[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610041530.6

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100486645C

[22] 申请日 2006.9.12
[21] 申请号 200610041530.6
[73] 专利权人 南京师范大学
地址 210097 江苏省南京市宁海路 122 号
共同专利权人 南京巨环医药科技开发有限公司
[72] 发明人 任 勇 高剑锋 余书勤 吴 玲
[56] 参考文献
CN1800221A 2006.7.12
CN1502332A 2004.6.9
CN1379047A 2002.11.13
审查员 卞志家

[74] 专利代理机构 南京知识律师事务所
代理人 栗仲平

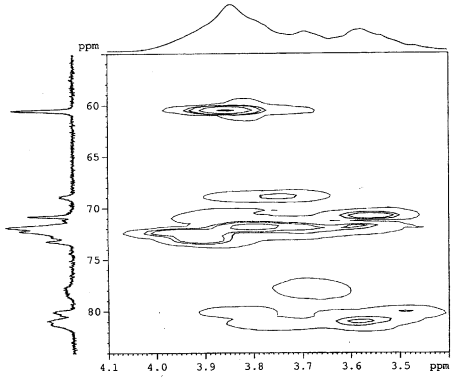
权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 3 页

[54] 发明名称

含有环糊精紫杉醇包合物的药物组合物及其制备方法

[57] 摘要

含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，由紫杉醇、环糊精与药用辅料组成，其中紫杉醇与环糊精的质量比为 1∶10～150，所述的环糊精是：羟丙基－磺丁基－β－环糊精，或磺丁基－β－环糊精，或磺丁基－β－环糊精与羟丙基－磺丁基－β－环糊精任意比例的混合物；环糊精包合紫杉醇的稳定常数 Ka = 5396M^{-1} ～ 14121M^{-1}。其制备方法：在环糊精溶液中滴加紫杉醇的乙醇溶液，体系溶解后以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，滤液减压除乙醇，减压除水，干燥，得到固体包合物，或减压除乙醇后得到液体包合物，其中乙醇含量小于 2%。本发明显著提高了紫杉醇溶解度和稳定度，且毒副作用小，药物活性与用药安全性好。



1、一种含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，由紫杉醇、环糊精与药用辅料组成，其中紫杉醇与环糊精的质量比为 1 ： 10～150，所述的环糊精是：羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精任意比例的混合物；环糊精包合紫杉醇的稳定常数 $Ka = 5396M^{-1} \sim 14121M^{-1}$ ；所述的包合物中乙醇含量小于 2% ；

所述的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，是指用以下制备方法得到的组合物：在羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物的纯水溶液中，搅拌下滴加紫杉醇的乙醇溶液，体系溶解后以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，滤液减压除乙醇，然后再减压除水，干燥，得到的固体包合物，或减压除乙醇后得到的液体包合物。

2、一种权利要求 1 所述的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物的制备方法，步骤如下，在羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物的纯水溶液中，搅拌下滴加紫杉醇的乙醇溶液；

体系溶解后以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，滤液减压除乙醇，得到液体包合物，或减压除乙醇后再减压除水，干燥，得到的固体包合物；所得的包合物中乙醇含量不高于 2%。

3、按照权利要求 2 所述的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物的制备方法，其特征在于，具体步骤是：

用 1 ：25 质量比的紫杉醇 ：环糊精配制环糊精的纯水溶液，该溶液是指：羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物与 2～10 倍质量的纯水混合制成的溶液，搅拌下缓慢加入比例紫杉醇与可溶解紫杉醇的适量乙醇配制的溶液，加入紫杉醇时在室温或在 25～65℃间加热搅拌，搅拌加热生成包合物后，以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，然后减压尽量除去乙醇，得到液体包合物，或再继续减压除水至尽，减压真空干燥后得固体包合物。

含有环糊精紫杉醇包合物的药物组合物及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种药物组合物，具体涉及一种含有紫杉醇、羟丙基-磺丁基-β-环糊精或磺丁基-β-环糊精的包合物及其与常用药用辅料的药物组合物，以及该组合物的制备方法。

背景技术

紫杉醇(Paclitaxel，商品名 Taxol) 是由植物短叶紫杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮分离提取的二萜类化合物，分子式 $C_{47}H_{51}NO_{24}$，分子量 853. 92，化学名：(2S,5R,7S,10R,13S)-10,20-双(乙酰氧基)-2-苯甲酰氧基-1,7-二羟基-9-氧代-5,20-环氧紫杉烷-11-烯-13-基(3S)-3-苯甲酰氨基-3-苯基-D-乳酸酯。紫杉醇为白色或类白色结晶粉末，在 pH 4～8 条件下化学性质相对稳定，本品脂溶性高（$logP_{O/W}=3.5$）几乎不溶于水，不同文献报道的水中溶解度在 0.25 μg/ml～0.60μg /ml 范围，也难溶于多种常用药用溶媒。大量药理药效实验证明，紫杉醇对晚期卵巢癌、转移性乳腺癌、黑色素瘤都有显著疗效，对难治性卵巢癌和转移性乳腺癌的治愈率高，对治疗前列腺癌、胃肠癌、小细胞性和非小细胞性肺癌前景良好，是目前发现的最具抗癌效果的天然抗癌药物之一。

由于口服难以吸收（口服吸收率2%～4%），紫杉醇的临床应用为注射给药，现有的紫杉醇注射液由1:1（V/V）的聚氧乙烯蓖麻油 /无水乙醇配制成无色粘稠状浓溶液（5ml 溶液含紫杉醇30 mg）。使用时先将本品浓溶液稀

释于500 mL的 0.9 %氯化钠注射液或5 %葡萄糖注射液或5 %右旋糖酐注射液中，稀释成紫杉醇含量约0.06 mg/ml 溶液后（溶媒含量0.5 %～1.0% ），用一次性非聚氯乙烯材料的输液瓶和输液管，并通过 0.22 μm孔径过滤器过滤后，静脉滴注3～24 h，输注剂量为 135～175 mg/m^{-2}，最大耐受剂量为3 h 内输注225～240 mg/m^{-2}。

