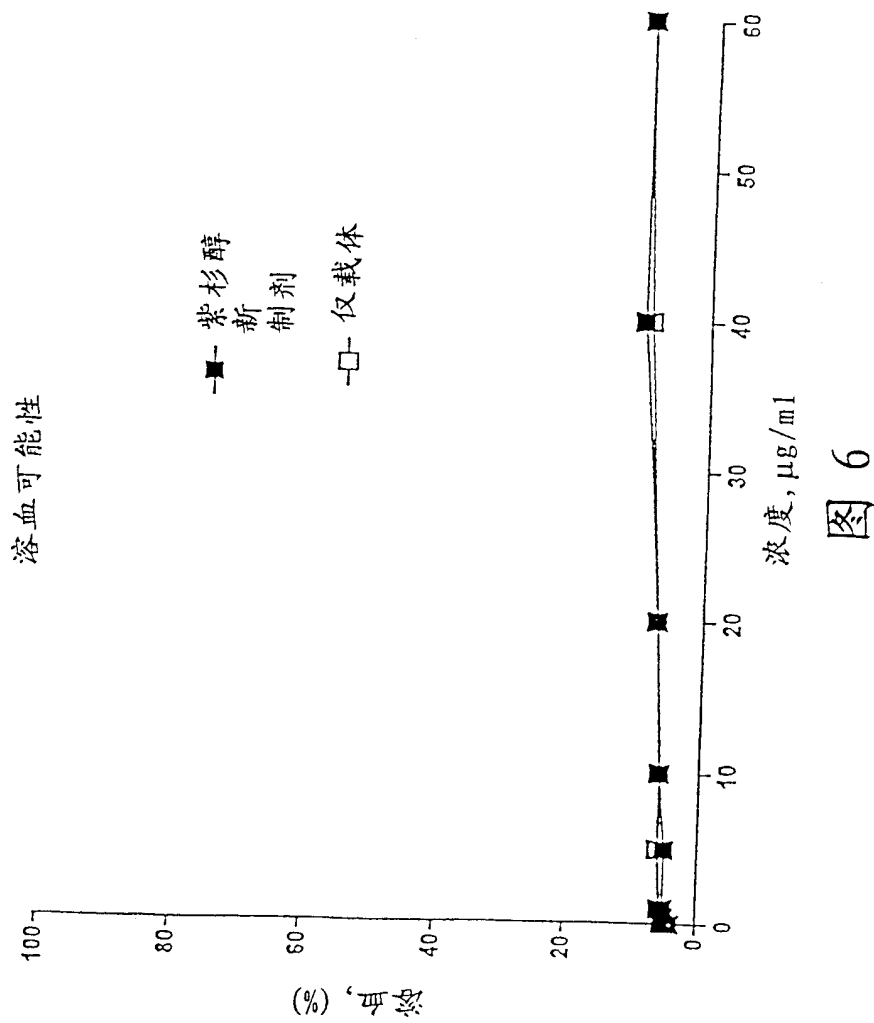


图 6

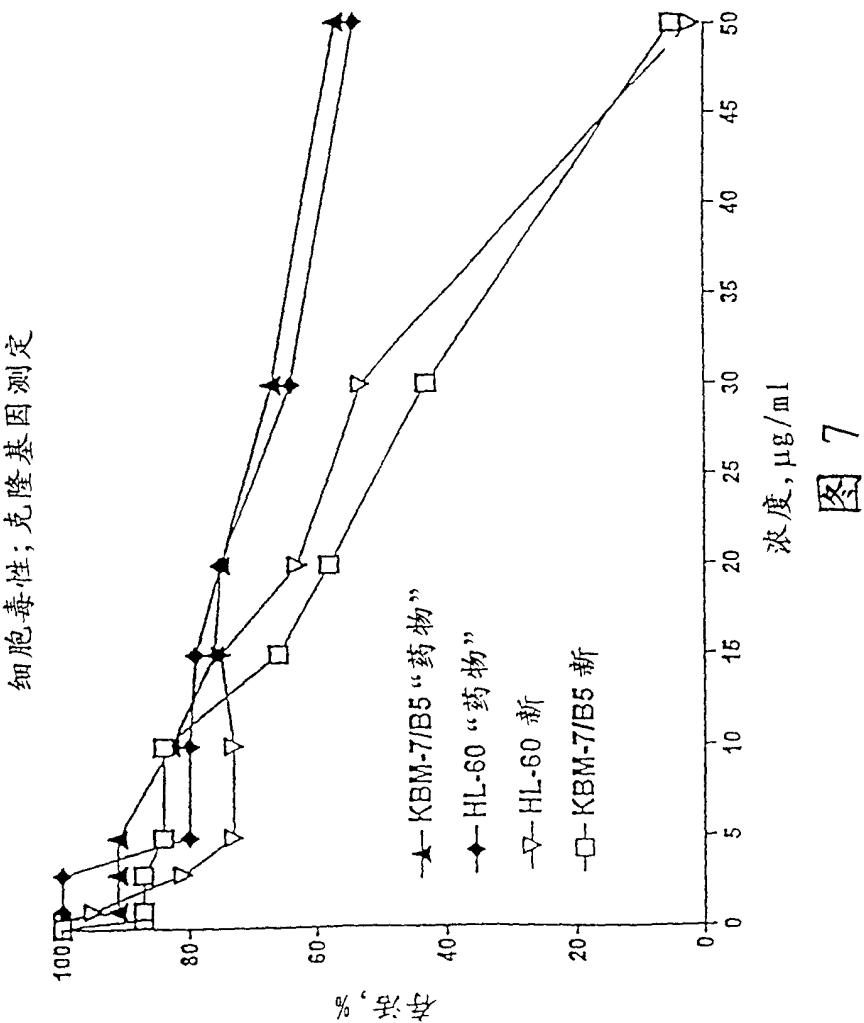


