



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101020059 B

(45) 授权公告日 2011.01.05

(21) 申请号 200610023888.6

页的实施例 I . 4, I . 5, I . 7 和 I . 12.

(22) 申请日 2006.02.15

审查员 吕霖

(73) 专利权人 中国科学院上海药物研究所

地址 201203 上海市浦东张江高科技园区祖  
冲之路 555 号

(72) 发明人 李亚平 陈伶俐 顾王文

(74) 专利代理机构 上海开祺知识产权代理有限  
公司 31114

代理人 张萍 汪克臻

(51) Int. Cl.

A61K 47/40(2006.01)

A61K 47/16(2006.01)

A61K 31/337(2006.01)

A61K 9/19(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1660073 A, 2005.08.31, 权利要求 1-8.

CN 1568178 A, 2005.01.19, 权利要求 1 和 6.

CN 1281373 A, 2001.01.24, 说明书第 9-12

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称

一种含多烯紫杉醇类物质的药物组合物及其  
制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种适合于静脉注射的含多烯紫  
杉醇类物质的药物组合物及其制备方法,该药物  
组合物以多烯紫杉醇或它的盐或水合物为活性成  
分,采用环糊精和氨基酸联合作为增溶剂。利用本  
发明药物组合物制成的注射剂具有稳定性良好,  
毒副作用低等优点。

1. 一种含多烯紫杉醇类物质的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物以环糊精和氨基酸作为增溶剂,以重量计,包括:

多烯紫杉醇类物质 1 份  
环糊精 40-200 份  
氨基酸 0.2 ~ 10 份;

所述多烯紫杉醇类物质为多烯紫杉醇或它的盐或水合物;

所述环糊精为羟丙基- $\beta$ -环糊精或乙酰- $\gamma$ -环糊精;

所述氨基酸为甘氨酸、缬氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、酪氨酸或组氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的含多烯紫杉醇类物质的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物为含水的液态药物组合物或其冷冻干燥后的冻干品。

3. 权利要求 1 所述含多烯紫杉醇类物质的药物组合物的制备方法,包括如下步骤:

- (1) 依次将氨基酸和环糊精溶解于水中;
- (2) 加入多烯紫杉醇类物质或溶于乙醇的多烯紫杉醇类物质;
- (3) 超声或搅拌至溶液澄清透明得到液态组合物。

4. 权利要求 1 所述含多烯紫杉醇类物质的药物组合物的制备方法,包括如下步骤:

- (1) 依次将氨基酸和环糊精溶解于水中;
- (2) 加入多烯紫杉醇类物质或溶于乙醇的多烯紫杉醇类物质;
- (3) 超声或搅拌至溶液澄清透明得到液态组合物,
- (4) 将液态组合物进行冷冻干燥得到冻干品。

5. 根据权利要求 3 或 4 所述含多烯紫杉醇类物质的药物组合物的制备方法,其特征在于,以重量计,水的用量为多烯紫杉醇类物质的 50-1000 倍,乙醇的用量为多烯紫杉醇类物质的 1-100 倍。

6. 权利要求 1 所述含多烯紫杉醇类物质的药物组合物在制备静脉注射剂中的用途。

## 一种含多烯紫杉醇类物质的药物组合物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种含多烯紫杉醇类物质的药物组合物,更具体指一种以多烯紫杉醇或它的盐或水合物为活性成分的注射用药物组合物。本发明还涉及该组合物的制备方法。

### 背景技术

[0002] 多烯紫杉醇类物质是已知的一类具有显著抗癌活性的化合物,属于有丝分裂抑制剂,通过促进微管双聚体装配成微管,同时通过防止去多聚化过程而使微管稳定,阻滞细胞于 G2 和 M 期,从而抑制癌细胞的有丝分裂和增殖。这类药物对于晚期乳腺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肝癌、头颈部癌、胃癌等均有效。

