



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102686217 B

(45) 授权公告日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201080059672. X

A61K 31/337(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 10. 28

A61P 35/00(2006. 01)

(66) 本国优先权数据

200910236959. 4 2009. 10. 29 CN

(56) 对比文件

CN 101396346 A, 2009. 04. 01, 说明书实施例 2 以及实施例 3.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 06. 28

审查员 沈小春

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2010/078209 2010. 10. 28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/050739 ZH 2011. 05. 05

(73) 专利权人 中国医学科学院药物研究所

地址 100050 北京市宣武区南纬路甲 2 号

(72) 发明人 刘玉玲 夏学军 郭瑞芳 张鹏霄

韩锐 付招娣 周翠萍 汪仁芸

金笃嘉

(74) 专利代理机构 北京三高永信知识产权代理

有限责任公司 11138

代理人 何文彬

(51) Int. Cl.

A61K 9/107(2006. 01)

权利要求书3页 说明书23页 附图3页

(54) 发明名称

以类固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳

(57) 摘要

一种紫杉醇亚微乳剂,其制备方法和用途。所述亚微乳剂包含紫杉醇类固醇复合物、注射用油、注射用水、乳化剂、助乳化剂和等渗剂,所述的紫杉醇类固醇复合物中紫杉醇与类固醇摩尔比为 1:0. 2-4, 优选 1:0. 25-2。所述亚微乳剂用于恶性肿瘤治疗,其平均粒径在 400nm 以下、pH 为 3. 5-6。

1. 一种紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,其包含紫杉醇类固醇复合物、注射用油、注射用水、乳化剂、助乳化剂和等渗剂,在所述紫杉醇类固醇复合物中紫杉醇与类固醇的摩尔比为1:0.2~2;所述的紫杉醇类固醇复合物中的类固醇为天然类固醇中的至少一种;所述的天然类固醇选自7-氢化胆固醇、羊毛固醇、谷甾醇、菜子固醇、真菌固醇、牡蛎固醇、豆甾醇、麦固醇和麦角固醇中的至少一种。

2. 根据权利要求1的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,在所述紫杉醇类固醇复合物中紫杉醇与类固醇的摩尔比为1:0.33~1。

3. 根据权利要求1或2的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述亚微乳剂的乳滴平均粒径在400nm以下,以ml/ml计所述油相的用量比例为所述亚微乳剂总量的5%~35%,以紫杉醇计,载药量为0.25mg/ml~5mg/ml。

4. 根据权利要求3的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,亚微乳剂的乳滴平均粒径在300nm以下,以ml/ml计所述油相的用量比例为10%~30%,以紫杉醇计,载药量为0.5mg/ml~2mg/ml。

5. 根据权利要求1或2的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的注射用油选自长链油和中链油中的一种或其混合物;所述的长链油选自长链脂肪酸、长链脂肪酸酯和长链脂肪醇;所述的中链油选自中链脂肪酸、中链脂肪酸酯和中链脂肪醇。

6. 根据权利要求5的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的长链油为长链脂肪酸酯,所述的中链油为中链脂肪酸甘油酯。

7. 根据权利要求1或2的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的乳化剂为非离子表面活性剂或天然表面活性剂;所述的非离子表面活性剂选自脂肪酸甘油酯、聚氧乙烯脂肪醇醚类、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯、山梨醇及失水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酯类、维生素E衍生物类和聚氧烯烃共聚物中的至少一种;所述的天然表面活性剂选自蛋黄卵磷脂、豆磷脂、胆甾醇和胆酸类、海藻酸钠和壳聚糖中的至少一种。

8. 根据权利要求7的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的天然表面活性剂为蛋黄卵磷脂和大豆磷脂。

9. 根据权利要求7所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的0.5%~5%,以g/ml计。

10. 根据权利要求7所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的1.0%~4.0%,以g/ml计。

11. 根据权利要求7所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的1.0%~2.0%,以g/ml计。

12. 根据权利要求1或2的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的助乳化剂选自聚乙二醇类和泊洛沙姆188中的至少一种。

13. 根据权利要求1或2的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的助乳化剂为泊洛沙姆188。

14. 根据权利要求12所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的助乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的0%~5%,以g/ml计。

15. 根据权利要求12所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的助乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的0.5%~3%,以g/ml计。

16. 根据权利要求 12 所述的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的助乳化剂的含量为所述亚微乳剂总量的 1.0% -2.0%,以 g/ml 计。

17. 根据权利要求 1 或 2 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的等渗剂为甘油、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇中的一种或多种。

18. 根据权利要求 1 或 2 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述的等渗剂为甘油。

19. 根据权利要求 1 或 2 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,其还包含稳定剂,选自油酸、油酸钠和 PEG 中的一种。

20. 根据权利要求 19 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述稳定剂为油酸。

21. 根据权利要求 1 或 2 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,其还包含抗氧化剂,选自维生素 E 或维生素 E 酯。

22. 根据权利要求 21 的紫杉醇亚微乳剂,其特征在于,所述抗氧化剂为维生素 E。

23. 制备权利要求 1 ~ 22 中任一项的紫杉醇亚微乳剂的方法,其特征在于,包括如下步骤:

▶ 取注射用水,加入乳化剂、助乳化剂和等渗剂,置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀水相,加热至 40-80°C,保温;

▶ 另将紫杉醇与类固醇,按所述比例混合,加入适量有机溶剂溶解,在合适的温度条件下搅拌,去除有机溶剂,真空干燥制得复合物;取紫杉醇类固醇复合物,任选地和稳定剂一起溶于预热至 40-80°C 的注射用油中,置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀油相;

▶ 在搅拌条件下,将水相缓缓加入至油相中,以 10000-20000 转 / 分剪切 5-10min,使形成均匀初乳,迅速转移至高压均质机中乳化,粒径控制在 400nm 以下,收集全部乳液,用盐酸调节 pH 至 3.5-6.0,并加水适量,即得。

24. 根据权利要求 23 的方法,其中所述粒径控制在 300nm 以下。

25. 根据权利要求 23 的方法,其中所述 pH 值为 4.0-5.0。

26. 制备权利要求 1 至 22 中任一项的紫杉醇亚微乳剂的方法,其特征在于,采用如下步骤:

▶ 取注射用水,加入助乳化剂和等渗剂,搅拌制成水相,加热至 40-80°C,保温;

▶ 另将紫杉醇与类固醇,按所述比例混合,加入适量有机溶剂溶解,在合适的温度条件下搅拌,去除有机溶剂,真空干燥制得复合物;取紫杉醇类固醇复合物和乳化剂,溶于预热至 40-80°C 的注射用油中,置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀油相;

▶ 在搅拌条件下,将水相缓缓加入至油相中,高速搅拌剪切使形成均匀初乳,迅速转移至高压均质机中乳化,粒径控制在 400nm 以下,收集全部乳液,用盐酸调节 pH 至 3.5-6.0,优选的 pH 值为 4.0-5.0,并加水至适量,即得。

27. 根据权利要求 26 的方法,其中所述粒径控制在 100-300nm。

28. 根据权利要求 26 的方法,其中所述 pH 值为 4.0-5.0。

29. 一种制剂,其包含权利要求 1 ~ 22 中任一项的紫杉醇亚微乳剂,该制剂为输液剂或干乳剂的形式。

30. 制备权利要求 29 所述的制剂的方法,其特征在于,其中的输液剂是通过如下方法制备的:将权利要求 1 ~ 22 中任一项的紫杉醇亚微乳剂经通蒸汽灭菌或热压灭菌无菌工艺处理,灌装,即得;其中的干乳剂是通过如下方法制备的:向权利要求 1 ~ 22 中任一项的紫

杉醇亚微乳剂中加入适量支撑剂,经无菌过滤处理后,采用冷冻干燥工艺制成干乳剂。

## 以类固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种以类固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂及其制备方法,本发明还涉及该紫杉醇亚微乳剂的用途,属医药制剂技术领域。

### 背景技术

[0002] 紫杉醇 (paclitaxel, Taxol) 具有重要的抗肿瘤活性,临床上广泛用于卵巢癌、和乳腺癌、非小细胞肺癌、头癌和颈癌等的治疗。由于其几乎不溶于水(0.006 μg/ml),目前用于临床的紫杉醇普通注射剂Taxol<sup>®</sup>系采用 Cremopher EL (聚氧乙基蓖麻油)/乙醇(50:50, V/V)的混合溶液 5ml 溶解 30mg 的紫杉醇制成。由于处方中含有大量的 Cremopher EL,易引起体内组胺释放,导致严重的过敏反应。为此,临床使用时需进行如下脱敏处理:治疗前 12 小时口服地塞米松 10mg,治疗前 6 小时再口服地塞米松 10mg,治疗前 30 ~ 60 分钟给予苯海拉明肌注 20mg、静注西咪替丁 300mg 或雷尼替丁 50mg。即使如此,临床上仍有 5% ~ 30% 的病人出现不同程度的过敏反应。此外,以 Cremopher EL/乙醇增溶的紫杉醇浓溶液,稀释后存在物理稳定性问题,如环境温度偏低或滴注时间过长,均有可能析出药物,存在安全性隐患。

[0003] 针对紫杉醇注射剂存在的问题,自紫杉醇上市后的二十余年来,国内外药剂学工作者开展了广泛的新型释药系统研究,涉及的技术方案包括环糊精包合物、脂质体、聚合物胶束、纳米粒等。

[0004] 环糊精包合物虽能增加紫杉醇溶解度,但由于环糊精用量太大易导致严重的肾毒性,且加水稀释后易析出药物,因此,至今未能进入临床。

[0005] 脂质体存在包封率低、长期贮存易泄漏、加水稀释后易析出药物的缺陷,产业化发展困难,国外虽经历了 20 年的研究,但最终并未见产品上市。国内早期(2004 年上市)批准的紫杉醇脂质体(力扑素)冻干粉针每支含药物 30mg,规格、临床使用剂量与市售的普通注射液完全一致,疗效无明显差异,但增加了中间配制环节,且同样需采用脱敏预处理,未体现出明显的技术优势。

[0006] 关于紫杉醇聚合物胶束,国内外研究异常活跃,但因载药量低、放置后质量不稳定,需冻干保存,限制了产业化发展。近年来,随着新型高分子材料的涌现,使得聚合物胶束的研究技术得到快速发展,但将大量的全新结构的聚合物材料引入体内,其临床用药的安全性有待进一步考察。

