



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103980279 B

(45) 授权公告日 2016. 07. 06

(21) 申请号 201410153207. 2

CN 1277197 A, 2000. 12. 20,

(22) 申请日 2014. 04. 16

US 5760229 A, 1998. 06. 02,

(73) 专利权人 悦康药业集团有限公司

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术开发区宏达中路6号

T. W. Hambley, 等. Crystal and Molecular Structure of Methotrexate. 《J. Am. Chem. Soc.》. 1986, 第 108 卷 (第 8 期), 第 2103-2105 页.

(72) 发明人 李琦 杨磊

Renu Chadha, 等. Characterization of solvatomorphs of methotrexate using thermoanalytical. 《Acta Pharmaceutica》. 2009, 第 59 卷 (第 3 期), 第 245-257 页.

(74) 专利代理机构 北京汇思诚业知识产权代理有限公司 11444

代理人 龚敏 王刚

审查员 孙静

(51) Int. Cl.

C07D 487/04(2006. 01)

A61K 9/19(2006. 01)

A61K 31/519(2006. 01)

A61P 35/00(2006. 01)

A61P 35/02(2006. 01)

(56) 对比文件

RD 486004 A, 2004. 09. 03,

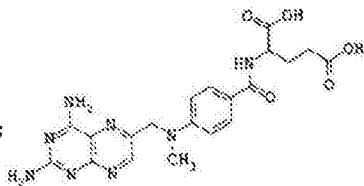
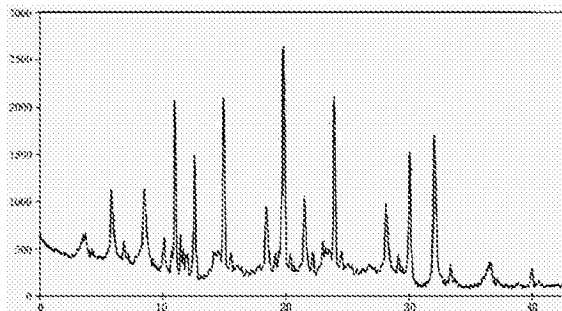
权利要求书2页 说明书10页 附图1页

(54) 发明名称

一种甲氨蝶呤化合物及注射用甲氨蝶呤

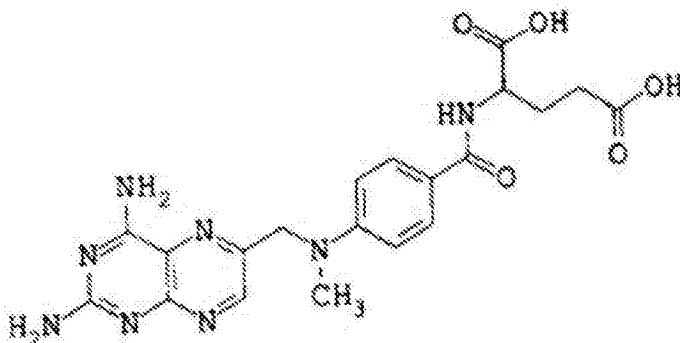
(57) 摘要

本发明涉及医药制剂领域,公开了一种式(I)所示甲氨蝶呤化合物及其组合物,所述甲氨蝶呤化合物用粉末X射线衍射测定法测定,以 $2\theta \pm 0.2$ 衍射角表示的X射线粉末衍射图谱在 5.81° 、 8.65° 、 11.08° 、 12.70° 、 15.14° 、 18.65° 、 20.27° 、 21.89° 、 24.32° 、 28.38° 、 30.27° 和 32.43° 处显示出特征衍射峰。本发明提供的甲氨蝶呤化合物稳定性得到显著提高,质量可控,长时间放置不易发生变化,大大提高了患者用药安全;



式 (I).

1. 一种甲氨蝶呤化合物,其特征在于,所述甲氨蝶呤化合物用粉末X射线衍射测定法测定,所述甲氨蝶呤化合物具有图1所示的X射线粉末衍射图谱,以 $2\theta \pm 0.2$ 衍射角表示的X射线粉末衍射图谱在 5.81° 、 8.65° 、 11.08° 、 12.70° 、 15.14° 、 18.65° 、 20.27° 、 21.89° 、 24.32° 、 28.38° 、 30.27° 和 32.43° 处显示出特征衍射峰;



式 (I)。

2. 根据权利要求1所述的甲氨蝶呤化合物的制备方法,包括以下步骤:

(1) 35°C – 45°C 下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量20–40倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀;

