

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810037775.0

[51] Int. Cl.

A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 47/24 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年11月25日

[11] 公开号 CN 101584662A

[22] 申请日 2008.5.21

[21] 申请号 200810037775.0

[71] 申请人 中国科学院上海药物研究所
地址 200031 上海市太原路294号

[72] 发明人 李亚平 陈伶俐 顾王文

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司
代理人 朱梅 黄丽娟

权利要求书4页 说明书20页 附图1页

[54] 发明名称

依托泊甙脂质体及其制备方法

[57] 摘要

本发明提供一种可用于注射或口服的依托泊甙脂质体。它的特点是用磷脂类物质包封依托泊甙，制得粒径小、包封率高、稳定性好、毒副作用低的依托泊甙脂质体。本发明制备的依托泊甙脂质体提高了依托泊甙的溶解度和稳定性，并降低其毒性，延长药物在血液中的循环时间，从而提高了药物的疗效，使本脂质体制成的制剂在临床应用上具有低毒性、低过敏性和高效性的特点。本发明还涉及依托泊甙脂质体的制备方法，该制备工艺简单、成本低廉，适合工业化生产。

1、一种依托泊甙脂质体，其特征在于，由包含以下重量份的原料制备而成：

依托泊甙	1-10 份
磷脂类物质	1-100 份
固醇	0-50 份
附加剂	0-50 份

2、根据权利要求 1 所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，由包含以下重量份的原料制备而成：

依托泊甙	1 份
磷脂类物质	2-30 份
固醇	0-10 份
附加剂	0-10 份

3、根据权利要求 1 所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述原料进一步包含 0.1-50 重量份的修饰材料。

4、根据权利要求 1-3 中任意一项所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述的磷脂类物质选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酸、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、卵磷脂、大豆磷脂、氢化大豆磷脂、氢化卵磷脂、脑磷脂和心磷脂及其混合物；所述的固醇选自胆固醇、二氢胆固醇、大豆甾醇、大豆甾醇和麦角固醇；

所述的附加剂包括抗氧化剂、表面活性剂和稳定剂；其中所述抗氧化剂选自维生素 E、维生素 E 酯、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、

硫代硫酸钠、没食子酸丙酯、叔丁基对羟基茴香醚、二叔丁基对甲酚、半胱氨酸和蛋氨酸中的一种或多种，所述表面活性剂选自脱氧胆酸盐、胆酸盐、脱氧胆酸、牛磺胆酸盐、胆酸、吐温-80、泊洛沙姆、汴泽和司盘中的一种或多种，所述稳定剂选自硬脂胺、磷脂酸、十四酸、油酸和甘油中的一种或多种。

5、根据权利要求4所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述的磷脂类物质选自卵磷脂、大豆磷脂、脑磷脂和心磷脂及其混合物；所述的固醇为胆固醇。

6、根据权利要求3所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述的修饰材料包括聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、神经节鞘酯、聚丙烯酰胺、壳聚糖和聚乙二醇-磷脂衍生物或它们的混合物；其中所述的聚乙二醇-磷脂衍生物选自聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二棕榈酰磷脂酰胆碱、聚乙二醇-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-氢化大豆磷脂酰乙醇胺和聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰胆碱；其中所述聚乙二醇的平均分子量为200-20000。

7、根据权利要求6所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述的聚乙二醇平均分子量为2000-5000。

8、根据权利要求1-3中任意一项所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述脂质体的粒径小于1000nm。

9、根据权利要求1-3中任意一项所述的依托泊甙脂质体，其特征在于，所述脂质体的粒径小于500nm。

10、权利要求1或2所述的依托泊甙脂质体的制备方法，其特征在于，采用下述不同方法中的任意一种：

1) 薄膜分散法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂按比例溶于有机溶剂，并在20-60℃下减压挥去有机溶剂，形成薄膜，

然后加入含水溶性附加剂的水相介质水合，超声或高压均质后即得依托泊甙脂质体；或

2) 注入法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂溶于适量有机溶剂中制成脂质溶液，吸取该溶液缓缓注入 20-60℃ 含水溶性附加剂的水相介质，注入完毕继续搅拌去除有机溶剂，然后进行超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体；或

3) 逆向蒸发法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂按比例溶于有机溶剂，加入含水溶性附加剂的水相介质，进行超声或高速剪切使形成稳定的 W/O 型初乳，减压蒸去有机溶剂，加入水相介质，旋转帮助器壁上的凝胶脱落，然后在减压下继续蒸发，制得水性混悬液，然后进行超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体；或

4) 熔融法：按比例称取依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂于 60-80℃ 加热熔融，加入含水溶性附加剂的水相介质混合，然后进行超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体；

上述制备方法中，所述的水相介质为注射用水、磷酸盐缓冲液、枸橼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、生理盐水溶液、甘露醇溶液或葡萄糖溶液，且上述缓冲液的 pH 为 4-8；所述的有机溶剂选自乙醇、甲醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和二氯甲烷及其混合物。

11、根据权利要求 10 所述的依托泊甙脂质体的制备方法，其特征在于，在磷脂类物质的溶解或熔融过程或水相介质的配制过程中进一步加入修饰材料。

12、一种依托泊甙脂质体固体制剂，其特征在于，该固体制剂是权利要求 1-3 中的依托泊甙脂质体加入支架剂并采用冷冻干燥或喷雾干燥的工艺制成的。

13、根据权利要求 12 所述的依托泊甙脂质体固体制剂，其特征在于，所述的支架剂选自甘氨酸、丝氨酸、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖、海藻糖、麦芽糖、阿拉伯胶、木糖醇、山梨醇、果糖、右旋糖苷、氯化钠和白蛋白及其混合物，并且其用量按磷脂类物质重量比计算为 1 份磷脂加 0.1-4 份。