[0007] 美国生物科学公司 2005 年获 FDA 批准上市的注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒(代号 ABI-007)是迄今为止国际上最有影响力的获得国际专利保护的紫杉醇新制剂,其技术方案系使用人血白蛋白作为药物载体,将紫杉醇制成白蛋白结合型的纳米粒,经无菌过滤和冷冻干燥后,制成每支含紫杉醇 100mg 和白蛋白 900mg 的注射用冻干粉针。与普通注射液相比,注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒的优势体现在两个方面,1) 处方中不含 Cremopher EL,彻底消除了过敏反应,成为国际上唯一的不需要脱敏处理而直接使用的紫杉醇新制剂;2) 由于毒性降低、耐受性提高,临床上患者使用剂量由普通注射液的

135~175mg/m<sup>2</sup> 提高至 260mg/m<sup>2</sup>, 临床治疗效果明显优于紫杉醇的普通注射液。但因载体材料白蛋白的用量过大, 价格昂贵(每只售价高达 6200 元), 再加上中间配制操作环节极为复杂, 要求苛刻, 限制了白蛋白结合型紫杉醇纳米粒的临床应用。

[0008] 水包油亚微乳是利用药物的亲脂性, 将药物溶于油相, 以天然磷脂为乳化剂, 经高压均质乳化制备而得到的平均粒径在 600nm 以下的乳液。由于药物存在于内油相, 避免与水及空气接触, 能够克服难溶性药物因溶解度低和稳定性差而不利于制成液体制剂的缺陷。与脂质体技术相比, 亚微乳更具产业化发展优势; 与白蛋白结合型的纳米粒相比, 亚微乳制造成本低, 可采用终端灭菌, 临床上可直接滴注, 不易析出药物, 使用方便安全。因此, 以亚微乳作为载体发展紫杉醇新制剂具有良好的前景。尽管国内外学者对紫杉醇亚微乳进行了大量尝试, 但由于紫杉醇不仅难溶于水, 同时在油中溶解度也很小(约 0.25mg/ml), 直接制备亚微乳载药量低于 0.02mg/ml, 且灭菌和贮存过程中药物易从油相转移至水相, 导致破乳、分层或聚集。受紫杉醇在油中溶解度低的限制, 至今国际上未能研制出载药量高、耐热压灭菌、长期贮存质量稳定的紫杉醇亚微乳制剂。

[0009] 为提高药物在油相中溶解度、突破理化性质对紫杉醇亚微乳剂研究的限制, 我们前期对“紫杉醇脂质复合物”及“以脂质复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂”进行了研究, 并申请了两项发明专利: 申请号为 200810168213.X 的“紫杉醇脂质复合物”和申请号为 200810168212.5 的“以脂质复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂”。

[0010] 200810168213.X 公开的紫杉醇脂质复合物, 优选的脂质材料为天然蛋黄卵磷脂、大豆磷脂和胆固醇, 紫杉醇和脂质材料的重量比例为 1:1 ~ 19, 即脂质材料的用量高达紫杉醇的 1~19 倍(其中以磷脂为脂质材料时, 紫杉醇与脂质材料的摩尔比约 1:1~20; 以胆固醇为脂质材料时, 紫杉醇与脂质材料摩尔比约 1:2.2~42; 以胆酸类为脂质材料时, 紫杉醇与脂质材料摩尔比约为 1:2.1~40)。而 200810168212.5 公开的亚微乳剂, 则是以 200810168213.X 公开的紫杉醇脂质复合物为中间载体。

[0011] 紫杉醇脂质复合物制备目的, 旨在提高紫杉醇在油中的溶解度, 为后续的亚微乳制备提供良好的中间载体。但进一步研究发现, 200810168213.X 和 200810168212.5 专利中提到的技术方案存在以下缺陷:

[0012] 1、以磷脂为脂质材料制备复合物时, 虽对药物油溶性有明显的改善效果, 但最大仅可达到 2mg/ml 左右, 进一步提高磷脂用量并不能继续提高油中溶解度; 受油中溶解度低的限制, 以磷脂复合物为中间载体制备亚微乳剂时, 最大载药量仅可达到 0.5mg/ml 左右, 且包封率低于 80%, 放置 6 个月后出现明显分层, 无法满足临床治疗需求; 载药量达到 1.0mg/ml 时则无法形成均匀乳剂。

[0013] 2、以胆固醇为脂质材料制备复合物时, 对药物油溶性改善效果明显优于磷脂, 但胆固醇系类固醇类脂质材料, 其用量高达紫杉醇重量的 1~19 倍, 存在多种弊端, (1) 摄入量过大: 健康成人每天胆固醇的摄入量大多在 300mg~500mg (相当于 1~2 个鸡蛋黄中含的胆固醇量), 紫杉醇临床每次给药剂量约 300mg, 根据 200810168213.X 专利涉及的胆固醇复合物及其制剂, 摄入的胆固醇相当于 300mg~5700mg, 最高时已相当于 19 个鸡蛋黄, 明显偏高, 存在安全性隐患; (2) 制备的亚微乳剂长期贮存不稳定: 将胆固醇复合物作为中间载体制备亚微乳剂时, 根据临床治疗剂量和特定的紫杉醇浓度, 复合物中的脂质材料用量越高, 则亚微乳的内油相中所包裹的复合物总量就越多。受内油相油滴体积和油水界面的限制,

包裹的复合物总量超过油相和油水界面可容纳的内容物时,就有可能使部分药物游离到外水相中,从而导致包封率降低,且使制得的亚微乳剂不稳定。经对 200810168212.5 专利所述的亚微乳进行考察,包封率在 65%~85%,4℃贮存 6 个月质量还比较稳定,但贮存至 12 个月时出现明显的分层现象,标示含量下降,紫杉醇杂质明显升高;(3) 制备成本高:脂质材料的用量高、制备过程中溶剂用量大、挥干溶剂所需时间长,导致制造成本高,不符合药物经济学原则。

[0014] 为提供脂质材料含量低、包封率高、稳定性好的亚微乳剂,本申请经过大量的试验,采用脂质材料用量低的类固醇复合物为中间载体制备亚微乳剂。类固醇复合物中,紫杉醇/类固醇摩尔比为  $1:0.2^{\sim}4$ ,优选  $1:0.25^{\sim}2$ ,更优选  $1:0.33^{\sim}1$ ;对应地,紫杉醇与类固醇的重量比例为  $1:0.09^{\sim}1:1.94$ ,优选的为  $1:0.11^{\sim}1:0.97$ ,更优选  $1:0.15^{\sim}1:0.49$ 。与 200810168212.5 专利相比,本申请的复合物在类固醇用量大幅减少的情况下,仍能使紫杉醇复合完全,使药物在油中溶解度得到最大程度的提高。进一步增加类固醇用量,溶解度趋于稳定,并无进一步增加作用。利用类固醇复合物对药物油溶性的改善,将复合物溶解在油相中,通过选用乳化剂、助乳化剂,得到了包封率高、长期贮存质量稳定、类固醇含量低的紫杉醇亚微乳,从而完成了本发明。

## 发明内容

[0015] 本发明的一个目的是提供一种紫杉醇亚微乳剂,其包含紫杉醇/类固醇复合物、注射用油、注射用水、乳化剂、助乳化剂和等渗剂;所述的紫杉醇/类固醇复合物中的类固醇为天然类固醇或其衍生物中的至少一种;所述的天然类固醇选自胆固醇、7-氢化胆固醇(又称 7-脱氢胆固醇)、羊毛固醇、谷甾醇、菜子固醇、真菌固醇、牡蛎固醇、豆甾醇、麦固醇醇和麦角固醇,优选胆固醇、7-氢化胆固醇和麦角固醇,更优选胆固醇;所述的天然类固醇衍生物选自胆酸、脱氧胆酸、鹅脱氧胆酸。

[0016] 本发明的亚微乳剂的乳滴平均粒径在 400nm 以下,优选 300nm 以下;油相的用量比例为所述亚微乳剂总量的 5%~35% (ml/ml),优选 10%~30% (ml/ml);以紫杉醇计,载药量为 0.25mg/ml~5mg/ml,优选 0.5mg/ml~2mg/ml。

[0017] 在本发明中,所述紫杉醇/类固醇复合物可以是按照如下方法 1 或 2 制备的,

[0018] 方法 1 包括步骤:

[0019] a. 将紫杉醇与类固醇按比例混合,加入适量有机溶剂溶解,任选地加入抗氧化稳定剂;

[0020] b. 在合适的温度条件下搅拌,通过旋转蒸发或喷雾干燥去除有机溶剂,真空干燥即得;

[0021] 方法 2 包括步骤:

[0022] a. 取一定比例的紫杉醇与类固醇,分别加入适量的不同的有机溶剂溶解,将其混合,任选地加入抗氧化稳定剂;

[0023] b. 在合适的温度条件下搅拌,通过旋转蒸发或喷雾干燥去除有机溶剂,真空干燥即得。

[0024] 在上述紫杉醇/类固醇复合物或其制备方法中,紫杉醇与类固醇的摩尔比为  $1:0.2^{\sim}4$ ,优选  $1:0.25^{\sim}2$ ,更优选  $1:0.33^{\sim}1$ ;相应地,紫杉醇与类固醇的重量比例为

1:0.09~1:1.94, 优选地为 1:0.11~1:0.97, 更优选 1:0.15~1:0.49。

[0025] 在上述紫杉醇 / 类固醇复合物的制备方法中, 所述有机溶剂可选自二氯甲烷、乙醇、甲醇、苯甲醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、叔丁醇中的一种或多种; 优选地, 可选自乙醇、丙酮、乙酸乙酯和四氢呋喃中的一种或多种。“适量的有机溶剂”中的“适量”是指本领域技术人员按照常规技术可确定用于溶解紫杉醇与类固醇的混合物的量, 具体地说, 紫杉醇与类固醇复合物在溶液中的浓度以紫杉醇计算, 控制在 0.5 ~ 16mg/ml 或更高, 优选 1.0~8.0mg/ml; “合适的温度条件”系指控制在 10℃ -70℃, 优选 35-55℃, 例如 25℃、35℃、45℃、55℃或 70℃。搅拌反应的时间和真空干燥的时间都可以由本领域技术人员按照常规技术确定, 比如搅拌反应的时间可以是 0.5-3.0 小时, 例如 0.5 小时、1.0 小时、1.5 小时或 2.0 小时, 真空干燥的时间可以是 8 小时 -48 小时, 例如 8 小时、12 小时、16 小时或 24 小时。所述抗氧化稳定剂可以选自亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、维生素 C、EDTA 及其盐、维生素 E 及其衍生物中的至少一种, 抗氧化稳定剂的用量是本领域在制备脂质复合物中通常采用的用量, 一般不超过复合物总量的 1% (重量)。