(2) 按2~5:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的 $1/5$ – $8/5$,并在1–3小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至 20°C – 25°C ,流加过程中以5–10rpm的低速搅拌;

(3) 流加完毕后,将溶液温度降至 0 – 5°C ,静置养晶8~12小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤, 40°C 以下低温干燥1~3小时,得甲氨蝶呤化合物。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤1中,搅拌速度为30–40rpm。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤2中,按3:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的 $4/5$,在2小时内将该混合液匀速流加到溶液A中,同时控制溶液体系温度降至 22°C ,流加过程中以6rpm的低速搅拌;所述溶液A为含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤3中,流加完毕后,将溶液温度降至 2°C ,静置养晶10小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤, 40°C 以下低温干燥2小时,得甲氨蝶呤化合物。

6. 根据权利要求2或5所述的制备方法,其特征在于,所述步骤3中降温速度为 0.2 – $0.5^\circ\text{C}/\text{分钟}$ 。

7. 含有权利要求1所述甲氨蝶呤化合物的注射用甲氨蝶呤。

8. 根据权利要求7所述注射用甲氨蝶呤,其特征在于:按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤5g、氯化钠4–5g、甘露醇75–85g,制成1000支。

9. 根据权利要求7所述注射用甲氨蝶呤,其特征在于:按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤100g、氯化钠0.5–1.5g,制成1000支。

10. 根据权利要求8或9所述注射用甲氨蝶呤,其特征在于:按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤5g、氯化钠4.3g、甘露醇80g,制成1000支;或甲氨蝶呤100g、氯

化钠1g,制成1000支。

一种甲氨蝶呤化合物及注射用甲氨蝶呤

技术领域

[0001] 本发明属于药物制剂领域,具体涉及一种甲氨蝶呤化合物及注射用甲氨蝶呤。

背景技术

[0002] 甲氨蝶呤是第一个治疗肿瘤有效的抗代谢物,对绒毛膜上皮癌和急性淋巴性白血病有较好疗效,20世纪40年代科学家发现,干酪乳杆菌中抑制小鼠移植性肿瘤肉瘤S180和自发性乳癌的有效成分为蝶呤三谷氨酸,后者有弱的抗叶酸作用;并观察到缺乏叶酸则骨髓受抑制;叶酸能促进白血病发展等现象,故开始从叶酸抗代谢物中寻找抗癌药。1947年甲氨蝶呤试用于临床,对儿童白血病有效。继后发现甲氨蝶呤对小鼠白血病L1210有较高的治疗指数,50年代试用于临床,很快取代了氨蝶呤用于白血病治疗,以后扩大至治疗其它肿瘤。它是研究最深入的抗肿瘤药物之一。

[0003] 甲氨蝶呤,又称细胞毒药,为了减轻其细胞毒的毒性,可以配合甲酰四氢叶酸钙一起使用,主要用于治疗急性白血病(急性淋巴细胞白血病)、乳腺癌、绒毛膜上皮癌及恶性葡萄胎、头颈部癌、骨肿瘤、白血病脑膜脊髓浸润、肺癌、生殖系统肿瘤、肝癌、顽固性普通牛皮癣、皮炎、体肌炎、强直性脊柱炎、克罗恩病、牛皮癣和银屑病性关节炎、白塞氏病和自体免疫病。

[0004] 甲氨蝶呤也是一种免疫抑制剂,可以缓解风湿进程,对类风湿性关节炎的滑膜炎症的治疗效果特别好,是类风湿疾病患者使用最多的药物之一。

[0005] 目前现有技术公开了多种含甲氨蝶呤的制剂,片剂、注射液等,如:

[0006] 中国申请CN1754538公开了一种甲氨蝶呤口腔崩解片,由甲氨蝶呤、干燥粘合剂、润滑剂、崩解剂和矫味剂等组分组成,其特征在于所说口腔崩解片的组成含量,以重量百分数计为:3.5-7.5wt%的甲氨蝶呤,20.0-24.0wt%的羧甲基淀粉钠,55.0-65.0wt%的微晶纤维素,1.0-2.0wt%的硬脂酸镁,10.0-20.0wt%的甘露醇。该口腔崩解片虽然一定程度上能够提高生物利用度,但其临床应用效果依然远不及注射给药。

[0007] 冻干制剂是一种理想的注射给药形式,但由于甲氨蝶呤冻干制剂本身及临床应用过程中对甲氨蝶呤原料都提出了较高要求,而甲氨蝶呤本身的保存稳定性不佳,因此,依然有待于找到一种理想的甲氨蝶呤化合物,以进一步得到稳定性、疗效等显著优于现有技术的注射用甲氨蝶呤。