14、一种依托泊甙注射剂或口服制剂，其特征在于，是由权利要求 1-3 中的依托泊甙脂质体制备而成的。

依托泊甙脂质体及其制备方法

技术领域

本发明属于药剂学领域，具体涉及含有抗肿瘤活性成分依托泊甙的脂质体，以及该脂质体的制备方法。

背景技术

肿瘤是一种常见病与多发病，对人民的生命健康威胁很大，在医学领域中是越来越受到重视的研究课题。全世界每年死于癌症者700万以上，现在癌症患者约3700万。在我国，每年约有130万人死于肿瘤，估计发病率在180-200万之间，总的发病率在不断上升。在我国多个大城市中，恶性肿瘤已超过心脑血管疾病，排在所有疾病死亡原因的第一位，而在35-59岁年龄段，肿瘤一直是第一杀手。由于过去许多威胁人民生命健康的烈性传染病得到了控制，人均寿命逐渐延长，诊断技术不断提高，但是人类环境中的致癌因素日渐增多，因此在很多国家，癌症居死亡原因首位或第二位。

目前肿瘤的治疗有手术、放疗、化疗，很大程度上以化疗为主。手术与放疗的顺应性差，而化疗又会给患者带来极大的毒副作用，在抑制和毒害增生活跃的肿瘤细胞的同时，对骨髓细胞、肠上皮细胞、毛发细胞、生殖细胞也同样产生抑制作用，同时容易产生耐药性而失去治疗作用。随着社会经济的发展和人民生活水平的提高，人们对生命、生活质量的要求也在不断提高，高效低毒抗肿瘤药物的出现也是众望所归。

依托泊甙为鬼臼毒素的糖代谢产物，属于细胞周期特异性抗肿瘤药物，具有广谱抗癌活性和相当高的治疗指数，主要用于治疗肺癌、

淋巴瘤、急性白血病、睾丸癌，尤其对早期扩散、预后恶劣的小细胞癌症效果良好，是治疗小细胞肺癌和睾丸癌的最强活性单体。依托泊甙通过抑制哺乳类动物DNA拓扑异构酶II的活性发挥抗肿瘤效应，是拓扑异构酶的嵌入性抑制剂，它作用于DNA拓扑酶，使单链或双链DNA断裂，双链DNA断裂数是单链断裂数的2-3倍，这表明细胞毒性机制是该药的作用机制，这使该药的毒副作用也很大，其主要毒性为骨髓抑制、嗜中性白细胞的严重减少、恶心呕吐等消化道毒性、过敏反应如寒战、发热、心动过速、支气管痉挛、呼吸困难和低血压等。

目前，用于临床的依托泊甙有两种剂型：注射液和口服软胶囊，剂量为每支50-100mg和每粒50-100mg。血管给药的剂量是每3-5天 $300-600\text{mg}/\text{m}^2$ 。临床上使用的注射液是采用无水乙醇及聚乙二醇400等助溶剂制备的非水溶液系统，患者用药后对血管刺激性大，且聚乙二醇易透过人红细胞膜使红细胞变性和溶血，易引起血压下降或支气管痉挛，甚至可致死亡；该注射液静脉给药时，一般先用生理盐水稀释，由于其在5%葡萄糖溶液中不稳定，可能析出形成微细沉淀，造成病人局部血管堵塞；口服软胶囊的应用限于非急症患者，其绝对生物利用度低，仅50%，血中浓度仅为静脉注射的 $52 \pm 8\%$ ，不同患者之间口服生物利用度差异大（25%-75%），主要原因是依托泊甙的水溶性差及在酸性和碱性介质中分解成无活性产物，为延长有效血药浓度，势必要增加服药次数或增大服药剂量，导致毒副作用增加。

为使依托泊甙更好发挥临床疗效，提高其抗肿瘤活性和稳定性，降低其毒副作用，国内外药学工作者致力于依托泊甙新给药系统的研究和开发。中国专利文献（申请号：200610109406.9）公开了依托泊甙静脉注射乳剂，获得高生物利用度和抗肿瘤效果；唐星等人（申请号：200610169149.8）将依托泊甙包裹于油相和界面膜中制备成依托泊甙脂

微球注射液，提高了依托泊甙的稳定性，降低了其血管刺激性及毒性，增强其疗效；中国专利文献（申请号：200410101404.6）公开了一种依托泊甙的药物组合物，含有机酸、聚乙二醇、丙二醇、赋性剂，将此药物组合物制备成冻干粉针，增强了依托泊甙的稳定性，改善现有剂型的不足；也有单位研制了依托泊甙的肠溶缓控释固体分散体制剂（专利号：ZL02153962.6），该制剂临床疗效好，毒副反应低，口服生物利用度高。尽管对依托泊甙制剂的研究取得了长足进展，但目前这些新剂型多数处于实验室的研究阶段，大都不符合用药的安全性和工业化生产的要求，至今未见上临床、上市的报道。因此，急需寻求一种有效的制剂，提高药物的稳定性、溶解度及抗肿瘤效果，减少药物的血管刺激性和毒副作用，增强依托泊甙的临床应用性。