[0026] 在本发明中, 所述的注射用油选自长链油和中链油中的一种或它们的混合物。所述的长链油选自长链脂肪酸、长链脂肪酸酯和长链脂肪醇中的一种, 具体可以选自大豆油、蓖麻油、亚油酸、玉米油、橄榄油、花生油、棉籽油、油酸、单硬脂酸甘油酯、单油酸甘油酯、十六醇; 所述的中链油选自中链脂肪酸和中链脂肪酸酯中的一种。优选的长链油为长链脂肪酸酯, 具体地为注射用大豆油; 优选的中链油为中链脂肪酸甘油酯。

[0027] 在本发明中, 所述的乳化剂为非离子表面活性剂或天然表面活性剂。非离子表面活性剂选自脂肪酸甘油酯、聚氧乙烯脂肪醇醚类、聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯、山梨醇及失水山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯脂肪酸酯类、维生素 E 衍生物类和聚氧烯烃共聚物中的至少一种; 所述的天然表面活性剂选自蛋黄卵磷脂、豆磷脂、胆甾醇和胆酸类、海藻酸钠和壳聚糖中的至少一种。优选的乳化剂为天然表面活性剂, 最优选的乳化剂为天然的蛋黄卵磷脂和大豆卵磷脂。乳化剂在本发明的亚微乳剂中的含量为亚微乳剂组合物总量的 0.5%-5% (g/ml), 优选地为 1.0%-4.0% (g/ml), 最优选地为 1.0% -2.0% (g/ml)。

[0028] 在本发明中, 所述的助乳化剂选自聚乙二醇(PEG)类和泊洛沙姆类。助乳化剂的含量为本发明亚微乳剂总量的 0% -5% (g/ml), 优选地为 0.5% -3% (g/ml), 最优选地为 1.0% -2.0% (g/ml)。

[0029] 在本发明中, 紫杉醇亚微乳的渗透压调节剂(等渗剂)选自甘油、木糖醇、山梨醇(糖)醇和甘露醇中的一种或多种, 优选甘油和葡萄糖, 更优选甘油。甘油含量为本发明的紫杉醇亚微乳剂总量的 1.0-3.0% (g/ml), 优选地为 1.5-2.5% (g/ml)。

[0030] 在本发明中, 所述的紫杉醇亚微乳剂还可加入稳定剂, 选自油酸、油酸钠和 PEG 类中的一种, 优选的稳定剂为油酸和 PEG, 更优选地为油酸。油酸的含量为本发明的紫杉醇亚微乳剂总量的 0.05-0.5% (g/ml), 优选地为 0.1-0.2% (g/ml)。

[0031] 本发明的紫杉醇亚微乳剂, 还可包含抗氧化剂, 可以选自维生素 E 或维生素 E 酯衍生物, 优选维生素 E。

[0032] 在本发明中, 所述的“一种或其混合物”或“至少一种”是指可以为所选物质中的一种, 或者两种的混合物, 或者更多种的混合物。

[0033] 本发明的另一个目的在于提供本发明所述的紫杉醇亚微乳剂的一种制备方法, 其



包括如下步骤：

[0034] 取注射用水，加入乳化剂、助乳化剂和等渗剂，置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀水相，加热至 40-80℃，保温；

[0035] 另取紫杉醇 / 类固醇复合物，任选地和稳定剂一起溶于预热至 40-80℃ 的注射用油中，置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀油相；

[0036] 在搅拌条件下，将水相缓缓加入至油相中，10000-20000 转 /min 剪切 5-10min，使形成均匀初乳，迅速转移至高压均质机中均质乳化至粒径控制在 400nm 以下，优选 300nm 以下，收集全部乳液，用盐酸调节 pH 至 3.5-6.0，优选 4.0-5.0，并加水适量（至全量），即得。

[0037] 本发明还提供紫杉醇亚微乳剂的另一种制备方法，其包括如下步骤：

[0038] 取注射用水，加入助乳化剂和等渗剂，搅拌制成水相，加热至 40-80℃，保温；

[0039] 另取紫杉醇 / 类固醇复合物、乳化剂和 / 或稳定剂，溶于预热至 40-80℃ 的注射用油中，置组织捣碎机或剪切机中分散制成均匀油相；

[0040] 在搅拌条件下，将水相缓缓加入至油相中，10000-20000 转 /min 剪切 5-10min，使形成均匀初乳，迅速转移至高压均质机中乳化，粒径控制在 400nm 以下，优选 100-300nm，收集全部乳液，用盐酸调节 pH 至 3.5-6.0，优选 4.0-5.0，并加水适量（至全量），即得。

[0041] 在本发明的制备方法中，在高压均质机中乳化也可以采用其它乳化方法来实现，只要能够乳化均匀，并且达到所述的粒径即可；温度 40-80℃ 可以为比如 40℃、50℃、60℃、70℃ 或 80℃ 等。

[0042] 在本发明的制备方法中，调节 pH 的盐酸的浓度可以本领域常规采用调节 pH 的盐酸浓度，比如可以为 0.1mol/L，或 0.01mol/L；其中注射用水、注射用油的用量，本领域技术人员根据本发明所给出的油相的比例完全可以确定；“加水适量（至全量）”是指除了在制备水相时所采用的水的用量之外，本领域技术人员根据常规技术加入水以达到符合本发明所给出的载药量的水的用量。

[0043] 本发明还提供一种制剂，其包含本发明所述的紫杉醇亚微乳剂，该制剂可以为临床上任何可以使用的剂型，包括输液剂或干乳剂的形式。其中的输液剂是通过如下方法制备的：将本发明所述的紫杉醇亚微乳剂灌装后，经流通蒸汽灭菌或热压灭菌无菌工艺处理，即得；其中的干乳剂是通过如下方法制备的：向本发明所述的紫杉醇亚微乳剂中加入适量支撑剂，经无菌过滤处理后，采用冷冻干燥工艺制成干乳剂。优选的支撑剂为甘露醇，比如 5% (w/v) 的甘露醇。

[0044] 本发明还提供本发明的紫杉醇亚微乳剂在制备抗癌药物中的应用，所述的癌为实体瘤，包括卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、非小细胞肺癌、头癌或颈癌、食道癌、肾癌、肝癌和胃癌。

[0045] 在本发明中，如果没有特别地指出，本文所用的科学和技术术语以及名称都具有与本发明所属领域普通技术人员常规理解相同的意思；并且，如果没有特别地指出，其中所采用的物质及其含量或比例、装置、仪器、制备条件等都是本领域技术人员所熟知的或者其根据本发明的描述可得知的。

[0046] 本发明提供的紫杉醇亚微乳剂特别地具有如下的优点：

[0047] 1) 制备成本低、类固醇摄入量少：本发明的紫杉醇亚微乳使用了脂质材料低的类固醇复合物为中间载体，因复合物中的类固醇用量仅为紫杉醇重量的 0.09~1.94 倍（优选 0.11~0.97 倍），与 200810168212.5 公开的“以脂质复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂”

的技术相比,本专利申请大大减少了脂质材料用量,降低了制备成本,减小了因大量摄入类固醇物质而可能引发的安全隐患。

[0048] 2) 包封率高、稳定性好:临床上紫杉醇的单药剂量为 135 ~ 175mg/m<sup>2</sup>,即每人每次约 240~300mg。另根据人体每次可接受的亚微乳体积,紫杉醇亚微乳剂单剂量的体积应控制在 100-500ml。由此计算,亚微乳剂中紫杉醇的浓度应控制在 0.48mg/ml-3.0mg/ml。200810168212.5 公开的“以脂质复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂”,其中以磷脂复合物为中间载体制备的亚微乳剂,载药量最大仅可达到 0.5mg/ml,且放置后不稳定;而以胆固醇复合物为中间载体制备亚微乳剂,虽载药量能够提高,但胆固醇用量高达紫杉醇 1 ~ 19 倍,导致紫杉醇亚微乳剂中包裹的复合物总量高达 1.2mg/ml--60mg/ml。而本专利申请以类固醇复合物为中间载体制备的亚微乳剂中,因类固醇用量仅为紫杉醇重量的 0.09~1.94 倍(优选 0.11~0.97 倍),则乳剂中包裹的复合物总量仅为 1.14mg/ml—3.60mg/ml (优选的为 1.39mg/ml—1.80mg/ml),由此可见,本发明的制剂稳定性更好且对人体相当安全。

[0049] 对于水包油亚微乳剂,脂溶性药物是分布在油相和 / 或油水界面的,而内油相的油滴体积和油水界面的容量是有限的,投入的复合物总量越多,乳剂的包封率就越低,游离到外水相的药物就越多,亚微乳剂长期贮存的稳定性也就越差。与 200810168212.5 的公开技术相比,本专利因使用了脂质材料用量低的类固醇复合物作为中间载体,油相中包裹的复合物总量大大减少,有利于提高亚微乳剂的包封率、降低水相中游离药物、提高制剂稳定性。

[0050] 对比研究结果表明,200810168212.5 公开的亚微乳剂包封率在 65%-85%,冰箱贮存(4℃,以下同)至 12 个月出现分层,含量下降,杂质由初始时的 1% 以下升高至 3.5% 至 7.6%;而本专利申请的亚微乳剂包封率在 90% 以上,冰箱贮存 12 个月未见分层,外观为均匀乳白色,粒径及含量均无明显变化,杂质总含量低于 1.7%,在优选的载药量范围内,包封率在 95% 以上,杂质总量低于 1.0%,质量稳定。