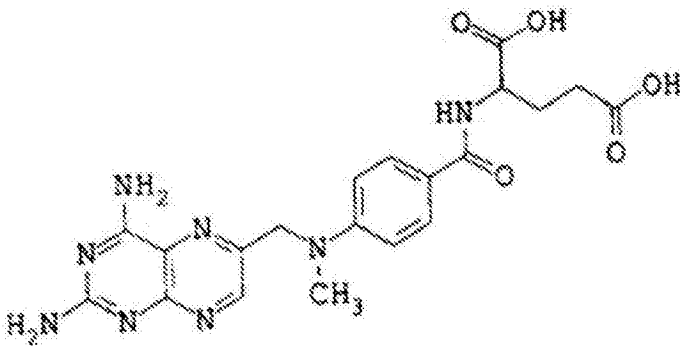
发明内容

[0008] 本发明的第一目的在于提供一种甲氨蝶呤化合物,以提高作为制剂原料的甲氨蝶呤本身的稳定性。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种甲氨蝶呤化合物,所述甲氨蝶呤化合物用粉末X射线衍射测定法测定,以 $2\theta \pm 0.2$ 衍射角表示的X射线粉末衍射图谱在 5.81° 、 8.65° 、 11.08° 、 12.70° 、 15.14° 、 18.65° 、 20.27° 、 21.89° 、 24.32° 、 28.38° 、 30.27° 和 32.43° 处显示出特征衍射峰;

[0011]



式 (I)。

[0012] 虽然甲氨蝶呤是一种已知物质,但发明人在实际应用过程中发现,甲氨蝶呤本身的稳定性差,在长时间保存过程中表现出有效成分含量较为明显的下降,严重威胁患者的用药安全。

[0013] 发明人在对甲氨蝶呤进行重结晶纯化的过程中意外发现,当选择不同的溶剂体系,通过对重结晶方法进行控制出人意的能够诱导出一种全新的甲氨蝶呤化合物,将该化合物的X射线粉末衍射图与现有公开的甲氨蝶呤粉末衍射图比较发现,本发明得到的是一种全新的甲氨蝶呤化合物。该新型甲氨蝶呤化合物本身及其制剂在稳定性试验等均表现出显著优于市售已知甲氨蝶呤化合物的优势。

[0014] 此外,为了获得一种成熟的,可重复实现并工业化推广应用的重结晶方法,发明人对此做了大量针对性试验,进一步优化了各操作步骤,使所述的制备方法能够稳定地实现,获得均一的高质量甲氨蝶呤化合物。

[0015] 值得注意的是,本发明所述的甲氨蝶呤粗品即市售的已知甲氨蝶呤,具体的获取为本领域技术人员所掌握。

[0016] 本发明所述的制备方法包括如下步骤:

[0017] (1)35℃-45℃下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量20-40倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀;

[0018] (2)按2~5:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的1/5-8/5,并在1-3小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至20℃-25℃,流加过程中以5-10rpm的低速搅拌;

[0019] (3)流加完毕后,将溶液温度降至0~5℃,静置养晶8~12小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤,40℃以下低温干燥1~3小时,得甲氨蝶呤化合物。

[0020] 其中,所述步骤1中,搅拌速度为30-40rpm,优选搅拌速度为35rpm。

[0021] 步骤2中,按3:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的4/5,在2小时内将该混合液匀速流加到溶液A中,同时控制溶液体系温度降至22℃,流加过程中以6rpm的低速搅拌。

[0022] 步骤3中,流加完毕后,将溶液温度降至2℃,静置养晶10小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤,40℃以下低温干燥2小时,得甲氨蝶呤化合物。

[0023] 所述步骤3中降温速度为0.2-0.5℃/分钟。

[0024] 除特别说明外,本发明所述重量与体积比的单位为g/ml。

[0025] 采用上述技术方案,本发明可以批量得到高质量的甲氨蝶呤化合物,上述制备方法操作简单,对设备和人工的要求低,再现性强,且纯度和收率高,适宜推广生产。

[0026] 本发明的第二目的在于提供一种含有上述甲氨蝶呤化合物的注射用甲氨蝶呤。

[0027] 本发明所述的注射用甲氨蝶呤,按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤5g、氯化钠4-5g、甘露醇75-85g,制成1000支。

[0028] 或按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤100g、氯化钠0.5-1.5g,制成1000支。

[0029] 更进一步地,作为本发明的最佳技术方案,优选按重量份计,由包括以下组分的原料制备而成:甲氨蝶呤5g、氯化钠4.3g、甘露醇80g,制成1000支;或甲氨蝶呤100g、氯化钠1g,制成1000支。