紫杉醇注射剂采用聚氧乙烯蓖麻油 /无水乙醇作溶媒，临床过敏反应发生率高，使用时需要作防过敏反应处理，分别于给药前12 h、6 h 口服地塞米松10 mg，用药前30～60 min 肌注给予20 mg苯海拉明，静脉注射西咪替丁300 mg 或雷尼替丁50 mg 加以预防，对已发生过敏反应的病人给予注射肾上腺素对症治疗。另外，紫杉醇注射液不能用聚氯乙烯塑料容器或注射容器配制、盛装和注射，以避免溶媒与容器反应生成其他致敏物。稀释液放置在玻璃或聚丙烯塑料容器中保存，也可用专门配备的聚乙酯类注射装置。虽然注射紫杉醇致敏的机制至今仍不完全清楚，但是由于已知另外还有2个使用该种溶媒的药物（环孢菌素和鬼臼噻吩甙）也发生相同的过敏反应，并且试验也证实蓖麻油本身就能引起狗组织胺释放和低血压（Clinical Oncology，1994; 6 :40），因此，溶媒蓖麻油的致敏性亦引起人们关注。近年来，研究高效低毒性的不含有蓖麻油成分的药物载体和紫杉醇新型给药技术成为研究的热点。

目前有关紫杉醇给药技术的研究主要集中于脂质体、组合溶剂、环糊精、乳剂、纳米粒、螯合、微球等技术，环糊精由于具有特殊的分子包合功能加上近年注射用环糊精衍生物的临床应用，使得环糊精-紫杉醇包合技术研究有了较快的发展。目前已经报道用于紫杉醇制剂改进的环糊精品种主要有：

乙酰-γ-环糊精、羟丙基-β-环糊精、羟丙基-γ-环糊精、桥联双环糊精、α-环糊精、甲基-β-环糊精、γ-环糊精、琥珀酰-甲基-β-环糊精、阴离子-β-环糊精聚合物等，其中α-环糊精和羟丙基-β-环糊精是已经临床用于多种药物注射剂型的环糊精类材料，而上述其他环糊精目前还没有临床注射应用的报道。

由于环糊精的结构性能特殊性及紫杉醇应用的特殊要求，其有价值的环糊精-紫杉醇体系应主要体现于：包合作用强度、增溶幅度、药剂学稳定性、化学稳定性、包合后紫杉醇活性及副作用改变等方面的研究。尽管紫杉醇具有较大的分子体积，但是研究发现环糊精仍然可以与紫杉醇发生不同程度的包合作用，其包合作用强度与具体作用条件如溶剂、温度、物料种类尤其是环糊精结构类型、物料比例等直接相关，因此，不同的研究方法会得出不同的结论。采用薄层色谱方法测定 23种抗肿瘤药物加入羟丙基-β-环糊精（包合药物）前后薄层比移值（R_f）的变化（International Journal of Pharmaceutics, 1994,108:69-75），由此计算迁移保留值R_m:

$$R_m = \log (1/R_f - 1)$$

其中， R_m 为药物、流动相及环糊精浓度的函数，将其关系曲线外推至零点（无流动相和环糊精），得包合物的绝对迁移保留值 R_{mo} （流动相甲醇浓度= 0、环糊精浓度= 0时，$R_m = R_{mo}$，R_{mo} 越小包合物迁移性质变化越大，包合作用越强），结果表明，23种药物中紫杉醇包合作用最弱（R_{mo} 最大），进一步采用分子空腔较小的 α-环糊精实验，得相同的结论，紫杉醇也显示出最弱的包合能力（Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1995,13:533-541）；而采用紫外光谱研究（Chem. Res. Chinese U. 2005,21: 749-752）却发现水溶液中羟丙基-β-环糊精/紫杉醇显示出较强的包合作用，

包合常数达 3030M^{-1}，其作用以二元包合为主；相溶解度研究显示（International Journal of Pharmaceutics, 1996, 133 : 191-201），水溶液中紫杉醇与环糊精存在以二元包合为主的多级包合，其 γ-环糊精、羟丙基-γ-环糊精和羟丙基-β-环糊精的二级包合常数分别为 785 M^{-1}、1886 M^{-1} 和 7965 M^{-1}，显示羟丙基-β-环糊精/紫杉醇具有强的包合能力，同时还发现，加入醇类有机溶剂各级包合常数都有大幅提高，也能够显著提高紫杉醇溶解度。纯水中环糊精对紫杉醇增溶也有较好效果，约50% 浓度羟丙基-β-环糊精水溶液中紫杉醇可达 3.4mg/ml 溶解度（J Pharm Sci, 1995, 84 : 1223-1229），是目前报道的最好结果。采用四乙烯五胺桥联双环糊精则可增溶紫杉醇到2.0mg/ml（CN1440748），环糊精增溶除与环糊精种类有关外，也与紫杉醇-环糊精比例相关。紫杉醇包合后稳定性得到提高、活性也有不同程度改善，荧光光谱研究显示，环糊精间距 16.1 Å 的桥联双环糊精相对于β-环糊精与紫杉醇具有高达 10^7 M^{-1}的包合常数，制备的1:1分子比包合物稳定性强，紫杉醇成分无变化，包合后能显著延长药物-肿瘤细胞作用时程（Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2001，39: 13–18）；研究表明由于紫杉醇溶解度的提高能够增加细胞外紫杉醇浓度，有利于药物透过细胞膜，环糊精的增溶作用对紫杉醇具有保持或增强活性效果（Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,2002,12:1637–1641）；紫杉醇加入环糊精后，可制备含有少量有机溶剂或添加剂的稳定制剂溶液（HU P9701945；CN1281373/ZL98811010.5），1:50环糊精比例的溶液紫杉醇溶解度达到1.5mg/ml，采用乙酰-β-环糊精或羟丙基-β-环糊精制备的包合制剂可显著降低现有紫杉醇制剂（聚氧乙烯蓖麻油 /无水乙醇溶媒）的心血管和呼吸系统毒

副作用。研究还发现，包合作用也可有效降低紫杉醇药物自身的副作用，（USP 6218374; USP 5804568）动物实验显示，使用羟丙基-β-环糊精制备的紫杉醇包合物注射剂相对乙醇溶解的紫杉醇制剂对注射部位的组织损伤降低了2/3。