[0051] 3) 安全性好、耐受剂量大:与市售普通注射液相比,本发明提供的亚微乳剂,不含乙醇和 Cremopher EL,降低了紫杉醇制剂的血管刺激性,避免了由 Cremopher EL 引发的过敏反应和毒副作用,安全性提高,耐受剂量增加,为提高用药剂量、改善治疗效果奠定了良好基础。裸鼠隔 3 日静脉注射一次、共给药 3 次,市售普通注射液的最大耐受剂量(不出现动物死亡)为 20mg/kg,而本专利申请的亚微乳剂为 45mg/kg,耐受剂量增加至 2.25 倍,与文献报道的注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒耐受剂量相似(增加至普通注射液的 2.23 倍)。在耐受剂量下比较抗肿瘤活性,结果显示,与 20mg/kg 的普通注射液和 45mg/kg 注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒相比较,本专利申请的亚微乳剂 45mg/kg 给药,对乳腺癌、卵巢癌及肺癌的肿瘤抑制率最高,肿瘤增长的速度显著低于普通注射液和注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒。

[0052] 下面将参照附图说明和实施例进一步详细阐述本发明,但是本领域技术人员应当理解,但本发明并不限于这些实施例以及使用的制备方法。而且,本领域技术人员根据本发明的描述可以对本发明进行对其进行等同替换、组合、改良或修饰,但这些都包括在本发明的范围内。

## 附图说明

[0053] 附图 1: 试验例 2 亚微乳的稳定性 HPLC 考察图谱(图 A 为紫杉醇对照;图 B 为空白乳剂;图 C 为亚微乳 14 初始;图 D 为亚微乳 14 于 4℃ 贮存 12 个月;图 E 为亚微乳 31 于 4℃ 贮存 12 个月。其中 1 号峰为紫杉醇,2~3 号峰为杂质)。

[0054] 附图 2: 试验例 6 不同制剂对 MDA-MB-231 肿瘤抑制作用

[0055] 附图 3: 试验例 6 不同制剂给药后 MDA-MB-231 模型鼠荷瘤变化

[0056] 附图 4: 试验例 6 不同制剂对 MDA-MB-231 肿瘤裸鼠体重影响

### 具体实施方式

[0057] 实施例 1 紫杉醇类固醇复合物

[0058] 实验复合物 1~ 实验复合物 6: 按本发明专利的技术要求, 选用胆固醇、7-氢化胆固醇和麦角固醇为脂质材料, 制备 2 组紫杉醇 / 胆固醇复合物(摩尔比为 1:1 和 1:2), 2 组紫杉醇 / 7-氢化胆固醇复合物(摩尔比为 1:1 和 1:4), 2 组紫杉醇 / 麦角固醇复合物(摩尔比为 1:1 和 1:4)。具体制备方法: 将紫杉醇和类固醇一同置于三角瓶中, 加入丙酮 2000ml 将其溶解, 在 40℃ 温度条件下搅拌 1 小时, 移至旋转蒸发仪中, 旋转蒸发法去除溶剂, 经 40℃ 减压真空干燥 24 小时即得。

[0059] 参比复合物 1~ 参比复合物 4: 按 200810168212.5 专利中的复合物技术要求, 选用磷脂和胆固醇为脂质材料, 制备 2 组紫杉醇 / 磷脂复合物(摩尔比为 1:6 和 1:10), 2 组紫杉醇 / 胆固醇复合物(摩尔比为 1:10 和 1:20)。具体制备方法同实验复合物 1~ 实验复合物 6。

[0060] 6 组实验复合物和 4 组参比复合物的组成及制备结果见下表。

[0061] 表 1: 紫杉醇 / 类固醇复合物的组成

复合物编号/脂质材料	紫杉醇 投料	脂质材料 投料	紫杉醇/脂质材料	
			摩尔比	重量比
实验复合物1/ 胆固醇	8.0 g	3.6 g	1:1	1:0.45
实验复合物2/ 胆固醇	8.0 g	7.2 g	1:2	1:0.90
实验复合物3/ 7-氢化胆固醇	3.0 g	1.35g	1:1	1:0.45
实验复合物4/ 7-氢化胆固醇	3.0 g	5.406g	1:4	1:1.80
实验复合物5/ 麦角固醇	3.0g	1.40g	1:1	1:0.46
实验复合物6/ 麦角固醇	3.0g	5.58g	1:4	1:1.86
参比复合物1/ 磷脂	3.0 g	16.65g	1:6	1:5.55
参比复合物2/ 磷脂	3.0 g	6.78g	1:10	1:9.23
参比复合物3/ 胆固醇	3.0g	13.5g	1:10	1:4.50
参比复合物4/ 胆固醇	3.0g	27.18g	1:20	1:9.06

[0063] 实施例 2: 以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

[0064] [ 处方组成 ]

组分	亚微乳剂1	亚微乳剂2	亚微乳剂3	亚微乳剂4
实验复合物1*	145mg	290mg	580mg	1160mg
蛋黄卵磷脂	2g	2.4g	3g	3g
泊洛沙姆(188)	1g	2g	4g	6g
甘油	5g	5g	5g	5g
大豆油	40ml	40ml	50ml	50ml
注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0065] \*实验复合物1为实施例1中制备得到的紫杉醇/胆固醇重量比为1:0.45的实验复合物1。

[0066] [制备方法]

[0067] 取注射用水约130-140ml,按处方量加入蛋黄卵磷脂、泊洛沙姆(188)和甘油,置组织捣碎机中分散,制成均匀水相,加热至40℃,保温;

[0068] 按处方量量取大豆油,预热至40℃,称取实施例1制备的紫杉醇胆固醇复合物1,溶于预热的大豆油中,置组织捣碎机中分散制成均匀油相;

[0069] 在搅拌条件下,将水相缓缓加入至油相中,以10000转/min剪切5min,使形成均匀初乳,迅速转移至高压均质机中,均质6次,收集全部乳液,用0.1mol/L盐酸调节pH至4.0±0.5,并加水至200ml,摇匀,分装,115℃灭菌30分钟,即得。

[0070] 亚微乳1-亚微乳4,乳化剂(蛋黄卵磷脂)用量分别为亚微乳剂总量的1.0%(g/ml)、1.2%(g/ml)、1.5%(g/ml)和1.5%(g/ml),助乳化剂泊洛沙姆(188)用量为亚微乳剂总量的0.5%(g/ml)、1.0%(g/ml)、2.0%(g/ml)和3.0%(g/ml),紫杉醇的载药量分别为0.5mg/ml,1.0mg/ml,2.0mg/ml,4.0mg/ml。激光粒度测定仪测定,4组乳剂平均粒径分别为225nm,233nm,245nm,230nm。

[0071] 实施例3:以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

[0072] [处方组成]

组分	亚微乳剂5	亚微乳剂6	亚微乳剂7	亚微乳剂8
实验复合物2*	190mg	380mg	760mg	1520mg
蛋黄卵磷脂	2g	2.4g	3g	3g
泊洛沙姆(188)	2.4g	4g	4g	6g
甘油	5g	5g	5g	5g
维生素E	/	/	/	40mg
大豆油	40ml	40ml	50ml	50ml
注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0073] \*实验复合物2为实施例1中制备得到的紫杉醇/胆固醇重量比为1:0.90的实验复合物2。

## [0076] [制备方法]

[0077] 取注射用水约 130-140ml,按处方量加入泊洛沙姆(188)和甘油,置组织捣碎机中分散,制成均匀水相,加热至 80℃,保温;

[0078] 按处方量量取大豆油,预热至 80℃,按处方量称取复合物 2、蛋黄卵磷脂及维生素 E,加至预热的大豆油中,置组织捣碎机中分散溶解制成均匀透明的油相;

[0079] 在搅拌条件下,将水相缓缓加入至油相中,以 20000 转/min 剪切 10min,使形成均匀初乳,迅速转移至高压均质机中,均质 6 次,收集全部乳液,用 0.1mol/L 盐酸调节 pH 至  $5.5 \pm 0.5$ ,并加水至 200ml,摇匀,分装,115℃ 灭菌 30 分钟,即得。

[0080] 亚微乳 5-亚微乳 8,乳化剂(蛋黄卵磷脂)用量分别为亚微乳剂总量的 1.0%(g/ml)、1.2%(g/ml)、1.5%(g/ml)和 1.5%(g/ml),助乳化剂泊洛沙姆(188)用量为亚微乳剂总量的 1.2%(g/ml)、2.0%(g/ml)、2.0%(g/ml)和 3.0%(g/ml),紫杉醇的载药量分别为 0.5mg/ml,1.0mg/ml,2.0mg/ml,4.0mg/ml。激光粒度测定仪测定,4 组乳剂平均粒径分别为 246nm,262nm,231nm,242nm。

[0081] 实施例 4:以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

## [0082] [处方组成]

组分	亚微乳9	亚微乳10	亚微乳11	亚微乳12
实验复合物1*	145mg	290mg	580mg	1450mg
大豆磷脂	2.4g	2.4g	2.4g	3.0g
泊洛沙姆(188)	4g	4g	4g	4g
[0083] 甘油	5g	5g	5g	5g
维生素E	/	/	/	40mg
中链油	40ml	40ml	50ml	50ml
注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0084] \*实验复合物 1 为实施例 1 中制备得到的紫杉醇/胆固醇重量比为 1:0.45 的实验复合物 1。

## [0085] [制备方法]

[0086] 同实施例 3。其中 pH 值调节为  $5.0 \pm 0.5$ 。

[0087] 亚微乳 9-亚微乳 12,乳化剂(大豆磷脂)用量分别为亚微乳剂总量的 1.2%(g/ml)、1.2%(g/ml)、1.2%(g/ml)和 1.5%(g/ml),助乳化剂泊洛沙姆(188)用量均为亚微乳剂总量的 2.0%(g/ml),紫杉醇的载药量分别为 0.5mg/ml,1.0mg/ml,2.0mg/ml 和 5.0mg/ml。激光粒度测定仪测定,4 组乳剂平均粒径分别为 165nm,153nm,127nm,138nm。

[0088] 实施例 5:以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

## [0089] [处方组成]

组分	亚微乳13	亚微乳14	亚微乳15	亚微乳16
实验复合物1*	290mg	435mg	580mg	1450mg
大豆磷脂	2.4g	2.4g	2.4g	4.0g
泊洛沙姆(188)	3g	3g	4g	4g
甘油	5g	5g	5g	5g
油混合物**	40ml	40ml	40ml	50ml
注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0090] \* 实验复合物 1 为实施例 1 中制备得到的紫杉醇 / 胆固醇重量比为 1:0.45 的实验复合物 1。

[0092] \*\* 油混合物为大豆油 / 中链油 ( 体积比 1:1 ) 的混合物。

[0093] [ 制备方法 ]