[0030] 上述注射用甲氨蝶呤可采用现有技术公开的各种制备方法制备,本发明优选采用如下技术方案:

[0031] (1)按处方称取甲氨蝶呤,加注射用水至处方量的80%,用1%氢氧化钠溶液调节pH值为8.5~9.0,加入氯化钠或氯化钠及甘露醇,搅拌溶解,加注射用水至全量,加入0.03%针用炭吸附20分钟,过滤脱炭,用0.22um微孔滤膜过滤除菌,中间品检测;

[0032] (2)分装,半加塞;

[0033] (3)冷冻干燥:

[0034] 将制品放入已经降温至-40℃的冷冻干燥箱中,当制品温度降至-40℃时,预冻3小时,冷凝器制冷,抽真空,待冷凝器温度及真空度稳定后,搁板加热,使制品缓慢升温,速度3℃/小时速度升温至-8℃,再以2℃/小时速度升温至10℃,再以4℃/小时速度升温至30℃,保持4小时,结束冻干,压塞,轧盖,即得。

[0035] 上述冻干过程能够制得高质量的冻干粉针,其外观良好,且复溶性及稳定性均优于已知制剂,从而保证了患者的用药安全。

附图说明

[0036] 图1为本发明所述甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图;

[0037] 图2为本发明试验例3得到的血药浓度曲线。

具体实施方式

[0038] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0039] 实施例1甲氨蝶呤化合物的制备

[0040] 甲氨蝶呤化合物的制备:

[0041] (1)40℃下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量30倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀,搅拌速度为35rpm;

[0042] (2)按4:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的4/5,并在2小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至22℃,流加过程中以8rpm的低速搅拌;

[0043] (3)流加完毕后,将溶液温度降至2℃,降温速度为0.4℃/分钟,静置养晶10小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤,40℃以下低温干燥2小时,得甲氨蝶呤化合物,总收率为95.43%,纯

度为99.5%。

[0044] 所得甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图见图1(在 5.81° 、 8.65° 、 11.08° 、 12.70° 、 15.14° 、 18.65° 、 20.27° 、 21.89° 、 24.32° 、 28.38° 、 30.27° 和 32.43° 处显示出特征衍射峰)。

[0045] 实施例2甲氨蝶呤化合物的制备

[0046] 甲氨蝶呤化合物的制备:

[0047] (1) 35°C 下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量20倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀,搅拌速度为30rpm;

[0048] (2)按2:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的 $1/5$,并在1小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至 20°C ,流加过程中以5rpm的低速搅拌;

[0049] (3)流加完毕后,将溶液温度降至 0°C ,降温速度为 $0.2^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$,静置养晶8小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤, 40°C 以下低温干燥1小时,得甲氨蝶呤化合物,总收率为93.40%,纯度为99.2%。

[0050] 所得甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图见图1。

[0051] 实施例3甲氨蝶呤化合物的制备

[0052] 甲氨蝶呤化合物的制备:

[0053] (1) 45°C 下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量40倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀,搅拌速度为40rpm;

[0054] (2)按5:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的 $8/5$,并在3小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至 25°C ,流加过程中以10rpm的低速搅拌;

[0055] (3)流加完毕后,将溶液温度降至 5°C ,降温速度为 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$,静置养晶12小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤, 40°C 以下低温干燥3小时,得甲氨蝶呤化合物,总收率为93.21%,纯度为99.0%。

[0056] 所得甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图见图1。

[0057] 实施例4甲氨蝶呤化合物的制备

[0058] 甲氨蝶呤化合物的制备:

[0059] (1) 42°C 下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量25倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀,搅拌速度为32rpm;

[0060] (2)按3:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的 $2/5$,并在1.5小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至 20°C ,流加过程中以6rpm的低速搅拌;

[0061] (3)流加完毕后,将溶液温度降至 2°C ,降温速度为 $0.4^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$,静置养晶9小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤, 40°C 以下低温干燥1小时,得甲氨蝶呤化合物,总收率为92.30%,纯度为98.8%。

[0062] 所得甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图见图1。

[0063] 实施例5甲氨蝶呤化合物的制备

[0064] 甲氨蝶呤化合物的制备:

[0065] (1)38℃下,称取甲氨蝶呤粗品,加入到体积相当于甲氨蝶呤粗品重量25倍的邻苯二甲酸二丁酯中,搅拌均匀,搅拌速度为40rpm;