发明内容

本发明的一个目的在于提供一种性质稳定且可采用现有技术工业化生产的依托泊甙脂质体。本发明增加了依托泊甙的水溶性和稳定性，阻止药物析出晶体，既能消除市售制剂的血管刺激性，减少依托泊甙自身的毒性反应，又能提高依托泊甙的生物利用度及其治疗指数；

本发明的另一目的是提供上述依托泊甙脂质体的制备方法，且制备方法灵活多样，均采用常规的工艺设备，可工业化规模、高效率生产，产品质量保持稳定，可直接或二次加工制备注射或口服制剂。

本发明的又一目的是提供一种依托泊甙脂质体固体制剂，该固体制剂是上述依托泊甙脂质体加入支架剂并采用冷冻干燥或喷雾干燥的工艺制成的。

本发明的再一目的是提供一种依托泊甙注射剂或口服制剂，其是由上述的依托泊甙脂质体制备而成的。

本发明所述的依托泊甙脂质体，由包含以下重量份的原料制备而

成:

依托泊甙	1-10份
磷脂类物质	1-100份
固醇	0-50份
附加剂	0-50份

优选地, 上述的依托泊甙脂质体, 由包含以下重量份的原料制备而成:

依托泊甙	1份
磷脂类物质	2-30份
固醇	0-10份
附加剂	0-10份

进一步地, 上述依托泊甙脂质体的原料还可包含修饰材料0.1-50重量份。当脂质体原料中含有上述的修饰材料时, 即为依托泊甙长循环脂质体。

上述的磷脂类物质选自磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰甘油、二月桂酰磷脂酰胆碱、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰胆碱、二硬脂酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酰甘油、二棕榈酰磷脂酸、二油酰磷脂酰胆碱、二油酰磷脂酰乙醇胺、卵磷脂、大豆磷脂、氢化卵磷脂、氢化大豆磷脂、心磷脂和脑磷脂及其混合物, 其中优选卵磷脂、大豆磷脂、心磷脂和脑磷脂及其混合物。

所述的固醇选自胆固醇、二氢胆固醇、大豆甾酰糖苷、大豆甾醇和麦角固醇, 其中优选胆固醇。

所述的附加剂包括抗氧化剂、表面活性剂和稳定剂。

其中所述的抗氧化剂选自维生素 E、维生素 E 酯、亚硫酸钠、亚硫

酸氢钠、焦亚硫酸钠、硫代硫酸钠、没食子酸丙酯、叔丁基对羟基茴香醚、二叔丁基对甲酚、半胱氨酸和蛋氨酸中的一种或多种。

其中所述的表面活性剂选自脱氧胆酸盐、胆酸盐、脱氧胆酸、牛磺胆酸盐、胆酸、吐温-80、泊洛沙姆、汴泽和司盘中的一种或多种；

其中所述的稳定剂选自硬脂胺、磷脂酸、十四酸、油酸和甘油中的一种或多种。

所述的修饰材料包括聚乙二醇、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、神经节鞘酯、聚丙烯酰胺、壳聚糖、聚乙二醇-磷脂衍生物或它们的混合物；其中聚乙二醇-磷脂衍生物可选用聚乙二醇-二硬酯酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-二棕榈酰磷脂酰胆碱、聚乙二醇-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺、聚乙二醇-氯化大豆磷脂酰乙醇胺和聚乙二醇-二硬脂酰磷脂酰胆碱；其中所述的聚乙二醇的平均分子量为 200-20000，优选平均分子量为 2000-5000。

所述的依托泊甙脂质体的粒径小于 1000nm，优选粒径小于 500nm。

所述的依托泊甙脂质体，可进一步制成注射剂或口服制剂。

本发明所述的依托泊甙脂质体的制备方法，可以采用下述方法中的任意一种：

方法一：薄膜分散法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂按上述比例溶解于适量有机溶剂中，20-60℃下减压蒸发除去有机溶剂，形成一层脂质薄膜，加入适量含水溶性附加剂的水相介质溶解脂膜，超声或高压均质处理，即得依托泊甙脂质体。

方法二：注入法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂溶于适量有机溶剂中制成脂质溶液，吸取该溶液缓缓注入含水溶性附加剂的水相介质中，注入完毕去除有机溶媒，然后可进行

超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体。这里水相介质的温度为20-60℃。

方法三：逆向蒸发法：将依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂按比例溶于有机溶剂，滴入含水溶性附加剂的水相介质，通过超声或高速剪切使形成稳定的W/O型乳剂，减压蒸去有机溶剂，滴加水相介质，旋转帮助器壁上的凝胶脱落，然后在减压下继续蒸发，制得水性混悬液，然后可进行超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体。

方法四：熔融法：按比例称取依托泊甙、磷脂类物质、固醇、脂溶性附加剂于60-80℃加热熔融，加入含水溶性附加剂的水相介质混合，然后可进行超声或高压均质处理得到依托泊甙脂质体。

上述制备方法中，所述的有机溶剂选自乙醇、甲醇、乙醚、丙酮、乙酸乙酯、氯仿和二氯甲烷及其混合物；所述的水相介质可以为注射用水、磷酸盐缓冲液、枸橼酸盐缓冲液、醋酸盐缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、生理盐水溶液、甘露醇溶液或葡萄糖溶液，其中上述缓冲液的pH为4-8。