[0003] 由于多烯紫杉醇难溶于水,室温下多烯紫杉醇在水中的溶解度仅为  $0.5 \mu\text{g/ml}$ ,因此目前市售的多烯紫杉醇注射剂主要是以高浓度的吐温 80 或聚氧乙烯氢化蓖麻油为增溶剂配制而成的浓溶液,内含乙醇或外加(包装小盒内再附带 1 支)13%的乙醇,注射后对人体有毒副作用。吐温 80 或聚氧乙烯氢化蓖麻油是常用的表面活性剂,但吐温 80 或聚氧乙烯氢化蓖麻油具有很强毒性和高过敏性,吐温 -80 具有溶血性,用于静脉内注射,会引起严重的过敏反应,包括休克、呼吸困难、低血压、血管性水肿、风疹等过敏样反应症状,因此在使用多烯紫杉醇注射液前,必须先服用抗过敏药物或注射抗过敏药物来帮助缓解由于多烯紫杉醇注射液的使用而产生的严重过敏等毒副作用,常常给病人带来痛苦,直接影响了该药的使用。另外,虽然吐温 -80 或聚氧乙烯氢化蓖麻油能增加多烯紫杉醇的溶解度,但在溶液状态的多烯紫杉醇稳定性差,有效期短;在包装小盒内附带 1 支 13%的乙醇,也增加了生产成本。因此,改变多烯紫杉醇的剂型,增加多烯紫杉醇的水溶性,消除由吐温 -80 等溶媒引起的过敏反应和减少多烯紫杉醇自身的毒副作用成为目前研究的热点。

[0004] 许多研究者对减少多烯紫杉醇类物质在临床应用中引起的不良反应及其自身的毒副作用进行了研究,例如中国专利申请 02155476.5 公开了采用透明质酸、葡萄糖或甘露醇、乙醇、丙二醇、非离子表面活性剂制备多烯紫杉醇类物质的注射剂;美国专利 97/196,934 公开了以二甲基乙酰胺、聚乙二醇为溶剂制备多烯紫杉醇类物质的组合物,用于非肠道给药;澳大利亚专利 35544/93 揭示使用不饱和环糊精和酶修饰的支链环糊精能够适度增加多烯紫杉醇类物质的溶解度;中国专利 ZL98811010.5 采用乙酰化环糊精和羟丙基- $\beta$ -环糊精以及其它水溶性辅剂制备多烯紫杉醇类物质的注射用制剂;中国专利申请 03112082.2 在采用环糊精、水溶性辅剂及有机酸和有机酸盐作为辅剂制备多烯紫杉醇类物质的注射用制剂,所得到的注射剂的稳定性有所改善,但 6 小时内多烯紫杉醇类物质的含量下降仍接近 10%,且由于含有加入有机酸和有机酸盐,制剂的 pH 值过低(pH 值为 3~5),静脉注射使用时易产生明显的血管刺激性。利用现有技术得到的多烯紫杉醇类物质的注射剂大都存在着稳定性不够理想的缺陷。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种稳定性良好且毒副作用小,适于静脉注射的含多烯紫杉

醇类物质的药物组合物以克服现有技术所存在的缺陷。

[0006] 本发明的另一个目的在于提供该药物组合物的制备方法。

[0007] 本发明药物组合物的特点在于以环糊精和氨基酸作为增溶剂。通过联合使用氨基酸和环糊精来增加多烯紫杉醇在水中的溶解度,阻止药物析出聚集,增加其物理稳定性和化学稳定性。

[0008] 以重量计,本发明所述的含多烯紫杉醇类物质的药物组合物,包括:

[0009] 多烯紫杉醇类物质 1 份

[0010] 环糊精 40-200 份

[0011] 氨基酸 0.2 ~ 10 份

[0012] 本发明所说的多烯紫杉醇类物质是指化合物多烯紫杉醇或它的盐或水合物。所说的环糊精为羟丙基- $\beta$ -环糊精或乙酰- $\gamma$ -环糊精,所说的氨基酸为甘氨酸、缬氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、精氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、酪氨酸或组氨酸。

[0013] 本发明所述的含多烯紫杉醇类物质的药物组合物指含水的液态药物组合物或其冷冻干燥后的冻干品。本发明药物组合物的制备方法,包括以下步骤:

[0014] (1) 依次将氨基酸和环糊精溶解于水中;

[0015] (2) 加入多烯紫杉醇类物质或溶于乙醇的多烯紫杉醇类物质;

[0016] (3) 超声或搅拌至溶液澄清透明得到液态组合物,或

[0017] (4) 将液态组合物进行冷冻干燥得到冻干品。

[0018] 上述方法中,以重量计,水的用量为多烯紫杉醇类物质的 50-1000 倍,乙醇的用量为多烯紫杉醇类物质的 1-100 倍;制备冻干品时还可以使用支架剂,支架剂可选用甘露醇、乳糖、葡萄糖、蔗糖、右旋糖苷或其混合物;上述方法得到的冻干品为疏松的块状物或粉末,可快速溶于注射用水或含氯化钠、葡萄糖、甘露醇、右旋糖苷等的水溶液中,得到澄清透明的溶液。