[0066] (2)按4:1的用量比配置乙醇与乙醚的混合液,混合液的体积为邻苯二甲酸二丁酯的3/5,并在1小时内将该混合液匀速流加到含有甲氨蝶呤的邻苯二甲酸二丁酯中,同时控制溶液体系温度降至20℃,流加过程中以5rpm的低速搅拌;

[0067] (3)流加完毕后,将溶液温度降至0~5℃,降温速度为0.2℃/分钟,静置养晶9小时,过滤,滤饼用乙醚洗涤,40℃以下低温干燥2小时,得甲氨蝶呤化合物,总收率为92.43%,纯度为99.1%。

[0068] 所得甲氨蝶呤化合物的X射线粉末衍射图见图1。

[0069] 实施例6注射用甲氨蝶呤

[0070] 处方:实施例1所制得的甲氨蝶呤化合物甲氨蝶呤5g、氯化钠4.3g、甘露醇80g,制成1000支;

[0071] 制备方法:

[0072] (1)按处方称取甲氨蝶呤,加注射用水至处方量的80%,用1%氢氧化钠溶液调节pH值为8.8,加入氯化钠及甘露醇,搅拌溶解,加注射用水至全量,加入0.03%针用炭吸附20分钟,过滤脱炭,用0.22um微孔滤膜过滤除菌,中间品检测;

[0073] (2)分装,半加塞;

[0074] (3)冷冻干燥:

[0075] 将制品放入已经降温至-40℃的冷冻干燥箱中,当制品温度降至-40℃时,预冻3小时,冷凝器制冷,抽真空,待冷凝器温度及真空度稳定后,搁板加热,使制品缓慢升温,速度3℃/小时速度升温至-8℃,再以2℃/小时速度升温至10℃,再以4℃/小时速度升温至30℃,保持4小时,结束冻干,压塞,轧盖,即得。

[0076] 实施例7注射用甲氨蝶呤

[0077] 处方:实施例2所制得的甲氨蝶呤化合物甲氨蝶呤100g、氯化钠1g,制成1000支。

[0078] 制备方法:

[0079] (1)按处方称取甲氨蝶呤,加注射用水至处方量的80%,用1%氢氧化钠溶液调节pH值为8.9,加入氯化钠,搅拌溶解,加注射用水至全量,加入0.03%针用炭吸附20分钟,过滤脱炭,用0.22um微孔滤膜过滤除菌,中间品检测;

[0080] (2)分装,半加塞;

[0081] (3)冷冻干燥:

[0082] 将制品放入已经降温至-40℃的冷冻干燥箱中,当制品温度降至-40℃时,预冻3小时,冷凝器制冷,抽真空,待冷凝器温度及真空度稳定后,搁板加热,使制品缓慢升温,速度3℃/小时速度升温至-8℃,再以2℃/小时速度升温至10℃,再以4℃/小时速度升温至30℃,保持4小时,结束冻干,压塞,轧盖,即得。

[0083] 实施例8注射用甲氨蝶呤

[0084] 处方:实施例1所制得的甲氨蝶呤化合物甲氨蝶呤5g、氯化钠4g、甘露醇75g,制成1000支;

[0085] 制备方法:

[0086] (1)按处方称取甲氨蝶呤,加注射用水至处方量的80%,用1%氢氧化钠溶液调节

pH值为9.0,加入氯化钠及甘露醇,搅拌溶解,加注射用水至全量,加入0.03%针用炭吸附20分钟,过滤脱炭,用0.22um微孔滤膜过滤除菌,中间品检测;

[0087] (2)分装,半加塞;

[0088] (3)冷冻干燥:

[0089] 将制品放入已经降温至-40℃的冷冻干燥箱中,当制品温度降至-40℃时,预冻3小时,冷凝器制冷,抽真空,待冷凝器温度及真空度稳定后,搁板加热,使制品缓慢升温,速度3℃/小时速度升温至-8℃,再以2℃/小时速度升温至10℃,再以4℃/小时速度升温至30℃,保持4小时,结束冻干,压塞,轧盖,即得。

[0090] 实施例9注射用甲氨蝶呤

[0091] 处方:实施例2所制得的甲氨蝶呤化合物甲氨蝶呤100g、氯化钠0.5g,制成1000支。

[0092] 制备方法:

[0093] (1)按处方称取甲氨蝶呤,加注射用水至处方量的80%,用1%氢氧化钠溶液调节pH值为9.0,加入氯化钠,搅拌溶解,加注射用水至全量,加入0.03%针用炭吸附20分钟,过滤脱炭,用0.22um微孔滤膜过滤除菌,中间品检测;