[0094] 同实施例 3。亚微乳的 pH 值调节为  $4.5 \pm 0.5$ 。

[0095] 亚微乳 13- 亚微乳 16, 乳化剂(大豆磷脂)含量分别为亚微乳剂总量的 1.2%(g/ml)、1.2%(g/ml)、1.2%(g/ml) 和 2.0%(g/ml), 助乳化剂泊洛沙姆 (188) 用量为亚微乳剂总量的 1.5%(g/ml)、1.5%(g/ml)、2.0%(g/ml) 和 2.0%(g/ml), 紫杉醇的载药量分别为 1.0mg/ml, 1.5mg/ml, 2.0mg/ml 和 5.0mg/ml。激光粒度测定仪测定, 4 组乳剂平均粒径分别为 145nm, 138nm, 133nm, 146nm

[0096] 实施例 6 : 以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

[0097] [ 处方组成 ]

组分	亚微乳17	亚微乳18	亚微乳19	亚微乳20
实验复合物2*	190mg	380mg	760mg	1520mg
蛋黄卵磷脂	3.0g	3.0g	4.0g	6.0g
泊洛沙姆(188)	4g	4g	6g	6g
甘油	5g	5g	5g	5g
油混合物**	30ml	40ml	50ml	60ml
注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0099] \* 实验复合物 2 为实施例 1 中制备得到的紫杉醇 / 胆固醇重量比为 1:0.90 的实验复合物 2。

[0100] \*\* 油混合物为大豆油 / 中链油 ( 体积比 1:1 ) 的混合物。

[0101] [ 制备方法 ]

[0102] 同实施例 2。其中 pH 值调节为  $5.5 \pm 0.5$ 。

[0103] 亚微乳 17- 亚微乳 20, 乳化剂(蛋黄卵磷脂)含量分别为亚微乳剂总量的 1.5%(g/ml)、1.5%(g/ml)、2.0%(g/ml) 和 3.0%(g/ml), 助乳化剂泊洛沙姆 (188) 用量为亚微乳剂总量的 2.0%(g/ml)、2.0%(g/ml)、3.0%(g/ml) 和 3.0%(g/ml), 的紫杉醇的载药量分别为 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml 和 5.0mg/ml。激光粒度测定仪测定, 4 组乳剂平均粒径分别

为 255nm, 263nm, 285nm, 232nm。

[0104] 实施例 7 :以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的紫杉醇亚微乳剂

[0105] [ 处方组成 ]

	组分	亚微乳21	亚微乳22	亚微乳23	亚微乳24
	实验复合物1*	145mg	290mg	580mg	1160mg
[0106]	脂肪酸甘油酯	3.0g	4.0g	/	/
	聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯	/	/	4.0g	6.0g
	泊洛沙姆(188)	3g	4g	4g	6g
	甘油	5g	5g	5g	5g
[0107]	油酸	0.2g	0.2g	0.2g	0.2g
	油混合物**	30ml	40ml	50ml	50ml
	注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
	总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0108] \*实验复合物 1 为实施例 1 中制备得到的紫杉醇 / 胆固醇重量比为 1:0.45 的实验复合物 1。

[0109] \*\* 油混合物为大豆油 / 中链油 ( 体积比 1:1 ) 的混合物。

[0110] [ 制备方法 ]

[0111] 同实施例 3。

[0112] 亚微乳 21 和 22 中, 脂肪酸甘油酯乳化剂的用量为亚微乳剂总量的 1.5%(g/ml) 和 2.0%(g/ml), 亚微乳 23 和 24 使用聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯为乳化剂、用量为亚微乳剂总量的 2.0%(g/ml) 和 3.0%(g/ml)。亚微乳 21- 亚微乳 24 中, 助乳化剂泊洛沙姆 (188) 的用量为亚微乳剂总量的 1.5%(g/ml)、2.0%(g/ml)、2.0%(g/ml) 和 3.0%(g/ml), 紫杉醇的载药量分别为 0.5mg/ml, 1.0mg/ml, 2.0mg/ml 和 4.0mg/ml。激光粒度测定仪测定, 4 组乳剂平均粒径分别为 145nm, 133nm, 126nm, 158nm。

[0113] 实施例 8 :7- 氢化胆固醇或麦角固醇复合物为中间载体的亚微乳

[0114] [ 处方组成 ]

	组分	亚微乳25	亚微乳26	亚微乳27	亚微乳28
	实验复合物3*	290mg	/	/	/
	实验复合物4*	/	5604mg	/	/
[0115]	实验复合物5*	/	/	292mg	/
	实验复合物6*	/	/	/	5720mg
	大豆磷脂	2.4g	2.4g	2.4g	4.0g
	泊洛沙姆(188)	3g	3g	4g	4g

	甘油	5g	5g	5g	5g
[0116]	油混合物**	40ml	40ml	40ml	50ml
	注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
	总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0117] \* 实验复合物 3~ 实验复合物 6 为实施例 1 中制备得到的紫杉醇 /7- 氢化胆固醇复合物和紫杉醇 / 麦角固醇复合物。

[0118] \*\* 油混合物为大豆油 / 中链油 ( 体积比 1:1 ) 的混合物。

[0119] [ 制备方法 ]

[0120] 同实施例 5。

[0121] 亚微乳 25- 亚微乳 28 中, 紫杉醇的载药量均为 1.0mg/ml。激光粒度测定仪测定, 4 组乳剂平均粒径分别为 143nm, 138nm, 141nm, 132nm。

[0122] 实施例 9 : 以紫杉醇胆固醇复合物为中间载体的干乳剂

[0123] 取实施例 2- 实施例 8 制备的 28 组亚微乳各 50ml, 加入 3% (w/v) 甘露醇搅拌使溶解, 经 0.2 μ m 微孔滤膜过滤, 进行冷冻干燥, 即得干乳剂。

[0124] 试验例

[0125] 试验例 1 : 不同类固醇用量的复合物对亚微乳剂包封率的影响考察

[0126] ▶ 包封率测定方法

[0127] 亚微乳剂中药物总量测定 : 精密量取乳剂 10mL, 置 250mL 容量瓶中, 加入无水乙醇破乳后稀释至刻度, 摇匀, 作为供试液 ; 另精密称取紫杉醇对照品适量, 用无水乙醇溶解并稀释成浓度为 40 μ g/mL 的溶液, 作为对照液。精密量取供试液和对照液各 20 μ L 注入色谱仪, 以 Kromasil-C18 (300mm × 4.6mm, 5 μ m) 为色谱柱, 乙腈 - 水 (54 : 46) 为流动相, 流速 1.0mL/min, 检测波长 230nm, 柱温为室温, 进样量 10 μ L。记录色谱图, 根据峰面积按外标法计算乳剂中紫杉醇浓度和乳剂中的药物总量, 记为 W 总。水相中所含的药物测定 : 取乳剂 10mL, 以 40,000r/min、16℃ 超速离心 4.0h, 使乳剂分层, 自上到下依次为油层、乳化剂层和水溶液层。记录水溶液层的体积, 小心地除去上层油层和乳化剂层后, 小心吸取下层澄清水溶液, 经 0.22 μ m 膜过滤, 取续滤液直接进样, 按上述 HPLC 法测定测定水相中药物浓度, 并根据水相体积计算所含药物的量, 记为 W 水相。

[0128] 油相和油水界面所含的药物总量 : W 油相 + 油水界面 = W 总 - W 水相,

[0129]

$$\text{包封率计算: 包封率} = \frac{W_{\text{油相+油水界面}}}{W_{\text{总}}} \times 100\% = \frac{(W_{\text{总}} - W_{\text{水相}})}{W_{\text{总}}} \times 100\%$$

[0130] ▶ 亚微乳剂 1~ 亚微乳剂 28 的包封率测定结果

[0131] 取实施例 2- 实施例 7 制备的 28 组亚微乳剂, 照上述方法测定并计算包封率, 显示在下表 2 中。结果表明, 当中间载体中的类固醇用量为紫杉醇重量的 0.09~1.86 (其中以胆固醇为脂质材料时, 用量为紫杉醇的 0.45~0.90) 时, 制得的不同载药量的亚微乳剂的包封率均在 90% 以上, 其中载药量低于 2mg/ml 时, 包封率达 95% 以上, 表明游离在水相中的药物较少。



[0132] 表 2 :28 组亚微乳剂的包封率测定结果

[0133]

亚微乳样品号	载药量(mg/ml)	包封率
亚微乳 1	0.5	96.2%
亚微乳 2	1.0	95.1%
亚微乳 3	2.0	95.7%
亚微乳 4	3.0	93.5%
亚微乳 5	0.5	97.7%
亚微乳 6	1.0	96.8%
亚微乳 7	2.0	96.7%
亚微乳 8	4.0	92.6%
亚微乳 9	0.5	98.2%
亚微乳 10	1.0	98.9%
亚微乳 11	2.0	97.6%
亚微乳 12	5.0	91.3%
亚微乳 13	1.0	98.8%
亚微乳 14	1.5	98.1%
亚微乳 15	2.0	97.5%
亚微乳 16	5.0	90.8%
亚微乳 17	0.5	96.5%
亚微乳 18	1.0	96.8%

[0134]

亚微乳 19	2.0	97.2%
亚微乳 20	5.0	90.5%
亚微乳 21	0.5	98.6%

亚微乳 22	1.0	97.1%
亚微乳 23	2.0	97.2%
亚微乳 24	4.0	93.3%
亚微乳 25	1.0	98.9%
亚微乳 26	1.0	97.1%
亚微乳 27	1.0	98.4%
亚微乳 28	1.0	98.2%

[0135] ▶参比亚微乳剂的制备及其包封率测定结果

[0136] 取实施例 1 项下制备的参比复合物 1- 参比复合物 4, 按下述处方制备亚微乳剂 29~ 亚微乳剂 32, 载药量分别为 0.5、1.0、1.0 和 2.0mg/ml, 用于对比研究。

[0137] 具体处方、制备方法及测得的包封率结果如下：

[0138] [ 处方组成 ]

	组分	亚微乳29	亚微乳30	亚微乳31	亚微乳32
	参比复合物1*	655mg	/	/	/
	参比复合物2*	/	1023mg	/	/
	参比复合物3*	/	/	1100mg	/
	参比复合物4*	/	/	/	4024mg
[0139]	蛋黄卵磷脂	3g	3g	3g	3g
	泊洛沙姆188	3g	3g	3g	3g
	甘油	5g	5g	5g	5g
	大豆油	40ml	40ml	50ml	50ml
	注射用水加至	200ml	200ml	200ml	200ml
	总量	200ml	200ml	200ml	200ml