[0019] 本发明药物组合物适合于制成静脉注射剂,通过静脉滴注方式给药,其冻干制剂的给药过程能在 2 小时内完成。本发明药物组合物的有效使用剂量为 2mg/kg 体重。

[0020] 有益效果

[0021] 1、本发明药物组合物以氨基酸和环糊精为增溶剂,毒副作用低,给药前不需通过抗过敏药物或其他的治疗药物预先治疗,不仅方便了给药,也增加了病人的顺应性,降低了成本,本发明药物组合物对血管无刺激性,适宜静脉注射给药。

[0022] 2、本发明药物组合物的稳定性良好,液态组合物在 4℃ 下放置 28 小时,其多烯紫杉醇的含量变化小于 2%;冻干品形式的药物组合物的水溶液室温下可以稳定存放至少 24 小时,多烯紫杉醇无聚集析出,其浓度变化小于 2%。

[0023] 3、本发明药物组合物的制备工艺简单、易控,适合工业化大生产。

## 具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明作进一步阐述,但不限制本发明。

[0025] 下述实施例中,采用 HPLC 法测定多烯紫杉醇含量,色谱条件:流动相为乙腈-水(60 : 40, v/v),流速为 1.0ml/min,进样量为 15  $\mu$ l,柱温为 25℃,采用紫外检测器,检测波长为 229nm,色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶柱。

[0026] 下述实施例中,除特别说明,冷冻干燥液态组合物得到冻干品的方法为:分装液态组合物后,未封口放入冻干箱的金属盘内,并将温度降低至 $-30^{\circ}\text{C}$ ,迅速将装有制剂的金属盘放入冻干箱内,维持7小时,然后使箱内的真空度为0.2Pa,再将搁板升温,并控制在共熔点 $-3^{\circ}\text{C}$ 以下,保持12小时,最后升温至 $4^{\circ}\text{C}$ ,并保持8小时,使制剂温度与搁板温度重合,放入无菌的过滤气体,控制制剂的含水量在3%,迅速封口即可得到冻干品。

[0027] 实施例1

[0028] 精密称取40mg多烯紫杉醇溶于1ml乙醇。另精密称取30mg甘氨酸溶于5ml水中,加入3g羟丙基- $\beta$ -环糊精溶解后加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声20min,搅拌得澄清透明溶液,即为液态组合物。

[0029] 实施例2

[0030] 精密称取40mg多烯紫杉醇溶于0.5ml乙醇。精密称取20mg天冬氨酸溶于10ml水中,加入4g羟丙基- $\beta$ -环糊精溶解后缓慢加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声30min,再放置1小时,得到澄清透明溶液,按每瓶定量2ml分装后,冷冻干燥得到冻干品。

[0031] 实施例3

[0032] 精密称取6g羟丙基- $\beta$ -环糊精溶于20ml 0.2%精氨酸水溶液中,置于磁力加热搅拌器上。另精密称取多烯紫杉醇80mg,以1ml乙醇溶解后,缓慢滴加到羟丙基- $\beta$ -环糊精及精甘氨酸的混合溶液中,室温下继续搅拌5h,加入7.5%甘露醇和5%乳糖(重量体积比,水溶液),按每瓶定量5ml分装后,冷冻干燥得到冻干品。

[0033] 实施例4

[0034] 称取多烯紫杉醇40mg,加入0.5ml乙醇溶解;另精密称取2g羟丙基- $\beta$ -环糊精溶于10ml 0.2%的组氨酸水溶液中,置 $20^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中,搅拌下注入多烯紫杉醇乙醇溶液,继续搅拌2h, $-30^{\circ}\text{C}$ 下预冻,置真空冷冻干燥器中干燥24h,得白色固体粉末状的冻干品。

[0035] 实施例5

[0036] 称取20g羟丙基- $\beta$ -环糊精溶于50ml 0.2%的谷氨酸水溶液中,另精密称取200mg多烯紫杉醇溶于5ml乙醇中,缓慢注入到上述环糊精及谷氨酸的混合溶液中,超声处理30min,再放置1小时,得到液态组合物,按每瓶定量1ml分装后,冷冻干燥得到冻干品。