[0094] (2)分装,半加塞;

[0095] (3)冷冻干燥:

[0096] 将制品放入已经降温至-40℃的冷冻干燥箱中,当制品温度降至-40℃时,预冻3小时,冷凝器制冷,抽真空,待冷凝器温度及真空度稳定后,搁板加热,使制品缓慢升温,速度3℃/小时速度升温至-8℃,再以2℃/小时速度升温至10℃,再以4℃/小时速度升温至30℃,保持4小时,结束冻干,压塞,轧盖,即得。

[0097] 实施例10注射用甲氨蝶呤

[0098] 与实施例7相比,区别点仅在于本实施例处方为:实施例3所制得的甲氨蝶呤100g、氯化钠1.5g,制成1000支。

[0099] 实施例11注射用甲氨蝶呤

[0100] 与实施例7相比,区别点仅在于本实施例处方为:实施例4所制得的甲氨蝶呤5g、氯化钠5g、甘露醇85g,制成1000支。

[0101] 本发明还进一步提供如下试验例,以进一步对本发明的技术方案进行说明。

[0102] 试验例1甲氨蝶呤稳定性试验

[0103] 本试验例检测了本发明所提供的甲氨蝶呤化合物的稳定性(试验结果均以各试验组甲氨蝶呤重量计算)。

[0104] 本试验按照中国药典2005版第二部附录XIX C药物稳定性试验指导原则进行,结果如下:

[0105] 表1、加速试验结果

[0106]

组别	1个月	2个月	3个月	6个月	12个月
实施例1	100.1%	99.96%	99.94%	99.72%	99.52%
实施例2	99.99%	99.93%	99.90%	99.69%	99.46%
实施例3	99.96%	99.92%	99.85%	99.66%	99.41%
实施例4	100.0%	99.93%	99.83%	99.70%	99.40%

对照组1	99.90%	99.52%	98.41%	94.51%	92.02%
------	--------	--------	--------	--------	--------

[0107] 表2、长期试验结果

[0108]	组别	3个月	6个月	9个月	12个月	18个月
	实施例1	99.99%	99.84%	99.81%	99.73%	99.69%

[0109]	实施例2	99.96%	99.79%	99.76%	99.65%	99.59%
	实施例3	99.93%	99.81%	99.72%	99.64%	99.60%
	实施例4	99.95%	99.92%	99.75%	99.66%	99.61%
	对照组1	99.66%	98.73%	97.56%	96.21%	95.02%

[0110] 其中：

[0111] 对照组1为市售的甲氨蝶呤；

[0112] 实验组1~4分别为本发明实施例1~4制备的甲氨蝶呤化合物；

[0113] 本实验说明,本发明提供的甲氨蝶呤化合物稳定性好,加速、长期试验纯度含量变化小。而现有技术公开的其他水合物晶体稳定性差。上述稳定性试验中以实施例1的稳定性最佳。

[0114] 试验例2注射用甲氨蝶呤稳定性试验

[0115] 加速试验

[0116] 方法:取各实验组样品,于恒温 $40 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $75 \pm 5\%$ 干燥箱内放置六个月。在试验期间于第1、2、3和6个月各取样一次,按上述考察项目进行检测,并与0月结果比较。试验结果表明,本发明所得冻干粉针剂的性状、pH值、溶液澄清度与颜色、含量及有关物质基本无变化。具体测定结果见表3。

[0117] 表3注射用甲氨蝶呤加速试验结果

样品	时间(月)	外观性状	pH值	可见异物	有关物质 (%)	含量(%)
[0118] 1	0	黄色疏松块状物	7.93	符合规定	0.90	99.93
	1	黄色疏松块状物	7.92	符合规定	0.92	99.87
	2	黄色疏松块状物	7.92	符合规定	0.96	99.79
	3	黄色疏松块状物	7.88	符合规定	0.98	99.63
	6	黄色疏松块状物	7.83	符合规定	1.03	99.28
2	0	黄色疏松块状物	7.92	符合规定	1.00	99.91
	1	黄色疏松块状物	7.91	符合规定	1.02	99.85
	2	黄色疏松块状物	7.88	符合规定	1.05	99.61

[0119]	3	黄色疏松块状物	7.85	符合规定	1.10	99.15	
		黄色疏松块状物	7.82	符合规定	1.16	99.01	
	3	0	黄色疏松块状物	7.92	符合规定	1.10	99.98
		1	黄色疏松块状物	7.84	符合规定	1.18	98.23
		2	黄色疏松块状物	7.69	符合规定	1.23	96.38
		3	黄色疏松块状物	7.32	符合规定	1.32	94.35
		6	黄色疏松块状物	7.06	符合规定	1.51	92.14