[0140] \* 参比复合物 1、2 分别为实施例 1 中制备得到的紫杉醇 / 磷脂重量比为 1:5.55 和重量比为 1:9.23 的两组参比复合物。

[0141] \* 参比复合物 3、4 分别为实施例 1 中制备得到的胆固醇紫杉醇 / 磷脂重量比为 1:4.50 和 1:9.06 的两组参比复合物；

[0142] [ 制备方法 ]

[0143] 取注射用水约 130-140ml, 按处方量加入蛋黄卵磷脂、泊洛沙姆 (188) 和甘油, 置组织捣碎机中分散, 制成均匀水相, 加热至 40-80℃, 保温；

[0144] 按处方量量取大豆油, 预热至 40-80℃, 称取实施例 1 制备的紫杉醇胆固醇复合物 1, 溶于预热的大豆油中, 置组织捣碎机中分散制成均匀油相；

[0145] 在搅拌条件下, 将水相缓缓加入至油相中, 10000-20000 转 /min 剪切 5-10min, 使

形成均匀初乳,迅速转移至高压均质机中,均质 6 次,收集全部乳液,用 0.1mol/L 盐酸调节 pH 至  $4.5 \pm 0.5$ ,并加水至 200ml,摇匀,分装,115°C 25 灭菌 30 分钟,即得。

[0146] [包封率测定]

[0147] 取亚微乳剂 29 至亚微乳剂 32,照上述包封率测定方法依法测定,包封率在 65.7%~84.5%,详见下表 3。

[0148] 表 3:参比亚微乳剂(亚微乳 29~亚微乳 32)的包封率测定结果

[0149]

参比亚微乳样品	包封率测定结果
亚微乳 29	75.1%
亚微乳 30	65.7%
亚微乳 31	84.5%
亚微乳 32	83.2%

[0150] 试验例 2:亚微乳剂的稳定性考察

[0151] 取实施例 2- 实施例 8 制备的 28 组亚微乳剂(下表中标记为乳剂 1~28)和试验例 1 制备的 4 组参比亚微乳剂(下表中标记为乳剂 29~乳剂 32),分别于 4°C 条件下贮存 12 个月,于 0、6、12 个月取样考察,照如下方法考察外观、粒径、含量及杂质变化。

[0152] 性状:目视法,按实物描述亚微乳剂的颜色,记录表面是否有油滴或分层现象。

[0153] 粒径:取亚微乳剂,采用 MASTER SIZER 2000 激光粒度测定仪(MALVERN)测定粒径。

[0154] 含量及有关物质:精密量取紫杉醇亚微乳剂适量,加无水乙醇破乳,制备 10 备合适浓度的供试溶液。精密量取供试液 20  $\mu$ L 注入色谱仪,照 HPLC 法,以 Kromasil-C18(300mm $\times$ 4.6mm,5  $\mu$ m) 为色谱柱,乙腈-水(54:46)为流动相,流速 1.0mL/min,检测波长 230nm,柱温为室温,依法测定,记录色谱图,根据峰面积按外标法计算乳剂中药物含量,按归一化法计算杂质含量。

[0155] 测定结果:详见下表。

[0156] 表 4 亚微乳剂稳定性比较结果

[0157]

样品号/载药量	初始 (制备后一周内测定)				4℃贮存 12 个月			
	外观	粒径	含量	杂质	均匀乳	粒径	含量	杂质
乳剂 1/0.5 mg/ml	均匀乳	225nm	100.2%	0.33%	均匀乳	221nm	99.7%	0.67%
乳剂 2/1.0mg/ml	均匀乳	233nm	97.6%	0.31%	均匀乳	245nm	97.3%	0.62%
乳剂 3/2.0mg/ml	均匀乳	245nm	98.5%	0.31%	均匀乳	236nm	98.2%	0.64%
乳剂 4/3.0mg/ml	均匀乳	230nm	97.6%	0.37%	均匀乳	237nm	97.0%	0.93%
乳剂 5/0.5mg/ml	均匀乳	246nm	99.5%	0.35%	均匀乳	228nm	98.8%	0.52%
乳剂 6/1.0mg/ml	均匀乳	262nm	100.3%	0.30%	均匀乳	255nm	99.5%	0.61%
乳剂 7/2.0mg/ml	均匀乳	231nm	98.1%	0.36%	均匀乳	240nm	98.6%	0.57%
乳剂 8/4.0mg/ml	均匀乳	242nm	99.6%	0.42%	均匀乳	251nm	97.3%	1.01%
乳剂 9/0.5mg/ml	均匀乳	165nm	98.8%	0.35%	均匀乳	126nm	99.2%	0.56%
乳剂 10/1.0mg/ml	均匀乳	153nm	101.6%	0.30%	均匀乳	133nm	100.7%	0.52%
乳剂 11/2.0mg/ml	均匀乳	127nm	102.2%	0.32%	均匀乳	131nm	100.9%	0.55%
乳剂 12/5.0mg/ml	均匀乳	138nm	99.8%	0.45%	均匀乳	155nm	99.4%	1.24%
乳剂 13/1.0mg/ml	均匀乳	145nm	97.4%	0.31%	均匀乳	138nm	98.0%	0.57%

[0158]

乳剂 14/1.5mg/ ml	均匀乳	138nm	100.3%	0.35%	均匀乳	136nm	98.7%	0.65%
乳剂 15 /2.0mg/ml	均匀乳	133nm	99.2%	0.31%	均匀乳	137nm	98.5%	0.63%
乳剂 16/5.0mg/ ml	均匀乳	146nm	98.5%	0.43%	均匀乳	173nm	97.2%	1.68%
乳剂 17 /0.5mg/ml	均匀乳	255nm	97.8%	0.32%	均匀乳	244nm	97.6%	0.57%
乳剂 18/1.0mg/ ml	均匀乳	263nm	99.2%	0.36%	均匀乳	259nm	99.5%	0.53%
乳剂 19/2.0mg/ ml	均匀乳	285nm	100.4%	0.33%	均匀乳	272nm	98.8%	0.61%
乳剂 20/5.0mg/ ml	均匀乳	232nm	101.4%	0.48%	均匀乳	258nm	97.8%	1.76%
乳剂 21/0.5mg/ ml	均匀乳	145nm	98.7%	0.36%	均匀乳	136nm	99.1%	0.59%
乳剂 22 /1.0mg/ml	均匀乳	133nm	98.2%	0.32%	均匀乳	127nm	97.6%	0.57%
乳剂 23/2.0mg/ ml	均匀乳	126nm	101.1%	0.38%	均匀乳	134nm	99.5%	0.56%
乳剂 24/4.0mg/ ml	均匀乳	158nm	98.8%	0.41%	均匀乳	163nm	97.9%	1.25%
乳剂 25/1.0mg/ ml	均匀乳	143nm	99.5%	0.33%	均匀乳	128nm	98.9%	0.56%
乳剂 26/1.0mg/ ml	均匀乳	138nm	97.8%	0.35%	均匀乳	132nm	97.4%	0.58%
乳剂 27/1.0mg/ ml	均匀乳	141nm	99.4%	0.30%	均匀乳	145nm	99.1%	0.61%
乳剂 28/1.0mg/ ml	均匀乳	132nm	98.6%	0.36%	均匀乳	126nm	98.2%	0.54%
乳剂 29/0.5mg/ ml	均匀乳	253nm	97.5%	0.92%	分层漂油	323nm	90.8%	7.63%

[0159]	乳剂	分层	522nm	93.2%	6.27%	油水分离	未测	未测	未测
	30/1.0mg/ml								
	乳剂	均匀乳	247nm	98.6%	0.62%	均匀乳	263nm	94.7%	3.58%
	31/1.0mg/ml								
	乳剂	均匀乳	266nm	98.9%	0.78%	轻微分层	311nm	92.8%	4.64%
	32/2.0mg/ml								

[0160] 以本发明的类固醇复合物为中间载体制备的亚微乳 1 ~ 亚微乳 28, 经冰箱(4℃)贮存 12 个月后, 与初始相比, 1) 载药量为 5.0mg/ml 的乳剂平均粒径有增加趋势, 但未见分层, 外观和含量均无明显变化, 杂质虽有增加但未超过 2.0%; 2) 载药量为 4.0mg/ml 的乳剂未见分层, 粒径、外观和含量均无明显变化, 杂质虽有增加但未超过 1.3%; 3) 载药量 3mg/ml 的乳剂未见分层, 粒径、外观及含量均无明显变化, 杂质未超过 1.0%; 4) 载药量为 2mg/ml 或以下时, 外观性状、粒径和含量均无明显变化, 杂质水平低于 0.7%。

[0161] 以参比的紫杉醇 / 磷脂复合物为中间载体, 1) 当载药量为 0.5mg/ml 时可形成均匀乳剂(亚微乳剂 29), 放置至 6 个月时外观和粒径均无明显变化, 杂质增加至 3.0%, 但放置至 12 个月后粒径显著增大, 杂质水平已高达 7% 以上, 含量明显下降, 且出现分层和漂油现象; 2) 当载药量增加到 1.0mg/ml 时, 不能形成均匀乳剂(亚微乳剂 30), 初始时即能观察到药物结晶和油滴存在。

[0162] 以参比的紫杉醇 / 胆固醇复合物为中间载体, 当载药量为 1.0mg/ml 和 2.0mg/ml 时均可形成均匀乳剂(亚微乳 31~32), 1) 放置至 6 个月时, 两种载药量的乳剂其外观、粒径、含量均无明显变化, 杂质虽有升高, 但均未超过 1.5%; 2) 贮存至 12 个月后, 两种载药量的乳剂粒径增大, 含量有下降趋势, 杂质分别上升到 3.58% 和 4.64%, 其中载药量为 2.0mg/ml 的乳剂还出现轻微分层现象。

[0163] 试验例 3: 紫杉醇亚微乳剂致敏性试验

[0164] 试验药物:

[0165] 受试药物溶液: 实施例 5 制得的亚微乳剂 14;