[0037] 实施例6

[0038] 精密称取400mg硫酸多烯紫杉醇溶于10ml乙醇。另精密称取300mg缬氨酸溶于5ml水中,加入30g乙酰- $\gamma$ -环糊精溶解后加入硫酸多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声20min,搅拌得澄清透明溶液,即为液态组合物。

[0039] 实施例7

[0040] 精密称取200mg的三水多烯紫杉醇溶于5ml乙醇。另精密称取300mg赖氨酸溶于5ml水中,加入30g乙酰- $\gamma$ -环糊精溶解后加入三水多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声20min,搅拌得澄清透明溶液,即为液态组合物。

[0041] 实施例8

[0042] 精密称取200mg的多烯紫杉醇溶于5ml乙醇。另精密称取300mg酪氨酸溶于5ml水中,加入30g乙酰- $\gamma$ -环糊精溶解后加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声20min,搅拌得澄清透明溶液,即为液态组合物。

[0043] 实施例9

[0044] 精密称取 200mg 的多烯紫杉醇溶于 5ml 乙醇。另精密称取 300mg 酪氨酸溶于 5ml 水中,加入 30g 乙酰- $\gamma$ -环糊精溶解后加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声 20min,搅拌得澄清透明溶液,得到液态组合物,再加入 5%甘露醇(重量体积比,水溶液),按每瓶定量 1ml 分装后,冷冻干燥得到冻干品。

[0045] 实施例 10

[0046] 精密称取 300mg 的多烯紫杉醇溶于 5ml 乙醇。另精密称取 200mg 甘氨酸溶于 5ml 水中,加入 30g 乙酰- $\gamma$ -环糊精溶解后加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声 20min,搅拌得澄清透明溶液,即为液态组合物。再加入 5%甘露醇(重量体积比,水溶液),按每瓶定量 1ml 分装后,冷冻干燥得到冻干品。

[0047] 实施例 11 液态组合物的饱和溶解度的测定

[0048] 称取 3g 羟丙基- $\beta$ -环糊精溶于 10ml 0.2%的甘氨酸水溶液中,另精密称取 40mg 多烯紫杉醇溶于 0.5ml 乙醇中,缓慢注入到上述环糊精及甘氨酸的混合溶液中,超声处理 30min,再放置 1 小时,得到液态组合物,进行饱和溶解度的测定:取上述液态组合物和多烯紫杉醇原料各 1mL,分别置 30℃下,40r/min 振荡 48h,冷冻干燥,加水 1mL,涡旋 30s,3000r/min 离心,用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤后,用流动相适当稀释后进行液相分析,进样量为 20  $\mu$ L,流动相为乙腈:水(60:40),流速为 1mL/min,测定峰面积,计算多烯紫杉醇在水中的饱和浓度。结果见表 1。

[0049] 表 1

	样品	溶解度 (mg/ml)
[0050]	本发明组合物	4
	多烯紫杉醇原料	0.0005

[0051] 由表 1 可知,本发明组合物与多烯紫杉醇原料相比,多烯紫杉醇在水中的溶解度增加了 8000 倍,将原本难溶性的多烯紫杉醇变得易溶。实验表明,本发明中羟丙基- $\beta$ -环糊精和甘氨酸的联合使用可显著提高多烯紫杉醇的溶解度,解决了制备多烯紫杉醇注射剂中的难题。

[0052] 实施例 12 液态组合物的稳定性试验

[0053] 精密称取 400mg 多烯紫杉醇溶于 1ml 乙醇。另精密称取 200mg 甘氨酸溶于 40ml 水中,加入 20g 羟丙基- $\beta$ -环糊精溶解后加入多烯紫杉醇的乙醇溶液,超声 30min,搅拌得澄清透明溶液,即为本发明液态组合物。

[0054] 上述所制得的液态组合物加至适量蒸馏水中稀释,配制成多烯紫杉醇含量为 1mg/ml 的澄清溶液。将该溶液在 4℃、25℃和 35℃放置,分别于 8、12、16、20、24 和 28h 取样,HPLC 法测定多烯紫杉醇含量,结果见表 2。

[0055] 表 2

[0056]