为进一步延长依托泊甙脂质体的血液循环时间，提高依托泊甙脂质体的靶向性和生物利用度，降低毒副作用，可进一步在上述制备脂质体的过程中（最好在磷脂类物质溶解熔融或水相介质配制过程）加入修饰材料，采用同样的工艺条件，制备成依托泊甙长循环脂质体。

为延长依托泊甙脂质体的存放时间，便于运输，可将本发明的依托泊甙脂质体或其长循环脂质体通过喷雾干燥或冷冻干燥工艺制成固体制剂；为防止干燥工艺中脂质体的聚集需加入支架剂，可以选择的支架剂为甘氨酸、丝氨酸、蔗糖、乳糖、甘露醇、葡萄糖、海藻糖、麦芽糖、阿拉伯胶、木糖醇、山梨醇、果糖、右旋糖苷、氯化钠和白

蛋白及其混合物，其用量按磷脂类物质重量比计算为1份磷脂加0.1-4份。

本发明制得的依托泊甙脂质体加一定量的注射用水、生理盐水或葡萄糖注射液振荡水合后，即得本发明依托泊甙脂质体注射剂。当然，也可以采用常规方法制备成口服制剂。

本发明的依托泊甙脂质体能够以注射或口服方式给药，其中注射方式可以为静脉输注、静脉注射，优选静脉输注方式给予患者。

脂质体属于超微粒药物载体，具有淋巴系统定向性，属于靶向给药系统的一种新剂型。它具有类细胞结构，或是通过内吞作用进入溶酶体，然后被酶消化释放药物，或是通过细胞融合作用，即脂质膜材与细胞膜构成物相似而融合进入细胞内，继而被消化释放药物，使药物在靶区组织中维持较高浓度，并改变被包封药物的体内分布，使药物主要在肝、脾、肺和骨髓等组织器官中蓄积，从而提高药物的治疗指数、减小药物的给药剂量和降低药物的毒性；经脂质体携带后，可保护药物活性基团在内环境中不被降解，还可延长药物血中循环时间。

本发明将依托泊甙包封于类脂双分子层中，制成一种超微球状脂质体，增加了药物的水溶性和稳定性，使包裹的依托泊甙具有靶向性，能选择性到达病变部位、组织和细胞，且在更长时间内维持有效血药浓度，提供持续的治疗效果，从而增加依托泊甙的疗效，降低不良反应。对依托泊甙脂质体修饰得到的依托泊甙长循环脂质体，缓慢释放药物，在体内可以逃匿MPS的捕获，延长脂质体在血液中的循环时间，达到缓释、靶向、长效的作用，从而提高依托泊甙抗肿瘤活性。

采用本发明方法所制备的依托泊甙脂质体和依托泊甙长循环脂质体能降低血管刺激性，提高药物化学稳定性和疗效，并降低毒副作用，因而具有一定创新性和实用性；其平均粒径在1000nm以下，包封率大

于 80%；所得制剂稳定性好；且该制剂制备工艺成熟，方法简便易行，材料来源广，成本低，便于工业化生产。

附图说明

图 1 为依托泊甙脂质体及其原料药体外释药曲线。

具体实施方式

实施例 1:

取依托泊甙 100mg、卵磷脂 500mg、胆固醇 40mg 于 50ml 茄形瓶中，加入 20ml 乙醇:丙酮 (2:1) 超声使其充分溶解。茄形瓶置于 40℃ 恒温水浴中减压旋转蒸发除去有机溶剂，在瓶内壁上形成一层脂质薄膜，缓慢加入 10ml 磷酸盐缓冲液 (pH7.0)，水合，涡旋振荡，使茄形瓶上的脂质薄膜完全溶解下来。混合液经室温超声分散 (超声功率 600W) 30min，即制得依托泊甙脂质体。其平均粒径为 179nm，全部粒子均在 300nm 以下，粒径分布狭窄，表明脂质体大小较为均一；该脂质体可在室温下稳定数天并在 4℃ 下稳定至少 3 个月，贮存期间观察不到沉淀和依托泊甙的降解。

实施例 2

精密称取 100mg 依托泊甙、400mg 大豆磷脂、40mg 脑磷脂、30mg 大豆甾酰糖苷、20mg 维生素 E，用 10ml 乙醚将之溶解。然后将此溶液用注射器缓慢注入 30ml 含 0.5% 胆酸钠的生理盐水 (40℃) 中，用电子恒速搅拌器以 2000r/min 的转速搅拌至乙醚除尽，混合液高压均质 (均质压力 10000psi) 5 次，即得依托泊甙脂质体，置 4℃ 冰箱中保存备用。

实施例 3

准确称取 100mg 依托泊甙、2000mg 氢化卵磷脂、800mg 大豆甾醇、50mg 心磷脂、50mg 硬脂胺于三角烧瓶中，加热熔融，置于 75℃ 水浴中备用。将 100mg 泊洛沙姆 188、400mg 甘油、100mg 维生素 C 溶于 20ml 5%

葡萄糖溶液中，加热至75℃，加入脂质熔融液中，高速剪切混合，经高压均质（均质压力15000psi）3次，即得依托泊甙脂质体。

实施例4

准确称取100mg依托泊甙、1300mg氯化豆磷脂、180mg二硬脂酰磷脂酰胆碱、1000mg麦角固醇、50mg油酸溶于30ml氯仿:甲醇（1:1）混合溶剂中使完全溶解成澄明溶液，得有机相；另称取100mg吐温-80、100mg焦亚硫酸钠溶于10ml醋酸盐缓冲液（pH6.0）中，得水相；再将有机相与水相混合，经高速剪切（Fluko，10000rpm）5min得W/O初乳，然后于旋转蒸发仪上减压蒸发除去有机溶剂，即得依托泊甙脂质体。