[0166] 参比制剂溶液: 市售紫杉醇注射液“紫素”(规格为 5ml : 30mg), 临用前用生理盐水稀释制成含紫杉醇浓度为 2mg/ml 的溶液;

[0167] 阳性对照药溶液: 1.0% 的卵白蛋白;

[0168] 空白乳剂溶液: 根据实施例 5 的亚微乳剂 14 处方组成, 不加入紫杉醇胆固醇复合物, 制备空白乳剂;

[0169] 空白溶媒: Cremophor EL 与无水乙醇按 1:1 (v/v) 混合, 即得(模拟市售紫杉醇注射液的处方, 其中不加入紫杉醇), 临用时用生理盐水稀释 3 倍;

[0170] 试验动物:

[0171] 豚鼠, 体重 300g ± 20g, 雌雄各半。

[0172] 试验方法:

[0173] 取健康豚鼠 30 只, 体重 300g ± 20g, 随机分成 5 组, 每组 6 只, 雌雄各半。试验开始前, 动物预先饲养 1 周以观察其活动表现。各组豚鼠隔日腹腔注射受试药物溶液(亚微乳剂组)、参比制剂溶液(参比制剂组)、阳性对照溶液(阳性对照组)、空白乳剂(空白乳剂

组)和空白溶媒(空白溶媒组)各 0.3ml,共注射 3 次,使其致敏,其中受试药物组的紫杉醇剂量为 2mg/kg;于最后一次给药后第 12d,各组动物分别静脉注射受试药物溶液、参比制剂溶液、阳性对照溶液、空白乳剂和空白溶媒各 1.0ml,进行激发,其中受试药物组的紫杉醇激发剂量为 6mg/kg。观察各组豚鼠在静脉注射后的动物的反应,结果见下表。

[0174] 表 5:紫杉醇亚微乳过敏性试验

分组	症状	结果
1) 参比制剂组	搔鼻, 颤抖, 竖毛, 呼吸急促, 步态不稳, 呼吸困难, 痉挛, 旋转, 四肢无力	强阳性
2) 亚微乳剂组	动物均活动正常。	阴性
3) 空白溶媒组	步态不稳, 呼吸困难, 痉挛, 旋转, 四肢无力	强阳性
4) 空白乳剂组	动物均活动正常。	阴性
5) 阳性对照组	搔鼻, 呼吸急促, 排粪, 步态不稳, 喘息, 痉挛, 旋转	强阳性

[0176] 结果表明,市售紫杉醇注射液及其空白溶媒组均出现强过敏反应,而紫杉醇亚微乳剂及空白亚微乳剂组均无明显的过敏反应症状。

[0177] 试验例 4:紫杉醇亚微乳剂急性毒性评价

[0178] 试验药物:亚微乳受试溶液,取实施例 5 制得的亚微乳剂 14;参比制剂溶液为市售含 Cremophor EL 的紫杉醇注射液(规格为 5ml:30mg),临用前用生理盐水稀释制成含紫杉醇浓度为 2mg/ml 的溶液;

[0179] 试验动物:昆明种小鼠 70 只,♀,体重 20±2g(中国医学科学院实验动物所)。

[0180] 试验方法:小鼠按体重随机分成 7 组,每组 10 只,按如下方案给药:

[0181] 组 1:参比制剂溶液,25mg/kg 剂量单次给药;

[0182] 组 2:参比制剂溶液,29mg/kg 剂量单次给药;

[0183] 组 3:参比制剂溶液,29mg/kg 剂量给药后间隔 4 天重复给药一次;

[0184] 组 4:亚微乳受试溶液,29mg/kg 剂量连续 2 天给药;

[0185] 组 5:亚微乳受试溶液,29mg/kg 剂量连续 3 天给药;

[0186] 组 6:亚微乳受试溶液,29mg/kg 剂量给药后间隔 4 天重复给药一次;

[0187] 组 7:亚微乳受试溶液,按 44mg/kg 剂量单次给药。

[0188] 毒性结果见下表,体重变化曲线见附图 2。

[0189] 表 6 急性毒性试验结果

药物	症状	结果
[0190] 1)参比制剂 (组1-组3)	数次跳跃,呼吸急促或暂停,瘫软无力,闭目,俯卧不动,部分出现抽搐颤抖。5~20min后开始缓解,但仍有不能站立,步态不稳等现象并持续数小时。动物给药后数日内可见体重下降,毛色晦暗	组(1) 1只小鼠死亡 组(2) 1只小鼠死亡 组(3) 2只小鼠死亡
2)亚微乳剂 (组4-组7)	无明显即时反应。给药后数日内小鼠体重减轻,与给药剂量明显相关。给药总量较大的小鼠亦可见毛色晦暗等表现。	各组均无动物死亡

[0191] 组1、组2和组3的结果显示,参比制剂给药后出现明显的毒性,其中组1和组2均有1只动物死亡,组3有2只动物死亡。组4-组7的亚微乳剂组,均无明显即时反应,无动物死亡。

[0192] 组1和组7均为单次给药,但组7的剂量是组1的1.765倍,而组7出现的毒性明显低于组1,由此表明,紫杉醇制成亚微乳后,与参比制剂(市售注射液)相比,毒性降低、耐受剂量增加。

[0193] 试验例5:紫杉醇亚微乳剂最大耐受剂量(MTD)考察

[0194] 试验动物:裸鼠

[0195] 试验样品:

[0196] 市售含Cremophor EL的普通注射剂,设20、30、45mg/kg共3个剂量组;

[0197] 实施例5制得的亚微乳剂14,设30、45、67.5、101.25mg/kg共4个剂量组;

[0198] 试验方法:静脉注射,每4天给药一次,间隔给药3次。自给药开始至最后一次给药后一周,观察动物即时反应及死亡情况,将无动物死亡的剂量记为最大耐受剂量(MTD),结果如下:

[0199] 表7:裸鼠最大耐受剂量考察结果

受试药物	剂量 (mg/kg)	动物数	死亡数	MTD
普通注射剂	20	10	0	20 mg/kg
	30	10	1	
	45	5	3	
亚微乳剂	30	10	0	45 mg/kg
	45	10	0	
	67.5	8	1	
	101.25	8	2	

[0201] 普通注射液 MTD 为 20mg/kg,而亚微乳剂则为 45mg/kg。相者相比,亚微乳 MTD 提高至 2.25 倍,与文献报道的注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒相近。

[0202] 试验例6:紫杉醇亚微乳剂对肿瘤的生长抑制作用



[0203] 试验目的:观察比较紫杉醇亚微乳剂在最大耐受剂量下对人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠异种移植性肿瘤的生长抑制作用,并与注射用白蛋白紫杉醇纳米粒及市售普通注射液(紫素)进行比较。

[0204] 试验药物:

[0205] 1) 实施例 5 制得的紫亚微乳剂 14;

[0206] 2) 市售紫杉醇普通注射液(紫素,北京协和药厂),批号 100102,规格 30mg/5ml;

[0207] 3) 注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒(图标为注射用紫杉醇),美国医药伙伴公司产品,批号 205133,规格 100mg/1g;

[0208] 分组方案:

[0209] 设阴性对照组,紫杉醇普通注射液组,白蛋白纳米粒组,紫杉醇亚微乳组

[0210] 紫素注射液组,剂量为 20mg/kg/次,

[0211] 紫杉醇亚微乳剂组,剂量为 45mg/kg/次和 67.5mg/kg/次,

[0212] 注射用白蛋白纳米粒组,剂量为 45mg/kg/次。

[0213] 动物模型:

[0214] 人乳腺癌 MDA-MB-231 裸鼠异种移植性肿瘤模型,

[0215] 荷瘤鼠引自北京中美冠科生物技术(北京)有限公司

[0216] 实验过程及观察方法:

[0217] 选择肿瘤生长良好,全身状况较好的荷 MDA-MB-231 肿瘤动物,颈椎脱臼处死。无菌条件下取出瘤块,选择较好之组织,用手术刀切割成直径 2-3mm 的瘤块,套管针接种于裸小鼠腋后皮下。接种后肿瘤自然生长。

[0218] 待荷瘤鼠肿瘤平均体积生长至  $110\sim 120\text{mm}^3$ ,按瘤体体积大小分层分组,每组 7 只动物。除阴性对照组小鼠肿瘤自然生长外,其他各组按设计剂量,每 4 天尾静脉注射给药 1 次。(其中紫杉醇亚微乳 67.5mg/kg 组在每次给药时先按总量静脉注射 1/2,间隔 1-2h 后再注射另外 1/2。)各药品组均间断给药 3 次。

[0219] 设分组给药当日记为零天(D0),实验过程中,每 3 天检测受试动物肿瘤及体重变化 1 次。

[0220] 实验第 25 天(D25),在经过 3 次给药,动物肿瘤生长明显抑制,各给药组瘤体积检测值等于或小于分组给药时大小的情况下,先行处死已荷瘤较大的阴性对照组动物,对其他给药各组肿瘤生长情况继续观察比较。

[0221] 实验第 45 天(D45),紫素注射液 20mg/kg 组动物平均瘤体积接近  $1500\text{mm}^3$ ,处死该组小鼠。

[0222] 实验第 53 天(D53),注射用白蛋白结合型紫杉醇纳米粒 45mg/kg 组动物平均瘤体积达  $1700\text{mm}^3$  大小,处死该组小鼠。

[0223] 实验第 80 天(D80),结束实验,此时紫杉醇亚微乳剂 45mg/kg 剂量组动物平均瘤体积仅为  $198\text{mm}^3$  大小,而 67.5mg/kg 给药组动物肿瘤全部消失,未见复发。

[0224] 结论:综上所述,在 MTD 剂量条件下,市售紫杉醇普通注射液 20mg/kg、紫杉醇亚微乳剂 45mg/kg 和注射用白蛋白紫杉醇纳米粒 45mg/kg,3 组均显示了 98% 以上的抑瘤率,但 3 组药品对肿瘤生长速度的抑制作用有显著差异。

[0225] 至给药后第 25 天,紫杉醇普通注射液和注射用白蛋白紫杉醇纳米粒试验组的动

物相对肿瘤体积分别为 1.41 和 0.92,而紫杉醇亚微乳剂肿瘤几乎消失,相对肿瘤体积仅为 0.06。

[0226] 至给药后第 45 天时,普通注射液组肿瘤快速生长,相对肿瘤体积已达至 14.3 (此时处死);注射用白蛋白纳米粒肿瘤生长速度显著慢于普通射液,但相对相对肿瘤体积也达到 6.5;而紫杉醇亚微乳剂肿瘤体积几乎无明显增长,相对肿瘤体积仅 0.11。