多烯紫杉醇终浓度 (mg/ml)	0h	8h	12h	16h	20h	24h	28h
4℃	1.21	1.21	1.21	1.21	1.20	1.20	1.19
25℃	1.21	1.21	1.21	1.20	1.20	1.19	1.17
35℃	1.21	1.21	1.21	1.20	1.19	1.19	1.16

[0057] 结果表明,本发明液态组合物在 4℃ 放置 28h, 含量变化 < 2%; 在室温条件下存放 24h, 含量变化 < 2%; 在 35℃ 放置 24h, 浓度下降低于 2%, 在环境温度不高于 35℃ 的情况下, 该液态组合物能保持 24h 以上的稳定性, 表明本发明液态组合物的稳定性良好。

[0058] 实施例 13 冻干品态组合物的稳定性试验

[0059] 精密称取 300mg 甘氨酸溶于 4ml 水中, 加入 30g 羟丙基-β-环糊精溶解后加入 400mg 多烯紫杉醇, 25℃ 搅拌 5h, 得到澄清透明溶液, 再加入 10% 甘露醇 (重量体积比, 水溶液), 按每瓶定量 0.5ml 分装后, 冷冻干燥即得冻干品。从外观上看, 冻干品为类白色冻干块状物或粉末。

[0060] 取上述制得的冻干品适量, 密封, 于 25℃ 放置 6 个月进行加速试验, 于 0、1、2、3、6 月重新对外观、有关物质、含量等指标进行测定, 评价冻干品的稳定性。结果见表 3。

[0061] 表中, 有关物质按 HPLC 法测定, 含量为相当于标示量。

[0062] 表 3

[0063]

批号	测定项目	0 个月	1 个月	2 个月	3 个月	6 个月
	外观色泽	类白色	无明显变化	无明显变化	无明显变化	无明显变化
050401	有关物质 (%)	1.10	1.16	1.22	1.43	1.81
	含量 (%)	99.89	99.81	99.47	99.36	99.14
	外观色泽	类白色	无明显变化	无明显变化	无明显变化	无明显变化
050402	有关物质 (%)	1.12	1.18	1.24	1.42	1.89
	含量 (%)	100.02	99.89	99.29	98.87	97.78
	外观色泽	类白色	无明显变化	无明显变化	无明显变化	无明显变化
050403	有关物质 (%)	1.11	1.24	1.27	1.51	1.92
	含量 (%)	99.76	99.06	98.67	98.13	97.03

[0064] 结果表明, 多烯紫杉醇组合物冻干品在 25℃ 放置 6 个月, 其外观、有关药物及含量无明显变化, 表明, 多烯紫杉醇组合物冻干品稳定性良好。

[0065] 实施例 14 冻干品态组合物的稳定性试验

[0066] 供试品: 按实施例 5 方法制备的冻干品态组合物

[0067] 对照品: 按中国专利 98811010.5 方法制备的液态多烯紫杉醇组合物, 加入 5% 甘露醇 (重量体积比, 水溶液), 按每瓶定量 1ml 分装后冷冻干燥得到冻干品。其液态组合物

的制备方法为：称取 20g 羟丙基-β-环糊精溶于 20ml 水中，加入 400mg 多烯紫杉醇，25℃ 搅拌 3h，得到澄清透明溶液，得到液态组合物。

[0068] 多烯紫杉醇注射液（注射用多西他赛，20mg/支，购自上海市医药公司）

[0069] 取供试品、对照品及注射用多西他赛各 3 支，分别溶于 5ml 水中，然后分别用 0.9% w/v 的氯化钠水溶液稀释至 1mg/ml；另取供试品、对照品及注射用多西他赛各 3 支，分别溶于 5ml 水后分别用 5% w/v 的葡萄糖水溶液稀释至 1mg/ml，分别在放置第 0、2、4、8、12、24 小时检查供试品、对照品及注射用多西他赛的澄清度。结果见表 4。

[0070] 表 4

[0071]

放置时间 (h)		0	2	4	8	12	24
供试品	0.9%氯化钠稀释液	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
	5%葡萄糖稀释液	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清	澄清
对照品	0.9%氯化钠稀释液	澄清	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出
	5%葡萄糖稀释液	澄清	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出
多西他赛 注射剂	0.9%氯化钠稀释液	澄清	澄清	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出
	5%葡萄糖稀释液	澄清	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出	少量析出