采用环糊精进行紫杉醇注射剂的改进研究已有多项技术发明，CN1589157（US2005009783）公开了紫杉醇/羟丙基-β-环糊精组合物及其制备方法，该发明采用45g 羟丙基-β-环糊精、30mg紫杉醇、100ml水的比例，将紫杉醇溶解在乙醇中，然后加入到羟丙基-β-环糊精的水溶液中制备包合物，但是，高达1: 1500 的紫杉醇/环糊精质量比使该技术难以用于临床; HU P9701945 使用较低比例的环糊精，但是报道的增溶效果不显著; USP 6284746 公开的实施例以紫杉醇 11.6 mg 与 2,6-二甲基-β-环糊精 4g 制备的包合物，紫杉醇增溶达到 0.9-1.0mg/ml ; USP5684169 使用高比例的多种环糊精加入大量不适合药物用途的如甲醇、乙腈、乙酸乙酯等有机溶剂。HU71251 以多种环糊精1-20倍摩尔比仅使紫杉醇增溶至0.05mg/ml; HU65835 采用20倍摩尔比（约31倍质量比）的支链环糊精获得紫杉醇增溶到约0.32mg/ml 的效果。

尽管环糊精包合紫杉醇的研究十分活跃，但是现在还没有环糊精包合的紫杉醇制剂上市使用，其中环糊精的安全性问题是主要原因之一，目前已被证明能够注射用的环糊精及环糊精衍生物仅有 α-环糊精、羟丙基-β-环糊精和磺丁基-β-环糊精 3 种（Expert Opin Drug Deliv, 2005 Mar;2(2): 335 - 51），紫杉醇剂型改进研究中，羟丙基-β-环糊精研究较多，而磺丁基-β-环糊精还没有研究报道，其他环糊精由于还没有充分的安全性证据，所以技术实

际应用难度较大。目前已有技术的主要缺陷是：制剂中紫杉醇溶解度低（环糊精增溶效果不显著）、药剂学稳定性较差稀释后即析出沉淀、紫杉醇/环糊精比例过高、残留高比例的有机溶剂、使用环糊精浓度过大不能达到紫杉醇制剂的基本要求等。选用性能优良的环糊精新品种并且开展包合技术的系统研究是改变这种现状的希望所在。

发明内容

本发明的目的是：克服现有技术中环糊精包合紫杉醇研究的种种困难，包括：制剂中紫杉醇溶解度低；药剂学稳定性较差；紫杉醇/环糊精比例过高；残留高比例的有机溶剂等，实现该领域内的技术突破，提供一种紫杉醇溶解度和药剂学稳定性都较高、环糊精比例较低、有机溶剂残留低的环糊精紫杉醇稳定包合物，以实现临床使用。本发明还将提供这种包合物的制备方法。

完成本发明的技术方案是：含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，由紫杉醇、环糊精与药用辅料组成，其中紫杉醇与环糊精的质量比为 1 ：10～150，所述的环糊精是：羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精任意比例的混合物；环糊精包合紫杉醇的稳定常数 $Ka = 5396M^{-1} \sim 14121M^{-1}$ 。

对该包合态药物组合物的进一步限定，所述的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，是指用以下制备方法得到的组合物：

在羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物的纯水溶液中，搅拌下滴加紫杉醇的乙醇溶液（或先将环糊精、紫杉醇与纯水混合，搅拌下缓慢滴加乙醇至体系完全溶解，是效果完全相同的等同步骤）；

体系溶解后以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤；

滤液减压除乙醇，得到的液体包合物；

或减压除乙醇后再减压除水，干燥，得到的固体包合物。

通过以上方法制备得到的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物，其残留的乙醇含量小于 2%。

本发明采用磺丁基-β-环糊精或羟丙基-磺丁基-β-环糊精在水溶液条件下与加有适量乙醇的紫杉醇原料溶液混合，加入的乙醇可促进包合作用，生成包合物后除去乙醇（乙醇残留量小于 2%），制得稳定的紫杉醇/环糊精包合物，其包合物与常用药用辅料复合，制备成为可临床使用的包合态药物组合物，从而提高紫杉醇的溶解度、增加稳定性、降低副作用，获得具有临床应用价值的紫杉醇产品。制备包合物是本发明的技术关键。

目前已经上市且可用于注射用途的环糊精衍生物中，羟丙基-β-环糊精是非离子化的中性衍生物，磺丁基-β-环糊精是离子化的衍生物，其中药用的磺丁基-β-环糊精是 6~7 取代的产物（SBE_7-β-CD，商品名 Captisol）。大量研究表明（《药学前沿》，中国医药科技出版社，2001：46-59），磺丁基-β-环糊精在安全性，稳定化，药物增溶作用及生产制备技术等方面都具有更为显著的提高，其优点可以概括为：高的水溶性（>50g/100g H_2O）；强的包合性能；无药理活性；对肾功能无影响；可用于口服及非口服制剂；低的 GMP 生产成本和更广的用途。我们研制开发的羟丙基-磺丁基-β-环糊精（HP-SBE-β-CD）是以羟丙基和磺丁基混合取代的新型环糊精衍生物（CN 1800221A），该产品具有优良的性能，初步实验证明具有很高的安全性。本发明采用（质量比 1：10～150）的磺丁基-β-环糊精或羟丙基-磺丁基-β-环糊

精改进紫杉醇制剂，其中制得的低配比 1 ： 25（质量比）包合物即可使紫杉醇溶解度达 9～10 mg/ml，固体包合物稀释 500 倍以上皆能够稳定保存 12 小时以上，且化学性质稳定、药剂学稳定性高，刺激性小，具有重要应用价值。

上述方案实现的关键、也是本发明的第二发明任务的技术方案是：含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物的制备方法，步骤如下，

在羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物的纯水溶液中，搅拌下滴加紫杉醇的乙醇溶液（或先将环糊精、紫杉醇与纯水混合，搅拌下缓慢滴加乙醇至体系完全溶解，是效果完全相同的等同步骤）；