实施例5

准确称取100mg依托泊甙、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱2000mg、二棕榈酰磷脂酸100mg、二氢胆固醇 400mg、十四酸100mg溶于30ml二氯甲烷得有机相。另称取500mg脱氧胆酸钠、100mg亚硫酸钠溶于10ml枸橼酸盐缓冲液（pH6.2）中得水相；再将有机相与水相混合，经水浴式超声处理8min，直至形成稳定的W/O型乳剂（水浴温度控制在20℃），然后于旋转蒸发仪中减压蒸发除去有机溶剂，达到胶态后滴加5 ml枸橼酸盐缓冲液，水化，继续短时减压蒸发，经超声处理20min后，即得依托泊甙脂质体。

实施例6

取依托泊甙100mg、卵磷脂500mg、二硬脂酰磷脂酰甘油100mg、胆固醇100mg、叔丁基对羟基茴香醚50mg于梨形瓶中，用10ml乙酸乙酯溶解后，旋转蒸发，30℃减压除去有机溶剂。真空干燥2-3天得恒重薄膜。加入10ml含10%蔗糖、10%甘露醇的tris-HCl缓冲液（20mmol/L，pH7.0，含0.15mol/L NaCl），旋转摇动梨形瓶，得到脂质体悬液。经高压均质处理（均质压力12000psi）5次，药液于-40℃预冻24小时，于

冷冻干燥机中冻干，冻干程序为：-40℃，8小时；-30℃，6小时；-20℃，6小时；-10℃，5小时；0℃，5小时；15℃，5小时。所得依托泊甙脂质体冻干制剂加水复溶后平均粒径为 $150\pm 31\text{nm}$ ，全部粒子均在400nm以下。

实施例7

精密称取100mg依托泊甙、1400mg大豆磷脂、160mg聚乙二醇（平均分子量4000）-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（PEG₄₀₀₀-DSPE）、60mg没食子酸丙酯，用10ml乙醇将之溶解。然后将此溶液用注射器缓慢注入30ml含0.5%牛磺胆酸钠溶液（60℃）中，用电子恒速搅拌器以1000r/min的转速搅拌至乙醇除尽为止，混合液经高压均质（均质压力10000psi）5次，即得依托泊甙长循环脂质体，置4℃冰箱中保存备用。

实施例8

称取依托泊甙100mg、卵磷脂1200mg、聚乙二醇（平均分子量200）-氢化大豆磷脂酰乙醇胺（PEG₂₀₀-HSPE）80mg、胆固醇100mg、叔丁基对羟基茴香醚50mg于梨形瓶中，用10ml乙酸乙酯溶解后，旋转蒸发，30℃减压除去有机溶剂。真空干燥2-3天得恒重薄膜。加入10ml含10%山梨醇、5%右旋糖苷、5%白蛋白的溶液，旋转摇动梨形瓶，得到脂质体悬液。经超声处理（超声功率600w）20min，药液于喷雾干燥机中干燥，喷雾干燥条件为：进风温度120℃，进料速度50ml/min，旋风分离器压差50mm水，雾化盘转速2500r/min，收集得到依托泊甙长循环脂质体固体制剂。

实施例9

准确称取100mg依托泊甙、氢化卵磷脂1500mg、聚乙二醇（平均分子量1000）-二棕榈酰磷脂酰胆碱（PEG₁₀₀₀-DPPC）150mg溶于30ml二氯甲烷得有机相。另称取150mg硫代硫酸钠溶于10ml水中得水相；再

将有机相与水相混合，经水浴式超声处理10min，直至形成稳定的W/O型乳剂（水浴温度控制在20℃），然后于旋转蒸发仪中减压蒸发除去有机溶剂，加入1000mg乳糖、500mg葡萄糖、500mg海藻糖超声溶解，即得依托泊甙长循环脂质体混悬液。该混悬液于微型喷雾干燥机中减压干燥，进口温度130~140℃，出口温度50~60℃，空气压力1.2Atm，加料速度60ml/min，即得依托泊甙长循环脂质体喷雾干燥制剂。

实施例10

准确称取100mg依托泊甙、1800mg卵磷脂、100mg聚乙二醇（平均分子量4000）-二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（PEG₄₀₀₀-DPPE）于三角烧瓶中，加热熔融，置于80℃水浴中备用。将1000mg甘氨酸、600mg麦芽糖、1000mg甘露醇溶于20ml水中，加热至80℃，加入脂质熔融液中，高速剪切混合，经高压均质（均质压力15000psi）3次，即得依托泊甙长循环脂质体。该混悬液于-80℃预冻10小时，于冷冻干燥机中冻干（冻干程序为-40℃，10小时；-20℃，8小时；0℃，8小时；20℃，5小时），即得依托泊甙长循环脂质体冻干制剂。

实施例11

取依托泊甙100mg、卵磷脂1600mg、聚乙二醇（平均分子量3350）-二硬脂酰磷脂酰胆碱（PEG₃₃₅₀-DSPC）100mg溶于10ml乙醇，混合溶液在旋转蒸发器内40℃减压除去溶媒，形成薄膜。然后加入含1%聚乙烯吡咯烷酮（PVP）的水溶液10ml，超声处理30 min，制得依托泊甙长循环脂质体悬液。加入8%乳糖和8%甘露醇作支架剂，经冷冻干燥得依托泊甙长循环脂质体的冻干制剂。