[0072] 从表 4 可以看出，本发明冻干品态组合物经氯化钠水溶液和葡萄糖水溶液稀释 24 小时后未见药物析出，而对照品用 0.9%氯化钠水溶液稀释后 2 小时开始有少量药物析出，市售多烯紫杉醇注射液用氯化钠水溶液稀释 4 小时，用葡萄糖水溶液稀释 2 小时也开始有少量药物析出。表明本发明冻干品态组合物稀释液具有良好的物理稳定性，足以满足静脉治疗的需要。

[0073] 实施例 15 冻干品态组合物的稳定性试验

[0074] 称取 20g 羟丙基-β-环糊精溶于 50ml 0.3%的组氨酸水溶液中，另称取 200mg 多烯紫杉醇溶于 1.5ml 乙醇中，缓慢注入到上述环糊精及组氨酸的混合溶液中，超声处理 30min，再放置 1 小时，得到多烯紫杉醇组合物溶液，按每瓶定量 5ml（含多烯紫杉醇 20mg）分装后冷冻干燥即可得到冻干品。

[0075] 将上述制得的冻干品各 3 支分别溶于 20ml 0.9% w/v 的氯化钠或 5% w/v 葡萄糖水溶液中，分别制备多烯紫杉醇浓度约为 1mg/ml 的澄清溶液。将配制好的含本发明组合物的氯化钠水溶液及葡萄糖水溶液盛放在密封的玻璃容器中，于 35℃ 放置 6 小时，分别在第 0、2、4、8、12、24 小时取样通过 HPLC 分析样品中多烯紫杉醇的浓度，分析结果见表 5。

[0076] 表 5

[0077]

时间 (h)	0	2	4	8	12	24
氯化钠水溶液中多烯紫杉醇浓度 (mg/ml)	1.01	1.01	1.01	1.00	1.00	0.99
葡萄糖水溶液多烯紫杉醇浓度 (mg/ml)	1.01	1.01	1.01	1.01	0.99	0.99

[0078] 实验结果表明,本发明组合物在 35℃ 下放置 24 小时,多烯紫杉醇浓度几乎不变 (< 2%),即多烯紫杉醇组合物稳定性良好。

[0079] 实施例 16 冻干品态组合物的稳定性试验

[0080] 称取 40g 羟丙基-β-环糊精溶于 10ml 0.3% 的鸟氨酸水溶液中,另称取 400mg 多烯紫杉醇溶于 1.5ml 乙醇中,缓慢注入到上述环糊精及鸟氨酸的混合溶液中,超声处理 30min,再放置 1 小时,得到多烯紫杉醇组合物溶液,按每瓶定量 5ml (含多烯紫杉醇 20mg) 分装后冷冻干燥即可得到冻干品。

[0081] 对照品:按中国专利 98811010.5 方法制备的液态多烯紫杉醇组合物,加入 5% 甘露醇 (重量体积比,水溶液),按每瓶定量 1ml 分装后,冷冻干燥得到冻干品。其液态组合物的制备方法同实施例 14。

[0082] 分别将上述制得的冻干品和对照品加入适量生理盐水或 5% w/v 葡萄糖水溶液中,制备多烯紫杉醇浓度约为 1mg/ml 的澄清溶液,将配制好的含本发明组合物或对照品的生理盐水及葡萄糖水溶液在室温下存放,每隔 12 小时用 HPLC 测定各溶液中多烯紫杉醇的浓度,分析结果见表 6。

[0083] 表 6

[0084]

存放时间 (h)	本发明冻干态组合物稀释液中多烯紫杉醇浓度 (mg/ml)		对照品稀释液中多烯紫杉醇浓度 (mg/ml)	
	生理盐水溶液	葡萄糖溶液	生理盐水溶液	葡萄糖溶液
0	1.01	1.01	1.00	1.01
12	1.01	1.01	0.95	0.96
24	1.01	1.00	0.90	0.91

[0085] 实验结果表明,在室温下放置 24 小时,含中国专利 98811010.5 方法制备的组合物的生理盐水及 5% 葡萄糖稀释液中的多烯紫杉醇浓度均下降了 10%,而含本发明组合物的样品稀释液中多烯紫杉醇浓度几乎没有变化。说明本发明组合物的稳定性优于现有技术报道的组合物。

[0086] 实施例 17 冻干品态组合物的抑瘤试验

[0087] 试验药物:按实施例 13 方法制备的冻干品态组合物,试验时用适量生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 8mg/ml。