体系溶解后以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤；

滤液减压除乙醇，得到液体紫杉醇包合物；

或减压除乙醇后再减压除水，干燥，得到固体紫杉醇包合物。

所述的紫杉醇包合物中乙醇含量小于 2%。

更优化和更具体地说，本发明的含有环糊精/紫杉醇包合物的药物组合物的制备方法的具体步骤是：

用 1 ： 25 质量比的紫杉醇 ： 环糊精比例配制环糊精的纯水溶液，该溶液是指：羟丙基-磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精，或磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物与 2～10 倍质量的纯水混合制成的溶液，搅拌下缓慢加入比例紫杉醇与乙醇配制的溶液，乙醇用量可以是紫杉醇等量至 10 倍质量以紫杉醇能够溶解为度，加入紫杉醇时可室温也可在 25～65℃间加热搅拌，搅拌加热生成包合物后，以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，然后

减压尽量除去乙醇，得到液体包合物，或再继续减压除水至尽，减压真空干燥后得固体包合物。

本发明制备的固体包合物水溶性高，易于溶解而不需加入其他助溶剂，配制的水溶液溶血副作用小，适宜临床使用。含有临床给药剂量 30mg 紫杉醇的固体包合物加注射用生理盐水稀释 10~500 倍配制成溶液后数天内皆能够保持稳定。

该固体包合物与常用的含有可注射的药用辅料溶液稀释到适当浓度经灭菌处理后，所得的组合物溶液可供注射使用。

包合作用的验证:

D_2O 为溶剂的磺丁基-β-环糊精原料与包合物 H,C-COSY（^{13}C，^{1}H 相关谱）对照结果，包合物中环糊精葡糖环内的 H-3 和 H-5 质子（δ4.1~3.4）明显移向高场（附图 1），表明紫杉醇分子的苯甲酰基侧链基团被包合进入环糊精。

紫外光谱实验发现，水溶液中，紫杉醇的紫外吸收随环糊精（环糊精自身无吸收）浓度的变化而发生改变（附图 2）。

环糊精结构特征是具有高电子密度的疏水空腔（《环糊精化学》，科学出版社 2001，P135），进入疏水空腔（包合）的药物分子发色团（如苯基）的 π 电子跃迁受环糊精疏水空腔高电子密度的诱导发生改变而引起紫外光谱的变化，测定体系紫外吸收是判断包合作用的有效方法。紫杉醇紫外吸收随环糊精浓度的增大而明显增强，说明紫杉醇与本发明使用的环糊精存在明显而强的包合作用。

包合稳定常数的测定:

包合稳定常数 Ka 是包合作用程度的量度，紫外分光光度法是测定 Ka 的常用方法。改变环糊精浓度（环糊精自身无吸收）浓度恒定的紫杉醇溶液紫外吸收呈现规律性变化，从而获得环糊精浓度（C）与紫外吸光度（A）的关系，由 1/ C 与 1/A 关系曲线可定量计算出环糊精/紫杉醇的表观一级包合稳定常数 Ka，同时实验测定了加入乙醇对 Ka 的影响变化，各种环糊精的 Ka 见表 1，

表 1 紫杉醇/环糊精的表观一级包合稳定常数 Ka（M^{-1}; 234nm）

环 糊 精	Ka	
	H_2O	60% EtOH
磺丁基-β-环糊精	5396	9367
羟丙基-磺丁基-β-环糊精	14121	19722
羟丙基-β-环糊精	1325	4646
β-环糊精	413	

结果显示，本发明使用的环糊精具有较大的包合常数 Ka，而且乙醇的存在显著提高了 Ka 值（增强环糊精的包合能力）因而具有促进包合的作用，而不仅仅是助溶剂。一般情况下，有机溶剂与药物竞争包合，乙醇通常表现为降低药物 Ka 的效应。与羟丙基-β-环糊精不同，由于纯水条件下本发明使用的环糊精包合紫杉醇仍然具有较大的 Ka ，足以生成稳定的包合物，因而本发明在包合物形成后将乙醇尽量去除，以获得较纯净的药物包合物，尽可能降低乙醇对药物产生的影响。利用乙醇对紫杉醇包合作用的影响制备包合物是本发明成功的技术基础。

包合物制备及验证

采用加入适量乙醇使包合充分以后，再减压除去经干燥制备了多种比例

的磺丁基-β-环糊精/紫杉醇，羟丙基-磺丁基-β-环糊精/紫杉醇，磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精的混合物/紫杉醇的固体包合物，DTA 实验证实固体物为包合物而非简单的物理混合物。以磺丁基-β-环糊精/紫杉醇（质量比 25 ： 1）为例分析说明:

称取紫杉醇、磺丁基-β-环糊精、紫杉醇与磺丁基-β-环糊精物理混合物、包合物共四种样品各约 5.0mg，进行差示扫描热分析：Al_2O_3 参比，量程±50μV，升温范围 30℃～400℃，升温速率 10℃/min，得 DTA 图谱。结果表明：紫杉醇在 240℃有一熔融峰（分解）；环糊精在 70-90℃和 250-270℃处也各分别为脱水吸热峰和相变峰，约 360℃为熔融分解峰。物理混合物保持了环糊精和紫杉醇的吸热峰特征，而包合物图谱上，脱水吸热峰显著减弱，相变峰基本消失，其他各峰的位置（温度）和形状（热效应）都发生了明显变化，因此说明包合物已形成。

包合物中的残留乙醇:

包合物 ^{1}HNMR 显示微弱的乙醇甲基峰,由乙醇甲基峰（t ,δ= 1.10941）与环糊精特征峰（H-1 峰, d,δ= 5.18258~5.05405）的积分面积比计算出多批制备包合物中的乙醇残留量（%），结果见表 2，

表 2 紫杉醇/环糊精固体包合物中乙醇残留量

包合物批号	环糊精*	药物/环糊精比	乙醇残留量（%）
20060128	a	1 : 50	0.43
20060131	b	1 : 50	0.51
20060306	a	1 : 30	0.37
20060318	b	1 : 30	0.22
20060608	b	1 : 25	0.21