依托泊甙长循环脂质体的冻干制剂临用前只需充分水化短时振荡，就能重新形成脂质体。

实施例12

将聚乙二醇（平均分子量5000）-二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（PEG₅₀₀₀-DSPE）400mg、氢化大豆磷脂300mg、胆固醇150mg、 α -生育酚30mg和依托泊甙100mg溶于30ml氯仿，置梨形瓶内，在氮气流下旋转蒸发，减压除去溶媒。真空干燥2~3天，得恒重薄膜。加入含1.0%PEG4000水溶液10ml，旋转摇动梨形瓶，得到脂质体悬液。用氮气冲洗后，封口室温下平衡1天，探针超声处理15min，然后在10000psi均质压力下高压均质处理3次，使脂质体粒径逐渐减小。然后加入8%葡萄糖、8%甘露醇、6%海藻糖，冷冻干燥得依托泊甙长循环脂质体。

实施例13

取实施例1中的依托泊甙脂质体进行形态观察、并测定粒径及其分布。

取脂质体适量，加入适量注射用水稀释，用2%磷钨酸染色，透射电镜下观察粒子形态。

取脂质体悬液适量，加入适量水稀释，以Zetamaster光子相关光谱仪测定脂质体的粒径大小和分布以及Zeta电位。

结果：电镜下观察依托泊甙脂质体呈均匀规则的球形粒子，无聚集和粘连。

实验测得的依托泊甙脂质体粒径分布均匀，平均粒径为179nm，多分散指数为0.157，zeta电位为-26.8mv。

实施例14

取实施例1中的依托泊甙脂质体进行包封率的测定。

包封率依据RP-HPLC方法测定，依托泊甙脂质体溶液经超滤结合高速离心法（4000rpm，10min）分离游离的依托泊甙，用RP-HPLC测定游离依托泊甙含量。色谱柱：Diamonsil C18柱（250 mm × 4.6 mm，

5 μm)；流动相：乙腈-pH值4.0醋酸盐缓冲液(32:68)；柱温：25 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长：254 nm；流速：1.0ml $\cdot\text{min}^{-1}$ ；进样20 μl ，按下列公式计算包封率。

包封率(%) = (脂质体中依托泊甙总量 - 游离依托泊甙量) / 依托泊甙总量

结果：测得包封率为84.32%。

实施例15 体外释药特性

精密量取实施例1中的依托泊甙脂质体9ml至透析袋中，置于250ml pH7.4磷酸盐缓冲液中，于(37 \pm 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 下磁力搅拌，定时吸取介质6 ml，加氯仿4 ml，充分提取，离心，吸取氯仿层，将其挥干，加入甲醇4 ml溶解，测定吸光度，并按标准曲线方程计算累积释放百分率，同时做依托泊甙原料药的体外释放试验作为比较。

结果：依托泊甙脂质体50h累积释药(96.30 \pm 1.11)%，其原料药3h累积释药(97.10 \pm 1.84)%。依托泊甙脂质体及其原料药体外释药曲线见图1，从图1中可以比较出，依托泊甙制成脂质体后，达到了长效缓释的效果。

实施例16

取实施例6中的冻干品适量，密封，于冰箱4 $^{\circ}\text{C}$ 放置，于0、1、2、3、6月取样，对粒径、包封率、渗漏率、含量等指标进行测定，评价依托泊甙脂质体冻干品的稳定性。结果见表1。

表1

批号	测定项目	0个月	1个月	2个月	3个月	6个月
070801	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	有关物质(%)	0.91	0.98	1.05	1.16	1.38

	平均粒径 (nm)	150±31	152±40	155±43	160±41	162±51
	多分散指数	0.189	0.184	0.183	0.191	0.197
	包封率 (%)	87.44	87.31	87.24	87.10	86.95
	渗漏率 (%)	0	0.15	0.23	0.39	0.56
	含量 (%)	100.87	100.85	100.81	100.75	100.70
	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	有关物质 (%)	0.94	0.98	1.08	1.18	1.28
	平均粒径 (nm)	152±23	154±39	156±32	161±38	167±54
070802	多分散指数	0.172	0.171	0.188	0.187	0.194
	包封率 (%)	87.69	87.40	87.17	87.01	86.89
	渗漏率 (%)	0	0.33	0.59	0.78	0.91
	含量 (%)	100.04	99.96	99.91	99.89	99.78
	外观色泽	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定	符合规定
	有关物质 (%)	0.92	0.96	1.06	1.20	1.30
	平均粒径 (nm)	140±32	146±42	147±33	148±42	155±58
070803	多分散指数	0.169	0.170	0.173	0.190	0.192
	包封率 (%)	87.67	87.54	87.46	87.45	87.20
	渗漏率 (%)	0	0.15	0.24	0.25	0.54
	含量 (%)	100.05	99.95	99.89	99.84	99.80

表1说明, 依托泊甙脂质体冻干品在冰箱4℃放置6个月, 其粒径、包封率、含量等质量指标基本不变, 表明依托泊甙脂质体冻干品稳定性好。

实施例17

取上述实施例中的依托泊甙脂质体或长循环脂质体制剂进行刺激

性实验。

(1) 对家兔耳缘静脉血管刺激试验:

将依托泊甙注射液的两种不同剂型按临床用药量(100mg/次)进行体表面积换算得出实验兔用剂量(5.2mg/kg)。实验前按2ml/kg的给药量用无菌生理盐水注射液新鲜配制。选用体重2.5-3.0kg的健康新西兰白兔6只,雌雄兼有。注射部位用碘酊和乙醇消毒后,3只白兔于右耳耳缘静脉注射依托泊甙注射液,左耳注射相同体积无菌生理盐水注射液作对照;另3只白兔于右耳耳缘静脉注射依托泊甙脂质体,左耳注射相同体积无菌生理盐水注射液作对照,注射速度为1ml/min(相当于人临床注射速度)。每日一次,连续3天,末次给药24小时后,由耳缘静脉注入空气处死白兔,肉眼观察注射部位的反应情况,并解剖兔耳血管及周围组织作石蜡切片(注射部位下向心段1cm及5cm处),染色,光镜检查。肉眼观察注射部位反应情况。结果见表2。

表2

制 剂	序号	右耳	左耳
依托泊甙脂质体	1	正常	正常
	2	正常	正常
	3	正常	轻微充血
依托泊甙注射液	1	充血	轻微充血
	2	充血	正常
	3	充血	轻微充血

结果,如表2所示,依托泊甙脂质体血管刺激性明显弱于依托泊甙注射液。

(2) 肌肉刺激性试验

依托泊甙注射液的剂量换算、药物配制、新西兰白兔的选择同上

(共4只, 每种剂型2只)。剪去白兔两侧股四头肌部位的兔毛, 用碘酊和乙醇消毒后, 分别在右侧股四头肌注射依托泊甙脂质体和依托泊甙注射液1ml, 左侧股四头肌注射等量无菌生理盐水注射液作对照, 注射48小时后, 由耳缘静脉注入空气处死白兔, 解剖股四头肌, 纵向切开, 观察注射部位肌肉组织的反应情况, 确定反应级数。

0级: 无变化

1级: 轻度充血, 其范围在0.5cm×1.0cm以下

2级: 中度充血, 其范围在0.5cm×1.0cm以上

3级: 重度充血, 伴有肌肉变性

4级: 出现坏死, 有褐色变性

5级: 出现广泛性坏死

然后算出4块股四头肌反应级数总和, 如果股四头肌反应级数的最高值与最低值之差大于2, 则应另取2只白兔重新实验。得到结果后, 若四块股四头肌反应级数总和小于10, 则认为供试品的局部刺激性实验符合规定。

表3

剂 型	序号	右侧股四头肌	左侧股四头肌
依托泊甙脂质体	1	0	0
	2	0	0
依托泊甙注射液	1	2	0
	2	2	0

结果(见表3)表明, 依托泊甙脂质体的肌肉刺激性明显弱于依托泊甙注射液。

实施例18 过敏试验

给药方法 取适量依托泊甙注射液用生理盐水稀释一定倍数, 为

样品A；取自制依托泊甙脂质体用生理盐水稀释一定倍数，为样品B。依托泊甙给药剂量为2.5mg/kg。取豚鼠12只，分成A、B两组，分别供样品A和B进行过敏性试验用。每组豚鼠6只，体重250~350g。隔天ip供试品0.5ml，连续3次。然后将A、B组豚鼠再分别平均分成A1、A2及B1、B2组，其中A1、B1组于首次注射后的第14天由后脚掌外侧静脉注入供试品1ml进行攻击，观察注射后动物有无用爪搔鼻、喷嚏、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克、死亡等反应，A2、B2组于首次注射后的第21天同样由后脚掌外侧静脉注入供试品并进行观察。

结果：依托泊甙注射液：多次抓鼻、多次颤抖、喷嚏、竖毛、抽搐、呼吸困难，两例动物出现大小便失禁；依托泊甙脂质体：竖毛、少数动物颤抖。

根据豚鼠过敏反应级数标准表，对本试验进行评定，反应级数达2级以上（包括2级）时，可认为该供试品过敏反应试验阳性。

结果：A组为3级，B组为1级。即A组（市售依托泊甙注射液）可导致明显的过敏反应，为阳性，而B组（自制依托泊甙脂质体）过敏试验为阴性。

实施例19 溶血性实验

自新西兰白兔的颈总动脉取血20ml，置于烧瓶内，用玻璃棒轻轻搅动数分钟后，除去纤维蛋白，取出血液，加等量生理盐水注射液，离心（1500rpm，10min），除去上清液；沉淀的红细胞再加生理盐水注射液清洗。如此反复直到上清液透明，按红细胞的容量用生理盐水配成2%的混悬液。

取干净试管7支，分别编号，依次加入各液，第6管不加供试品作空白对照管，第7管用蒸馏水代替生理盐水，摇匀，置于37℃水浴中，分别于0.5、1、2、3小时观察是否有溶血现象发生。

结果表明，依托泊甙注射液和依托泊甙脂质体都未见溶血发生，两种剂型的溶血性实验均合格。

实施例20

取实施例10中的依托泊甙脂质体冻干制剂溶于蒸馏水中，制成1mg/ml的溶液，在4℃、25℃和36℃放置四周，于8、12、16、20、24和28天高速离心收集沉淀，用HPLC法测定依托泊甙含量，结果见表4。

表4

依托泊甙含量 (%)	0天	8天	12天	16天	20天	24天	28天
4℃	1	0.99	0.99	0.98	0.98	0.97	0.96
25℃	1	0.97	0.96	0.93	0.86	0.81	0.71
35℃	1	0.96	0.91	0.82	0.77	0.73	0.57