[0088] 阳性对照品:多烯紫杉醇注射剂 (注射用多西他赛,20mg/支,购自上海市医药公

司)

[0089] 阴性对照品:灭菌生理盐水

[0090] 配制小鼠乳腺癌细胞 EMT-6 悬液,使每毫升悬液含  $5 \times 10^7$  个癌细胞。取 BALB/C 小鼠,每组 6 只,每鼠皮下接种 0.2ml,接种肿瘤后 24 小时后按表 7 所示剂量进行给药,每天一次,连续 5 天。其中试验组皮下或腹腔给予试验药物,阳性对照组皮下或腹腔给予多烯紫杉醇注射剂,阴性对照组皮下或腹腔给予等体积的灭菌生理盐水,各组动物于接种肿瘤后第 12 天处死,取肿瘤称重后计算多烯紫杉醇组合物及多烯紫杉醇注射剂对肿瘤的抑制率,抑制率% = [(对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 对照组平均瘤重]  $\times$  100%。结果如表 7 所示:

[0091] 表 7

[0092]

制剂	剂量 (mg/kg 体重)		肿瘤重量(g)		抑制率 (%)		P	
	sc	ip	sc	ip	sc	ip	sc	ip
生理盐水	—	—	1.32 $\pm$ 0.41	1.58 $\pm$ 0.51	—	—	—	—
多烯紫杉醇 注射剂	20	10	0.63 $\pm$ 0.20	0.91 $\pm$ 0.23	52.3	42.4	<0.01	<0.05
本发明 组合物	20	15	0.62 $\pm$ 0.15	0.88 $\pm$ 0.25	53.0	44.3	<0.01	<0.05
	10	10	0.73 $\pm$ 0.19	0.92 $\pm$ 0.21	44.7	41.8	<0.01	<0.05

[0093] 试验结果表明,皮下给予本发明组合物的抑瘤率为 44.7 ~ 53.0%,腹腔给药后的抑瘤率为 41.8 ~ 44.3%,相同给药方式下给予相同剂量的本发明组合物与多烯紫杉醇注射剂的抑瘤率相当,表明本发明组合物具有较好的抗肿瘤效果。

[0094] 实施例 18 冻干品态组合物的抑瘤试验

[0095] 试验药物:按实施例 13 方法制备的冻干品态组合物,试验时用适量生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 8mg/ml;

[0096] 阳性对照品:泰索帝浓缩注射液,试验时用生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 8mg/ml;

[0097] 阴性对照品:生理盐水

[0098] Lewis 肺癌接种于 30 只 BDF1 小鼠,接种肿瘤后按表 8 所示剂量分别在第 1、3、5、7 日间隔各腹腔注射给药一次,其中试验组注射多烯紫杉醇组合物冻干品,阳性对照组注射泰索帝注射液,阴性对照组腹腔注射等体积的生理盐水,各组动物于接种肿瘤后第 12 天处死解剖,取肿瘤称重后计算试验药物对肿瘤的抑制率。结果如表 8 所示:

[0099] 表 8

[0100]

制剂	剂量 (mg/kg)	动物数 开始/结束	平均体重 (g)	平均瘤重(g)	肿瘤抑制率
泰索帝注射液	6	14/14	18.0/24.6	0.26±0.11	90.8
本发明组合物	6	14/14	18.0/24.8	0.28±0.22	90.1
生理盐水	对照	14/14	18.0/16.4	2.82±0.10	0

[0101] 体内抑瘤结果表明本发明多烯紫杉醇药物组合物与泰索帝注射液相比,具有相当的抑瘤活性。

[0102] 实施例 19 冻干品态组合物的刺激性试验

[0103] 试验药物:按实施例 13 方法制备的冻干品态组合物,试验时用适量生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 1mg/ml;

[0104] 对照品 1:按中国专利申请 CN1535678A 方法制备的液态多烯紫杉醇组合物,加入 5%甘露醇(重量体积比,水溶液),按每瓶定量 1ml 分装后冷冻干燥得到冻干品。其液态组合物的制备方法为:称取 20g 羟丙基-β-环糊精溶于 20ml 水中,加入 400mg 多烯紫杉醇,25℃搅拌 3h,得到澄清透明溶液,再加入枸缘酸调 pH 值至 3.5,混匀后得到液态组合物。

[0105] 对照品 2:多烯紫杉醇注射剂(注射用多西他赛,20mg/支,购自上海市医药公司)