20060629	a	1 : 25	0.27
20060730	a + b	1 : 25: 25	0.37
20060812	b	1 : 100	1.26

*: a = 磺丁基-β-环糊精; b = 羟丙基-磺丁基-β-环糊精

实验证明，本发明技术制备过程中虽然使用较多乙醇，但经纯化处理后乙醇残留很少，低比例环糊精（1 : 50 以下）制备的包合物中乙醇残留一般低于 1.0%; 较大比例环糊精制备包合物也仅有不足 2.0% 的乙醇残留。挥发性、刺激性强的乙醇残留量的大幅降低，为提高紫杉醇制剂稳定性、降低刺激等副作用提供了有利保障。

包合增溶试验:

标准曲线: 以乙醇溶液配制 0.225mg/ml 的紫杉醇母液，纯净水稀释成 0.25μg/ml ~ 2.25μg/ml 系列溶液，234nm 下测定紫外吸收 A，以 A 对浓度 C（mg/ml）作图得标准曲线（A = 393.2C-0.0123; r =0.9998）。

用纯净水配制不同 % 浓度的环糊精溶液，加入紫杉醇原料药，于 25℃±1℃振荡 72h，过滤，静置，定量移取适量的滤液，纯净水稀释，于 234nm 处测定紫外吸收，由标准曲线得紫杉醇溶解度，见表 3

表 3 紫杉醇在环糊精溶液中的溶解度

环糊精*（浓度%）	溶解度（mg/ml）	增溶倍数
0	0.000589	1
a （25）	9.324	15540
a （31）	10.182	16971
b （31）	11.177	18629

*: a = 磺丁基-β-环糊精; b = 羟丙基-磺丁基-β-环糊精

由于高浓度环糊精溶液（>50%）增溶作用虽强，但基本无实际使用价值，因此，进行了 31% 以下浓度环糊精水溶液的增溶试验，结果显示，本发明使用的环糊精对紫杉醇有极强的增溶作用。

样品稳定性:

药物组合物的稳定性包括药物的化学稳定性及组合物的药剂学稳定性质，是药物组合物得以应用的基本要素。

固体包合物稳定性

HPLC 法色谱条件: 色谱柱 ODS C_{18} (250 mm× 4.6 mm); 流动相，甲醇:水:乙腈(20∶30∶50); 流速 1.0 ml/min; 检测波长 228nm; 测定时间: 30.00 分钟; 检测灵敏度 1.0000AUFS。

样品: 紫杉醇原料; 紫杉醇/磺丁基-β-环糊精包合物（a, 质量比 1∶25）; 紫杉醇/羟丙基-磺丁基-β-环糊精包合物（b, 质量比 1∶25）

取紫杉醇原料和包合物若干，均分 3 份为试验样品，分别进行光照、高温和高湿度加速试验:

1） 光照试验 样品置于透明密封容器中，放在装有日光灯的光照箱内，在 4500 ±500LX 光照度的条件下放置 5 天，取样检查分析，结果与 0 天样品比较。

2） 高温试验 样品分别置于密封洁净容器中，在 60℃的温度下放置 5 天，取样检查分析，结果与 0 天样品比较。

3） 高湿度试验 样品分别置于恒湿密闭器皿中于 25℃、相对湿度 90±5% 条件下放置 5 天，取样检查分析，结果与 0 天样品比较。

HPLC 测定图例见附图 3，附图 4，各试验结果见表 4，

表 4 5 天加速试验的样品含量测定结果

样 品	含 量（%）			
	0 天	光照	高温	高湿
紫杉醇原料	99.748	90.346	91.569	89.336
包合物 a	99,746	97.035	96.476	96.141
包合物 b	99,736	96.786	97.255	96.022

加速试验条件下，紫杉醇原料颜色略变深，含量下降较明显；包合物外观颜色无改变，含量降低很少，杂质基本无变化。结果显示，固体包合物中紫杉醇化学性质稳定，包合技术对提高紫杉醇稳定性效果明显。

包合物溶液及药物稳定性

(1) 溶液稳定性 质量比 1:25 固体包合物分别用生理盐水、等渗葡糖液配制成含紫杉醇 10mg/ml 的溶液，再稀释 1~1000 倍，灭菌处理制成不同浓度注射液、连续观察 5 小时～10 天，其中对紫杉醇/羟丙基-磺丁基-β-环糊精包合物的生理盐水稀释体系的稳定性观察试验结果见表 5，

表 5 环糊精包合紫杉醇注射液的溶液状态

稀释倍数	药物浓度 mg/ml	溶 液 状 态 *								
		0 小时	5 小时	10 小时	15 小时	20 小时	2 天	4 天	6 天	10 天
1 倍	5.00	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 倍	1.00	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20 倍	0.50	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 倍	0.20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
100 倍	0.10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
500 倍	0.02	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1000 倍	0.01	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* +：澄清无沉淀； -：产生沉淀或浑浊

（2） 溶液中的紫杉醇稳定性试验（含量测定）

采用上述相同的样品和 HPLC 色谱条件，取紫杉醇原料和包合物若干，用流动相（pH＝6.50）溶解，超声30分钟后稀释100倍，静置，分别于0、2、4、6、8 小时取样测定HPLC 谱，

表6 含水溶液中样品含量随时间的变化

样 品	含 量（%）				
	0 小时	2 小时	4 小时	6 小时	8 小时
紫杉醇原料	99.745	99.700	99.577	99.648	99.608
包合物 a	99.736	99.740	99.717	99.687	99.702
包合物 b	99.748	99.718	99.630	99.627	99.605

各样品在含水溶液中，化学性质稳定，含量基本不变。

溶血作用试验:

（参考文献: 国家食品药品监督管理局《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》，2005，3，18; 国家药品监督管理局《中药注射剂研究的技术要求》，1999，11，12 ）

包合物生理盐水配制的溶液的溶血性与现有紫杉醇制剂对比具显著差异。固体包合物稀释的溶液溶血作用轻微; 现有紫杉醇制剂稀释至临床给药0.06mg/ml 的稀浓度条件下溶血作用仍然达 15% ，结果见附图 5 。

体内抑瘤作用:

20±2g雄性昆明小鼠右腋窝皮下接种1×10^7/ml S_{180}细胞0.2ml (2×10^6个细胞)实体瘤模型，紫杉醇及紫杉醇/环糊精包合物样品溶液腹腔给药7天，实验条件下，紫杉醇/环糊精包合物 5mg/kg剂量抑瘤率 94.69% 明显高于未包合的紫杉醇（抑瘤率82.77%）; 紫杉醇及紫杉醇/环糊精包合物对动物体

重均有降低，但紫杉醇组体重降低大于包合物组，结果提示，紫杉醇包合后抑瘤活性增强而毒副作用得到降低。

本发明的优点：

包合物显著提高了紫杉醇溶解度（达 10mg/ml 以上），溶液稀释后能够长时间保持清澈稳定，且溶血作用低、毒副作用小，药物活性好。

紫杉醇与环糊精包合后，固态、液态样品含量稳定，药物/环糊精比例小、制剂中环糊精用量低，适宜用于临床。

本发明的包合物有机溶剂残留少，有利于提高用药安全性。

制备方法简单、操作简便、成本低且无环境污染。包合物性质稳定、与其他药用辅料相容性好，便于制剂的制备。

包合物制备的注射液无腐蚀性成分、无毒害，临床使用方便、实用性强。

附图说明

图 1：摩尔比 1：9 紫杉醇/磺丁基-β-环糊精包合物 H,C-COSY（溶剂 D_2O，δ4.1～3.4 部分）；

图 2：水溶液中不同羟丙基-磺丁基-β-环糊精浓度下的紫杉醇紫外吸收扫描图（210nm～296nm）；

图 3：紫杉醇/羟丙基-磺丁基-β-环糊精包合物高温试验（5 天）的 HPLC 色谱图；

图 4：紫杉醇原料高温试验（5 天）的 HPLC 色谱图；

图 5：市售紫杉醇制剂、紫杉醇/羟丙基-磺丁基-β-环糊精（HP-SBE-β-CD）包合物、紫杉醇/磺丁基-β-环糊精（SBE-β-CD）包合物生理盐水稀释的溶液，紫杉醇浓度-溶血作用曲线图。

具体实施方式

实施例 1：将 3g 羟丙基-磺丁基-β-环糊精与 6ml 纯水混合，搅拌下缓慢滴加 120 mg 紫杉醇与 3ml 乙醇配制的溶液，充分混合搅拌至体系完全溶解，以 0.2～0.4μm 微孔滤膜过滤，滤液 65℃下减压蒸除乙醇，灭菌处理后减压蒸除水分至干，固体物继续减压干燥 48 小时，即得白色固体包合物。其各种参数请参照图 1~图 5。

上述粉状包合物 780 mg （含紫杉醇 30mg）与 250 ml 注射用生理盐水混合即溶解成为液态包合组合物，该溶液可方便用于注射。

实施例 2：与实施例 1 基本相同，但其中的羟丙基-磺丁基-β-环糊精为 4.5g 与 15ml 纯水混合，紫杉醇为 30 mg。

实施例 3：与实施例 1 基本相同，但其中的紫杉醇为 300 mg。

实施例 4：与实施例 1 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精。

实施例 5：与实施例 2 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精。

实施例 6：与实施例 3 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精。

实施例 7：与实施例 1 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精质量比 1 ： 1 的混合物。

实施例 8：与实施例 2 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精质量比 1 ： 50 的混合物。