[0120] 长期试验

[0121] 方法:取各实验组样品,于 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $60\pm 10\%$ 的条件下放置,在试验期间于第3、6、9、12个月各取样一次,按上述考察项目进行检测,并与0月比较。

[0122] 长期试验至12个月的结果表明,三批样品的性状、pH值、溶液澄清度与颜色、含量及有关物质基本无变化。测定结果见表4和5。

[0123] 表4注射用甲氨蝶呤长期试验考察结果

样品	时间(月)	性状	pH值	可见异物	有关物质 (%)	含量(%)
[0124]	1	黄色疏松块状物	7.95	符合规定	0.94	99.9
		黄色疏松块状物	7.92	符合规定	1.01	99.8
		黄色疏松块状物	7.92	符合规定	1.02	99.7
		黄色疏松块状物	7.92	符合规定	1.03	99.6
		黄色疏松块状物	7.93	符合规定	1.05	99.5
2	0	黄色疏松块状物	7.94	符合规定	1.01	99.7
	3	黄色疏松块状物	7.95	符合规定	1.03	99.6
	6	黄色疏松块状物	7.96	符合规定	1.08	99.1
	9	黄色疏松块状物	7.90	符合规定	1.12	99.2
	12	黄色疏松块状物	7.88	符合规定	1.13	98.8
3	0	黄色疏松块状物	7.90	符合规定	1.10	99.89

[0125]	3	黄色疏松块状物	7.82	符合规定	1.15	98.54
	6	黄色疏松块状物	7.86	符合规定	1.19	97.32
	9	黄色疏松块状物	7.77	符合规定	1.28	95.32
	12	黄色疏松块状物	7.52	符合规定	1.39	93.15

[0126] 表5长期试验热原、无菌检查结果

样品批号	时间(月)	热原	无菌
1	0	符合规定	符合规定
	12	符合规定	符合规定
2	0	符合规定	符合规定
	12	符合规定	符合规定
3	0	符合规定	符合规定
	12	符合规定	符合规定

[0128] 其中样品1、2为本发明实施例6、7制备的注射用甲氨蝶呤；

[0129] 样品3为以市售的甲氨蝶呤取代本发明所述甲氨蝶呤化合物作为原料，按与实施例6相同的制备方法和处方制备得到的注射用甲氨蝶呤。

[0130] 试验结论：

[0131] 试验品为采用棕色西林瓶包装的无菌冻干品，经6个月加速试验和12个月长期试验，与0月相比，各项考察指标均无明显变化，试验品稳定性良好，且显著优于以市售甲氨蝶呤为原料制备的制剂。

[0132] 本发明其他实施例产品也进行了相同的实验，并得到相同趋势的实验结果，但篇幅所限，本发明不再一一列举。

[0133] 试验例3药效学试验

[0134] 1. 病例选择患恶性肿瘤患儿20例，男11例，女9例，年龄5-12岁，体重15-31kg。急性淋巴病8例，非何杰金氏淋巴瘤12例，化疗前血常规及肝、肾功能检查均未见异常。

[0135] 上述20名受试者随机分为对照组和试验组两组。

[0136] 2. 药品、试剂及甲氨蝶呤浓度测定

[0137] 实验组：实施例6所制备的注射用甲氨蝶呤

[0138] 对照组：试验例2中的样品3，即使用市售的甲氨蝶呤粗品作为原料，其他按实施例6相同的技术方案制备而成的注射用甲氨蝶呤。

[0139] 以荧光偏振免疫测定法(FPIA)测定甲氨蝶呤血药浓度，TDx仪及甲氨蝶呤试剂盒系美国雅培公司(Abbott Laboratories)出品。定时(0、6、12、18、24h)采静脉血0.5ml，3000r/min离心5min，吸取血清，4℃保存待测。测定步骤按TDx仪操作指南进行。FPIA法测定甲氨蝶呤的最低限为0.01μmol/L，日内差异与日间差异均<10%。

[0140] 3. 化疗方案甲氨蝶呤剂量为1-2g/m²。先静脉注射1/3剂量，另2/3剂量的甲氨蝶呤

配于500m15%葡萄糖注射液中,24h静滴完。化疗前24h静滴250m15%碳酸氢钠液,保持尿液pH大于等于7。甲酰四氢叶酸钙在停药后6h给予,每次肌注15mg,共8-12次,或直至甲氨蝶呤血药浓度小于 $0.05\mu\text{mol/L}$ 。