[0227] 至第 53 天,注射用白蛋白纳米粒相对肿瘤体积已增至 12.5 ((此时处死),而紫杉醇亚微乳剂相对肿瘤体积仅 0.26。

[0228] 至给药后第 80 天,紫杉醇亚微乳剂组相对肿瘤体积仅 1.83。由于该组肿瘤生长速度极为缓慢,因此停止实验观察,处死该组动物。

[0229] 表 8 :第 25 天(D25) 肿瘤体积及荷瘤状况

[0230]

组别	瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (RTV)	T/C (%)	荷瘤状况	
	开始	D25			瘤/鼠	荷瘤率
阴性对照组	110±62.4 152±1080.8		37.90±17.32		7/7	100%
普通注射液 (紫素) 20mg/kg	119±55.7	165±192.2	1.41±1.170	3.72	7/7	100%
注射用白蛋白纳 米 粒 45mg/kg	114±32.3	158±178.4	0.92±1.102	2.42	5/7	71.4%
紫杉醇亚微乳剂 45mg/kg 67.5mg/kg	116±61.0	8±13.8	0.06±0.074	0.15	5/7	71.4%
	1122±60.1	6±4.8	0.08±0.063	0.21	4/7-3*	100%

[0231] \*注 :给药过程中该剂量组有 3 只动物死亡,剩下 4 只动物。以下同。

[0232] 表 9 :第 45 天(D45) 肿瘤体积及荷瘤状况

[0233]

组别	瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (RTV)	荷瘤状况	
	开始	D45		瘤 / 鼠	荷瘤率
普通注射液 (紫素) 20mg/kg	119±55.7	1491±1305.3	14.34±12.26	7/7	100%
注射用白蛋白纳 米 粒 45mg/kg	114±32.3	917±873.4	6.53±5.730	5/7	71.4%

[0234]

紫杉醇亚微乳剂 45mg/kg	116±61.0	12±14.2	0.11±0.154	3/7	42.9%
	1122±60.1	0	0	0/7-3*	0
67.5mg/kg					

[0235] 表 10 :第 53 天(D53) 肿瘤体积及荷瘤状况

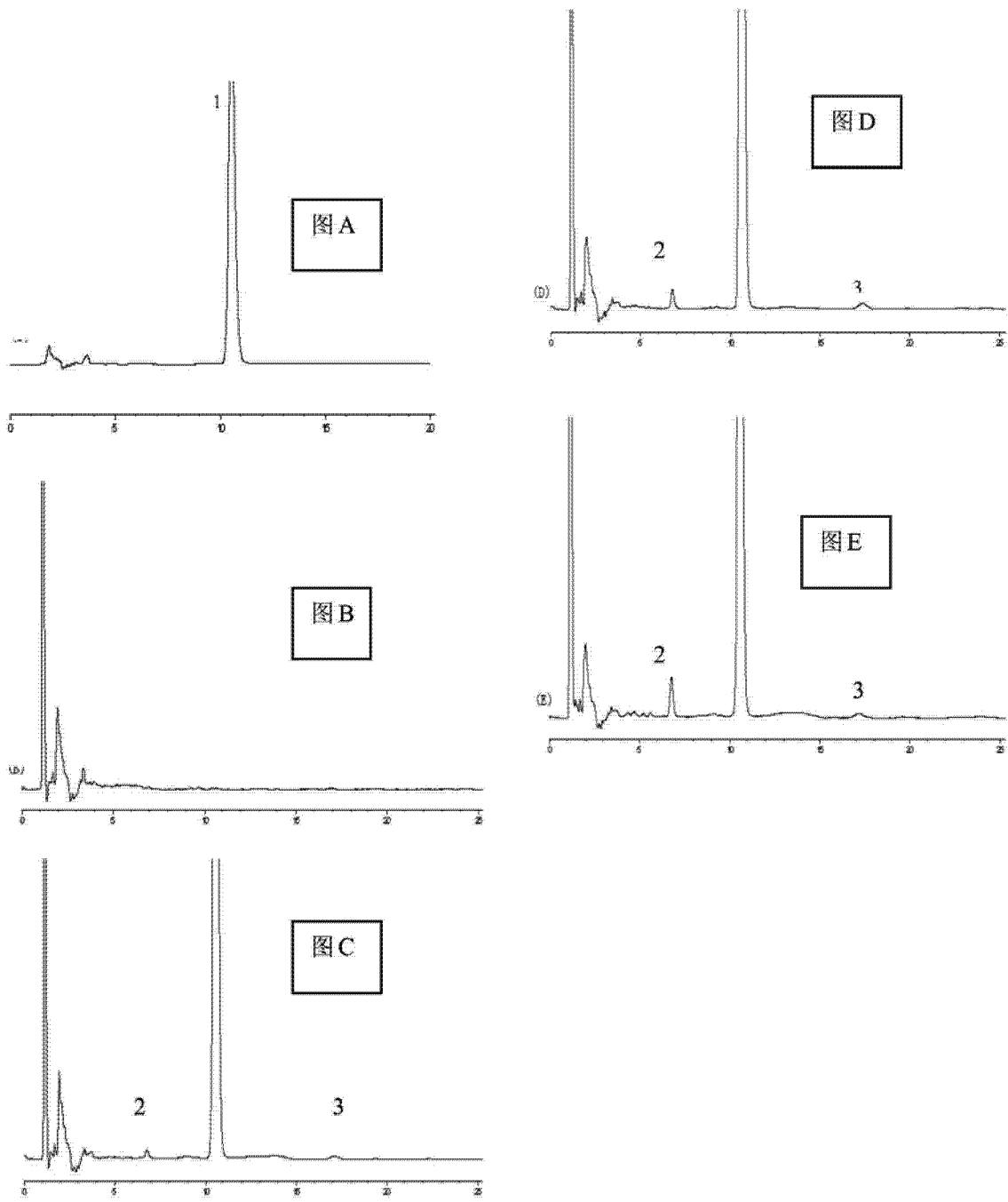
[0236]

组别	瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (RTV)	荷瘤状况	
	开始	D45		瘤 / 鼠	荷瘤率
注射用白蛋白纳 米 粒 45mg/kg	114±32.3	1706±1499.4	12.51 ± 10.745	5/7	71.4%
紫杉醇亚微乳剂 45mg/kg	116±61.0	23±43.6	0.26±0.582	2/7	28.6%
67.5mg/kg	1122±60.1	0	0	0/7-3*	0

[0237] 表 11 :第 80 天(D80) 肿瘤体积及荷瘤状况

[0238]

组别	瘤体积 (mm <sup>3</sup> )		相对肿瘤体积 (RTV)	荷瘤状况	
	开始	D80		瘤 / 鼠	荷瘤率
紫杉醇亚微乳剂组 45mg/kg	116±61.0		1.83±3.624	2/7	28.6%
67.5mg/kg	198±317.1		0	0/7-3	0
	1122±60.1	0			



1

图 1

紫杉醇亚微球乳剂对MDA-MB-231肿瘤抑制作用

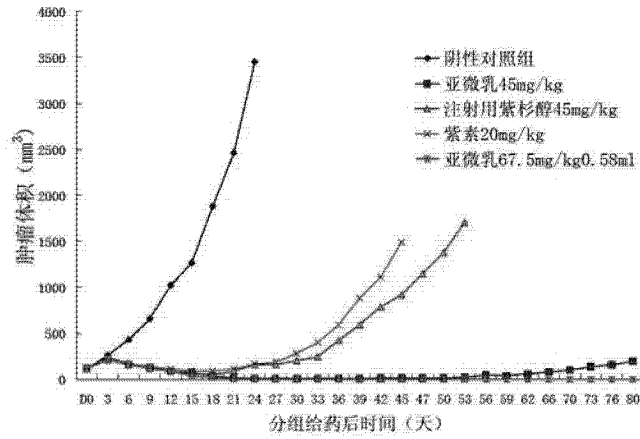


图 2

紫杉醇亚微球乳剂给药后MDA-MB-231模型鼠荷瘤变化

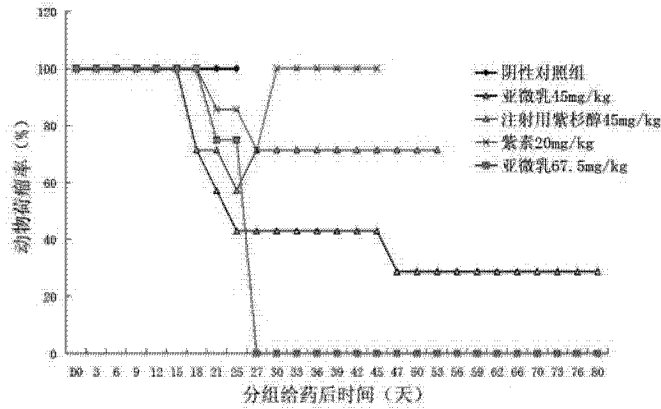


图 3

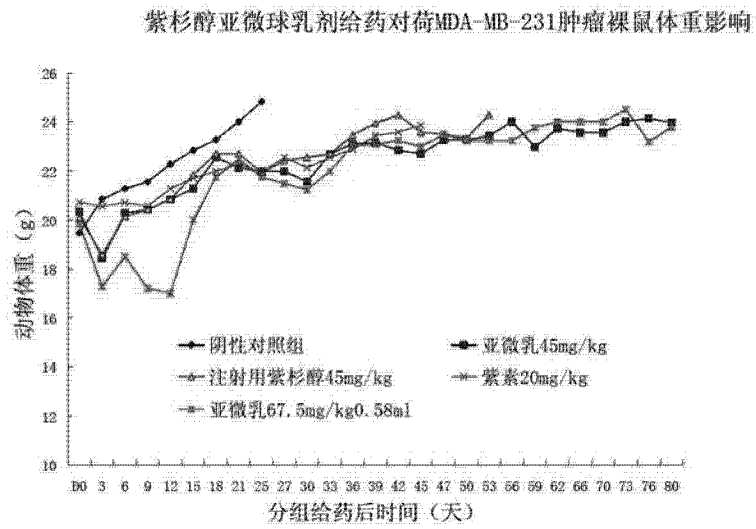


图 4