实施例 9：与实施例 3 基本相同，但其中的环糊精采用磺丁基-β-环糊精与羟丙基-磺丁基-β-环糊精质量比 50 ： 1 的混合物。

实施例 10：与实施例 1 基本相同，但先将环糊精、紫杉醇与 6ml 纯水混合，搅拌下缓慢滴加乙醇至体系完全溶解。

实施例 11：与实施例 1 基本相同，但得到的粉状包合物用等渗浓度的葡萄糖注射液稀释。

实施例 12：与实施例 1 基本相同，但得到的粉状包合物用等渗浓度的果糖注射液稀释。

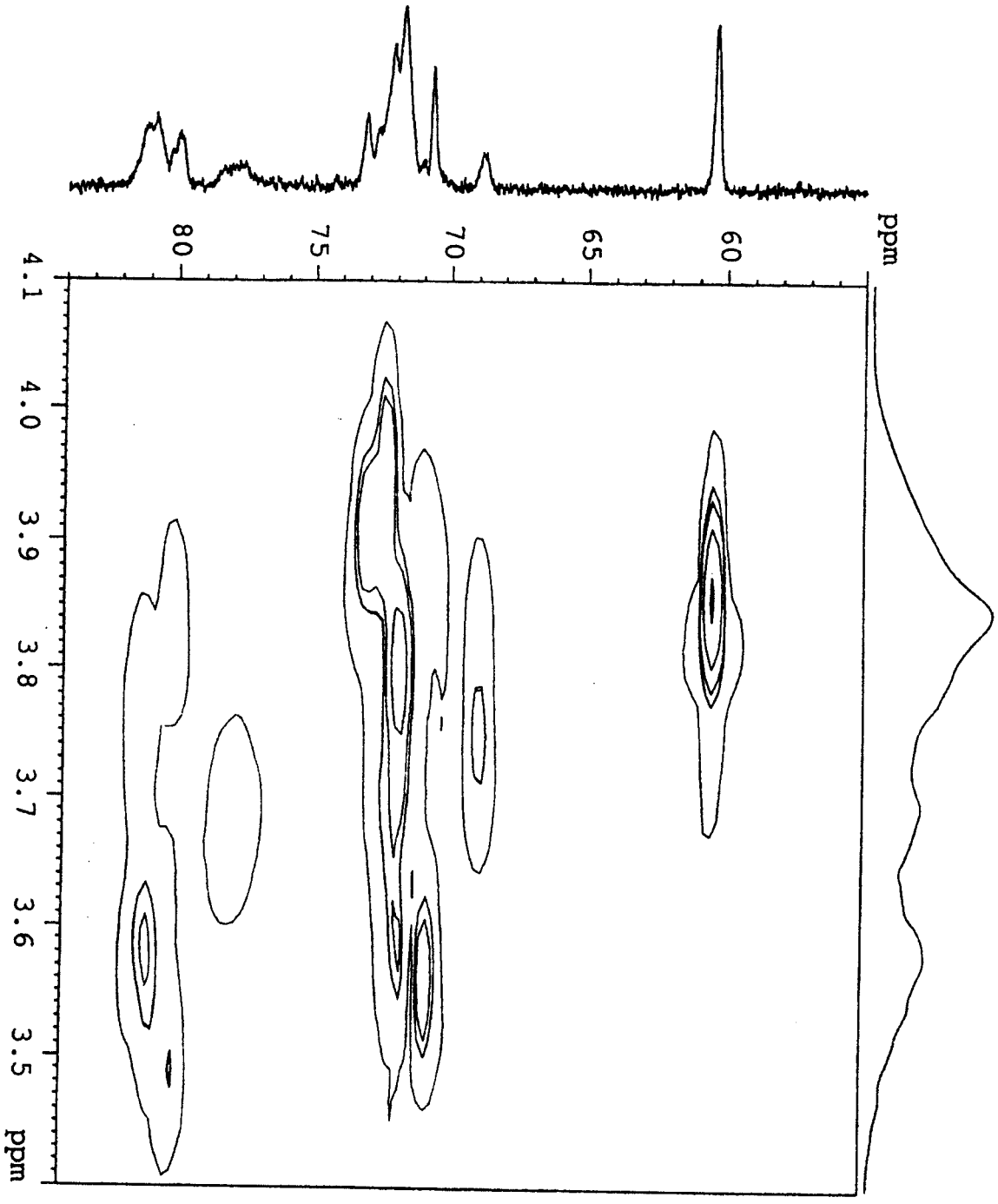


图 1

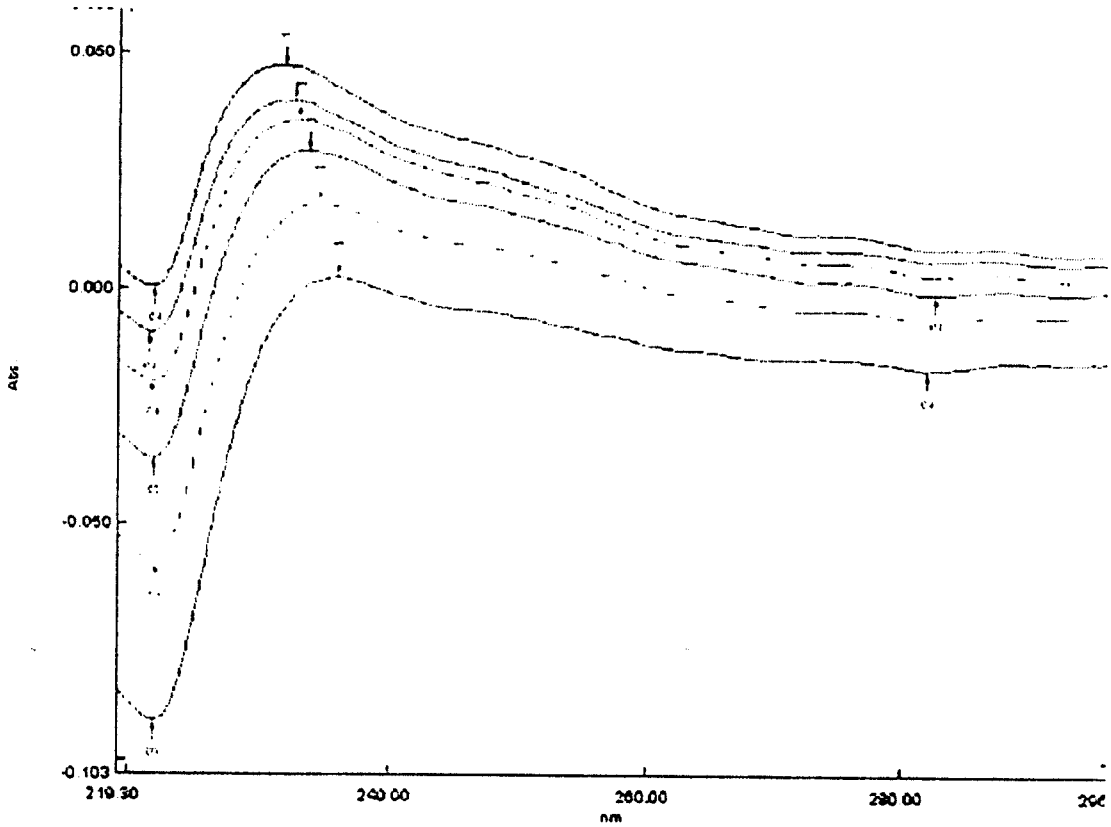