[0106] 取家兔 15 只,分成三个试验组,在各试验组家兔的耳缘静脉或股四头肌分别注射(2mg/kg)试验药物、对照品 1 和对照品 2,放血处死后,观察注射部位的反应情况。配制 2%的兔红细胞悬液,加入试验药物,观察其对红细胞的影响。结果见表 9。

[0107] 表 9

[0108]

试验组别	血管刺激性反应	肌肉刺激性反应
试验药物试验组	-	-
对照品 1 试验组	+	+
对照品 2 试验组	++	++

[0109] 注:表中“-”表示未发现血管刺激性反应;“+”表示有血管刺激性反应。

[0110] 试验结果表明,经对照品 1 和对照品 2 注射后的家兔均出现不同程度的刺激性反应,如红肿、充血、炎性浸润等。而对家兔静脉或肌肉注射本发明药物组合物后,肉眼观察均未见红肿、充血等刺激反应,经病理学检查,未出现纤维素样坏死、炎性浸润等症状,且本发明组合物在观察时间内无溶血凝聚现象,说明本发明组合物适宜静脉注射给药。

[0111] 实施例 20 冻干品态组合物的毒性试验

[0112] 试验药物:按实施例 13 方法制备的多烯紫杉醇药物组合物冻干品,试验时用适量生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 8mg/ml;

[0113] 对照品:泰索帝浓缩注射液,试验时用生理盐水稀释至多烯紫杉醇浓度为 8mg/ml;

[0114] 取体重 18~22g 性别一致的昆明小鼠 60 只,随机分成 6 组,每组 10 只,各取 3 组分别归入试验组和对照组,试验组一次静脉注射本发明组合物冻干品,对照组一次静脉注

射泰索帝注射液。组间剂量按等比级数排列,比值 1 : 0.8 观察并记录给药 10 天内各组动物的反应和死亡率,用简化机率单位法计算 LD,其 95%的可信限为:

[0115] 泰索帝注射液  $LD_{50} = 107\text{mg} \pm 32\text{mg}/\text{kg}$ ,

[0116] 本发明多烯紫杉醇组合物冻干粉  $LD_{50} = 219\text{mg} \pm 30\text{mg}/\text{kg}$ 。

[0117]  $LD_{50}$  的实验结果表明,本发明组合物冻干品与泰索帝注射液相比,毒性明显降低。

[0118] 实施例 21 冻干品态组合物的过敏性试验

[0119] 试验药物与对照品同实施例 20。

[0120] 给药方法:取豚鼠 12 只,随机分为 2 组,每组 6 只,雌雄各半。对于试验组和对照组,以 10mg/kg 体重的剂量,分别肌肉注射试验药物与对照品 0.2 ~ 0.3mL,隔天注射,连续 3 次,观察豚鼠行为及出现的不良反应。首次注射后第 7 天,试验组和对照组中各取 3 只豚鼠,分别腹腔注射 2 ~ 3mL 试验药物与对照品,进行攻击,观察注射后豚鼠有无出现过敏症状。剩余的另一半豚鼠于首次注射后 14 天腹腔注射相同剂量的试验药物或对照品,并进行过敏症状观察。

[0121] 判断指标:根据两组豚鼠反应的过敏症状不同,分为 1 ~ 4 级。0 级:无明显反应;一级:有轻微抓鼻、竖毛;二级:有明显的抓鼻、竖毛、颤抖或喷嚏;三级:多次连续喷嚏、伴有呼吸困难或痉挛、抽搐;四级:痉挛、抽搐、大小便失禁、休克、死亡。

[0122] 过敏反应症状观察结果:对照组豚鼠出现明显的过敏反应,在第 1 次给药后即出现抓鼻和大小便失禁现象;第 2 次给药后出现严重大小便失禁、竖毛和抽搐现象,每只豚鼠均有不同程度的脱肛现象。试验组豚鼠在第 3 次给药后仅个别出现大小便失禁、精神萎靡不振、活动量减小现象。对照组第一次注射后死亡 3 只,第 14 天腹腔攻击后有 2 只豚鼠死亡,具有明显的过敏反应和毒性症状。试验组在肌肉注射时未出现过敏反应,即使大剂量腹腔注射后也未发现有过敏症状。结果表明,本发明多烯紫杉醇药物组合物所引起的过敏反应程度和死亡率明显低于泰索帝注射液。