图 7

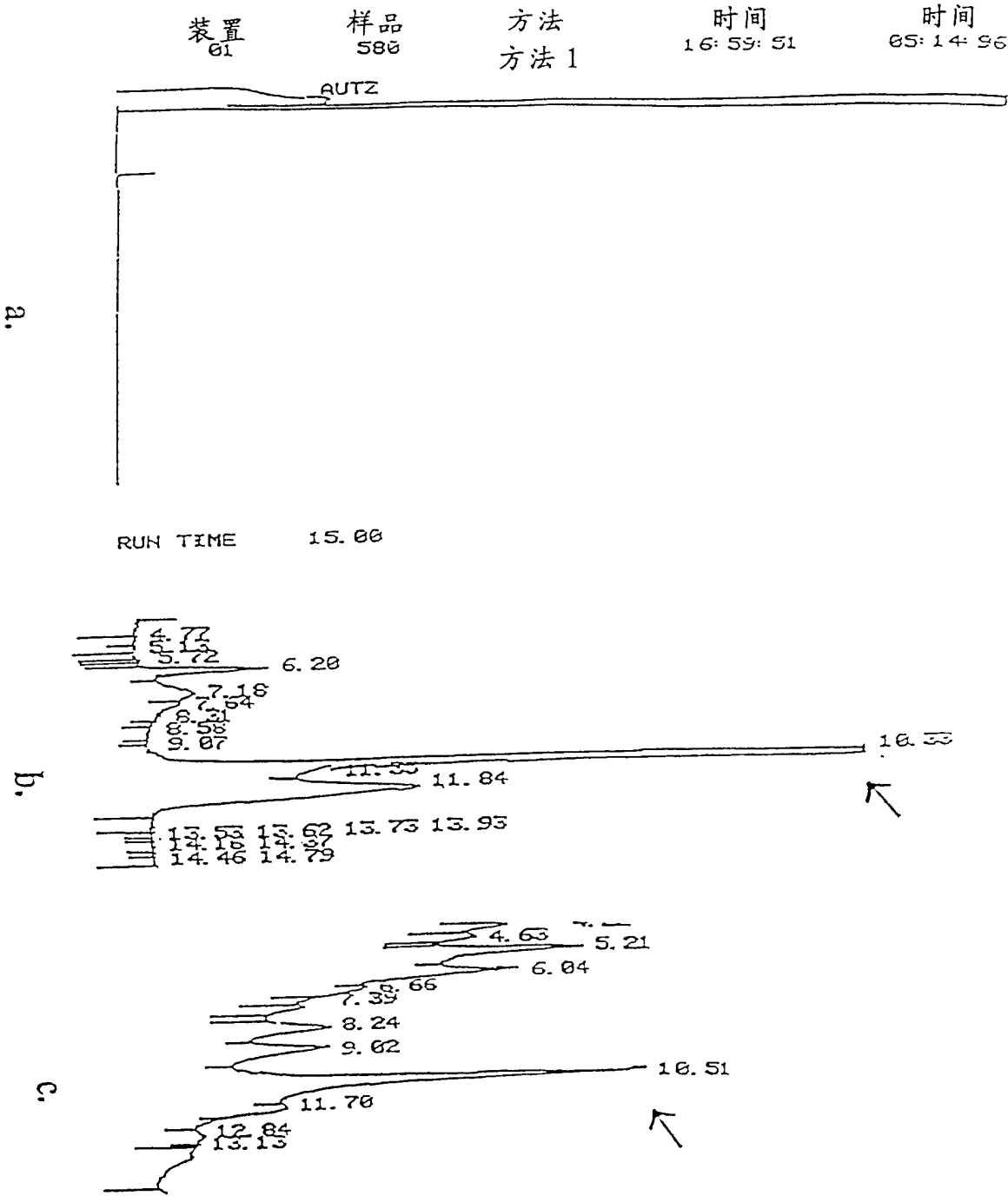


图 8