图 2

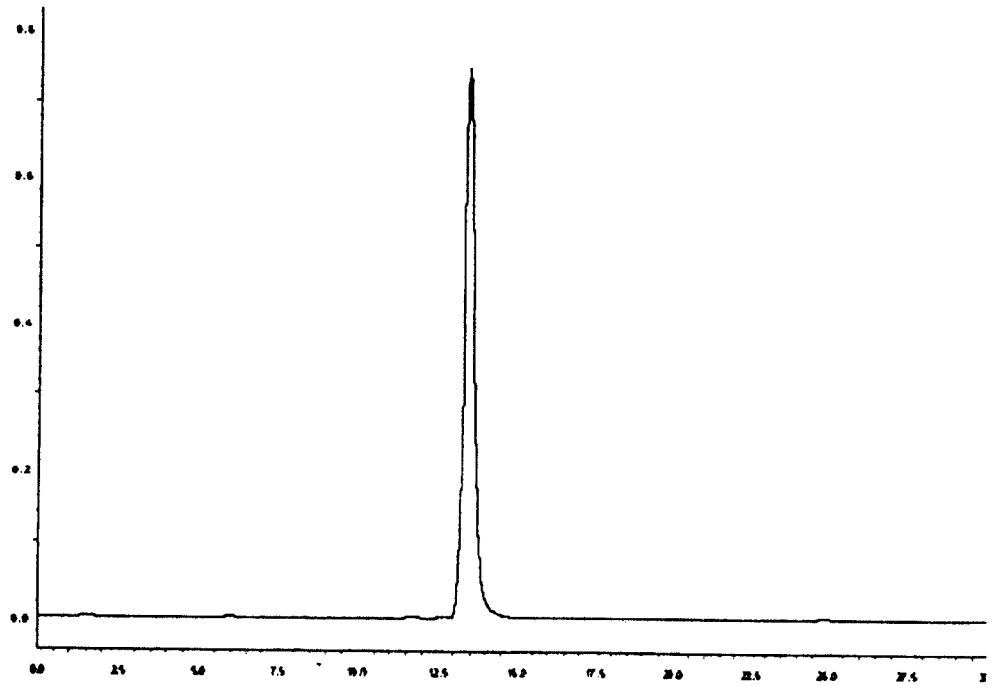


图 3

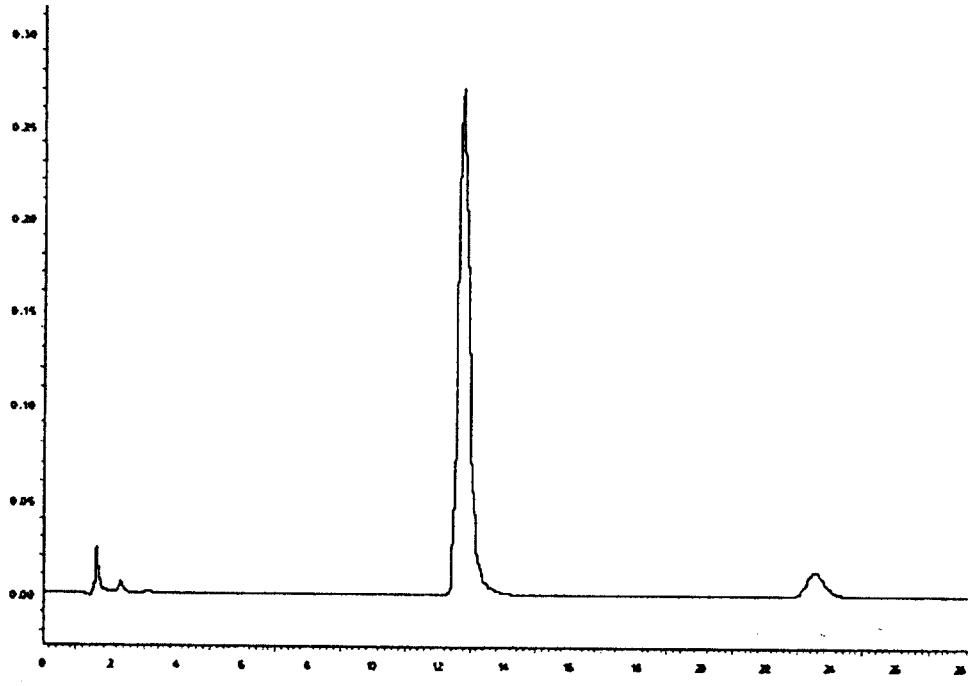


图 4

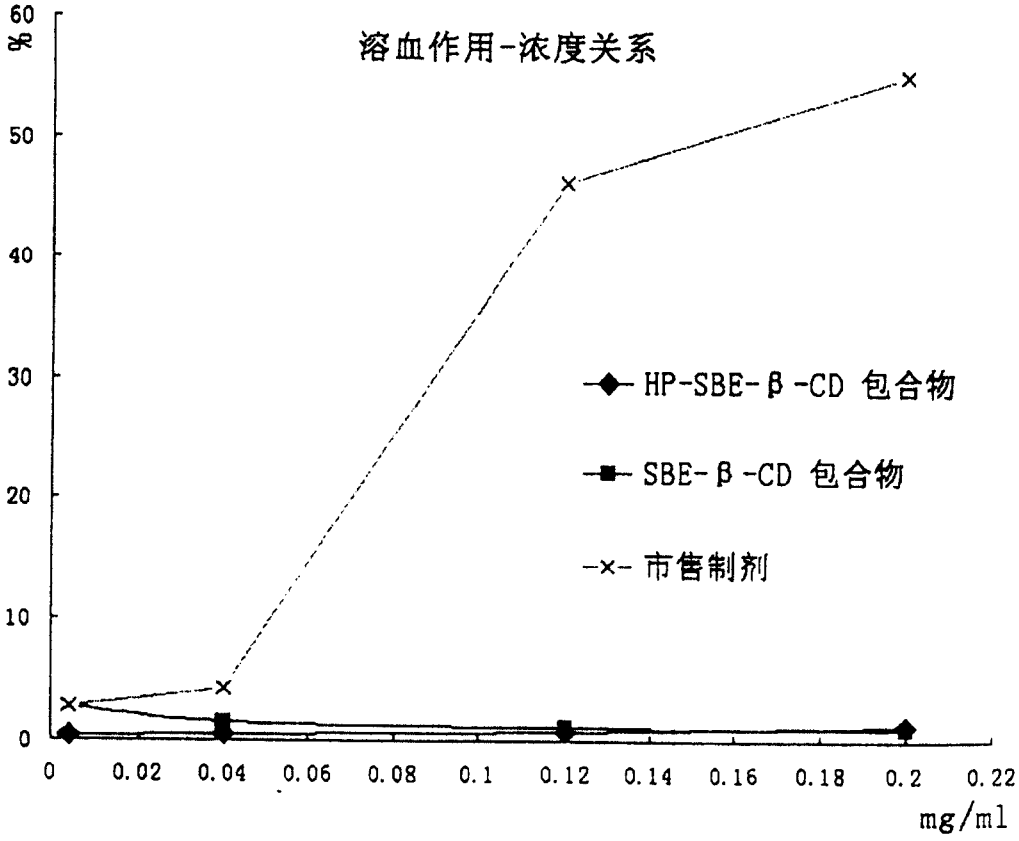

溶血作用-浓度关系
%
60
50
40
30
20
10
0
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.1
0.12
0.14
0.16
0.18
0.2
0.22
mg/ml
HP-SBE-β-CD 包合物
SBE-β-CD 包合物
市售制剂

图 5