[0141] 4.数据处理采用中国药理学会数学药理学编的3P87程序在SUN-386计算机上处理所得的血药浓度数据。

[0142] 结果见图2,其中,系列1为对照组血药浓度曲线,系列2为实验组血药浓度曲线。横坐标单位为h,纵坐标单位为 $\mu\text{mol/L}$ 。

[0143] 从图2中可以看出,本发明的产品具有更为一致的血药浓度变化趋势,且本发明产品血药浓度曲线变化更为平缓,表明其生物利用度高,缓和的血药浓度曲线使得药效得以更好的发挥。

[0144] 对本发明其它实施例的注射用甲氨蝶呤也分别在同等条件下进行了相同的试验,其具有与上相同的趋势。

[0145] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神 的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范

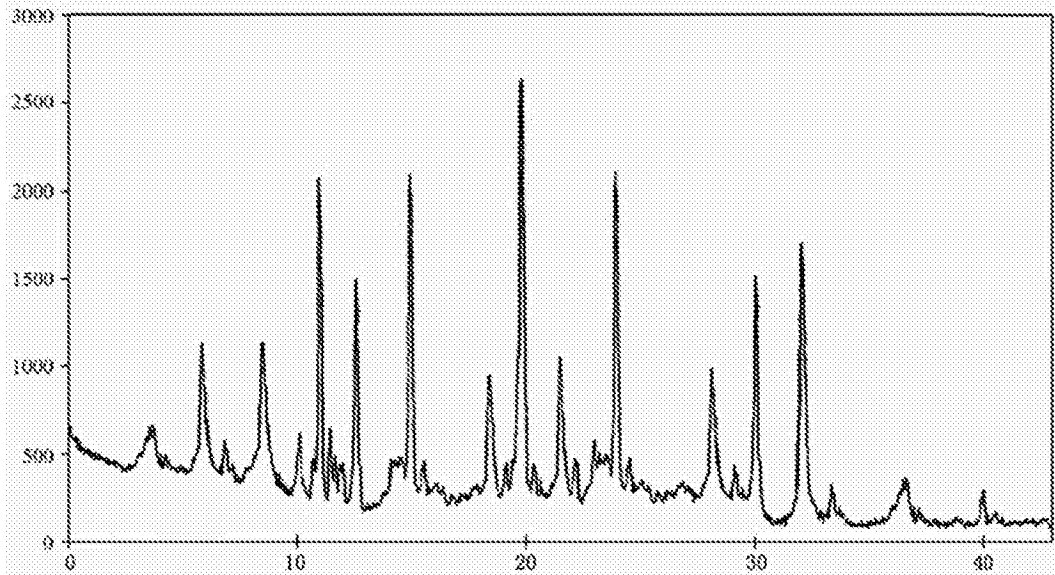


图1

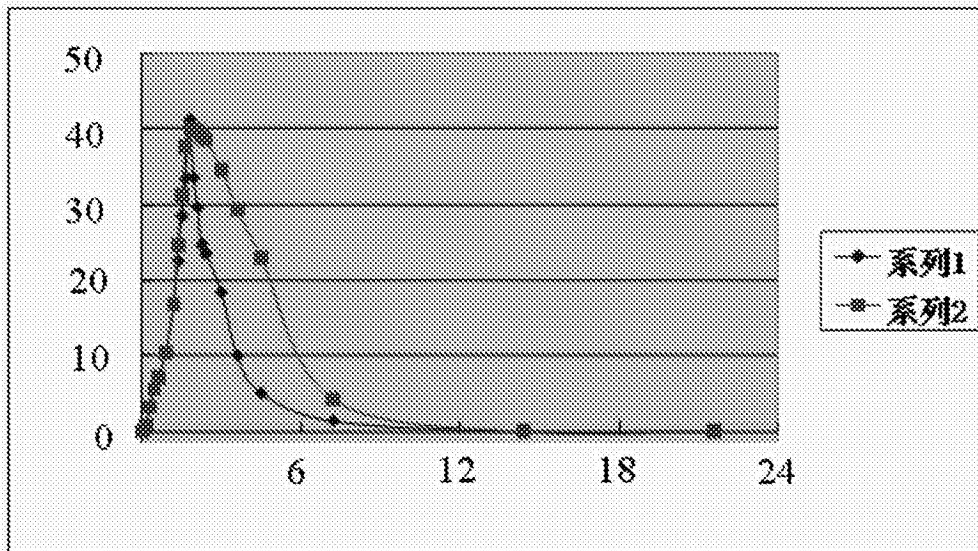


图2