结果表明，依托泊甙脂质体在4℃放置一个月，基本无渗漏；在室温条件下存放两周基本无渗漏；在35℃放置8天，浓度仅下降4%左右，放置12天，浓度变化10%；在环境温度不高于35℃的情况下，该脂质体能保持8天以上的稳定性，表明依托泊甙脂质体稳定性好。

实施例21

利用实施例10中所述的制剂评价依托泊甙脂质体的毒性。

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，分别尾静脉注射依托泊甙脂质体和依托泊甙注射液，组间剂量按等比级数排列，比值1:0.8，观察并记录给药7天内各组动物的反应和死亡率，用简化机率单位法计算LD₅₀，其95%的可信限为：

依托泊甙注射液 LD₅₀ = 30.2±1.2mg/kg，

依托泊甙脂质体 LD₅₀ = 68.4±1.6mg/kg。

LD₅₀毒性实验结果表明，依托泊甙脂质体与依托泊甙注射液相比，

毒性明显降低。

实施例22 大鼠体内药代动力学

HPLC色谱条件：Diamonsil C18柱（250 mm × 4.6 mm, 5 μ m）；流动相：甲醇-pH4.0醋酸盐缓冲液（40 : 60）；流速：1.0ml · min⁻¹；柱温：25℃；检测波长：254 nm；进样量：20 μ l。

药代动力学实验 将12只大鼠随机分成2组，每组6只，实验前禁食。分别于右后股静脉注射依托泊甙溶液（将依托泊甙注射液用生理盐水稀释至1mg · ml⁻¹）和本发明依托泊甙脂质体(1mg · ml⁻¹)，给药剂量为10mg · kg⁻¹。分别于5、15、30、45min和1、2、4、6、8、12、24h眼眶取血。将血样置预先肝素化的1.5 ml尖底离心试管中，4000r · min⁻¹离心10 min，分离出血浆于-20℃冰箱保存待测。

血浆样品处理方法 血浆样品200 μ l，加入4 μ g · ml⁻¹对羟基苯甲酸丙酯内标溶液10 μ l，氯仿3ml，涡旋震荡1min，4000r · min⁻¹离心10min，取有机相2ml，置离心管中，于40℃水浴中氮气吹干，残留物用50 μ l流动相溶解后20 μ l进样分析。

数据分析 将主要药代动力学参数进行统计分析，用SPSS 1110软件按配对t检验进行处理，评价依托泊甙脂质体与依托泊甙注射液的药代动力学参数有无差异。

参数	依托泊甙脂质体	依托泊甙注射液
T _{1/2} α /h	0.29±0.21	0.24±0.19
T _{1/2} β /h	1.74±0.31	1.68±0.15
CL/L·h ⁻¹	0.24±0.11	0.49±0.15**
C _{max} / μ g·L ⁻¹	48.91±2.13	31.54±1.90
AUC ₀₋₂₄ / μ g·h·L ⁻¹	87.56±8.80	18.30±6.45*

$AUC_{0-\infty}/\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$	87.94±8.91	18.80±6.56*
MRT/h	5.78±0.86	1.46±0.32*

*P < 0.05; **P < 0.01。

以依托泊甙溶液为对照，考察依托泊甙脂质体在大鼠体内的药代动力学行为。用3P97药代动力学程序处理依托泊甙脂质体和注射液的平均血药浓度数据。根据AIC和拟合度判断两者的模型归属。结果表明，依托泊甙脂质体和溶液的血药浓度数据均符合双隔室模型。依托泊甙脂质体的MRT、 AUC_{0-24} 和 $AUC_{0-\infty}$ 分别是参比制剂的3.96、4.78和4.68倍，具有显著差异，CL是参比制剂的0.49倍，具有极显著差异，这说明在同样剂量条件下，药物被脂质体包裹后延长了药物在血液中的滞留时间，使药物在体内消除速度较慢并保持了较高的血药浓度，从而发挥长效作用。依托泊甙脂质体改变了依托泊甙在大鼠体内的药动学性质，具有一定的缓释和长循环特征。

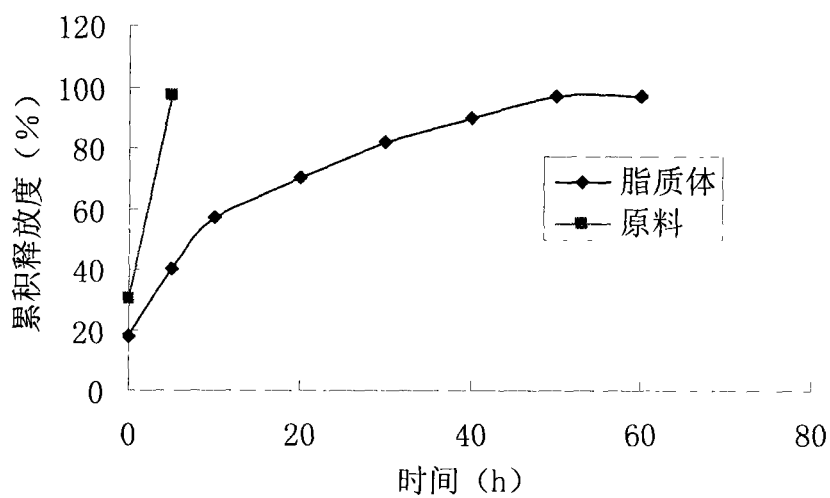


图 1